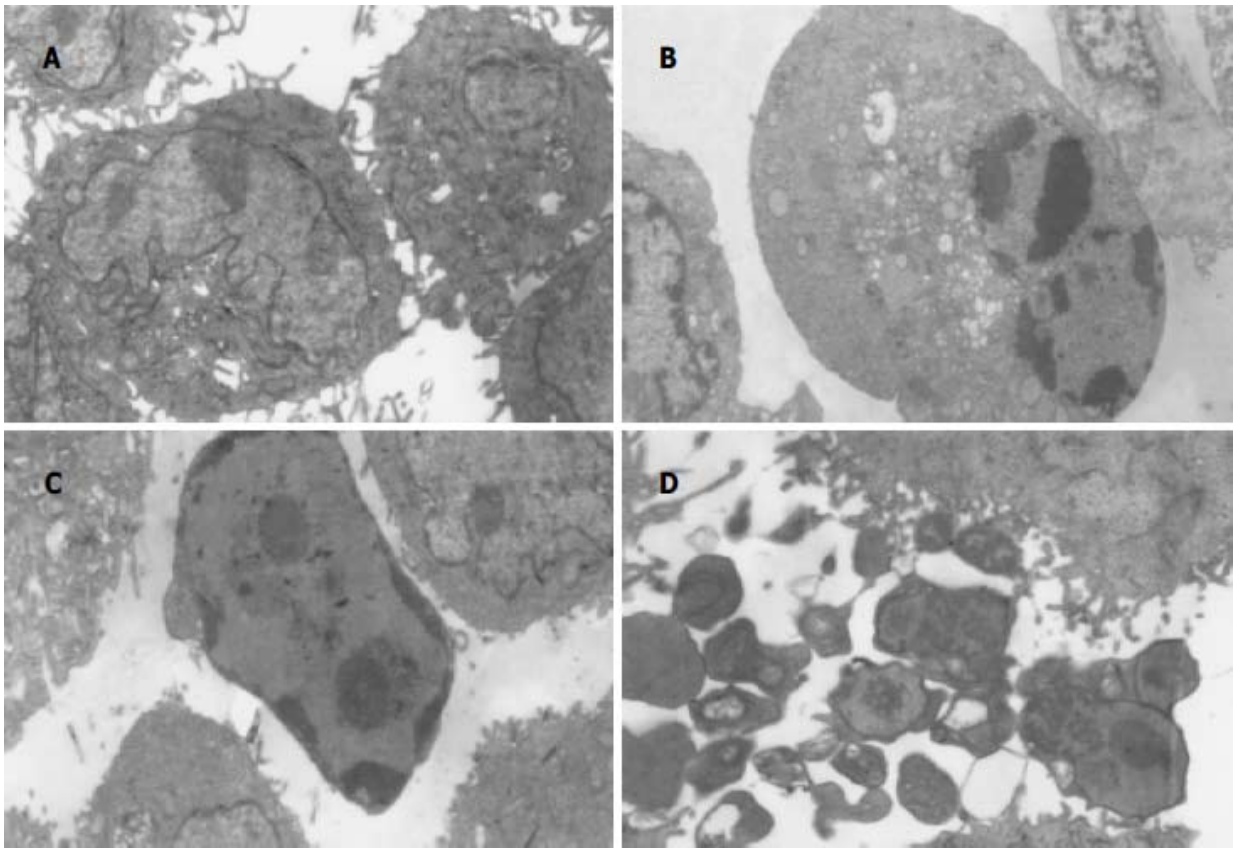
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 7 月 28 日　第 13 卷　第 14 期　(Volume 13 Number 14)



14/2005

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
www.wjgnet.com
二零零五年七月二十八日
第十三卷　第十四期
世界胃肠病学杂志社

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2005 年 7 月 28 日　第 13 卷　第 14 期　(总第142期)

述　评

1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来

1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿

胃　癌

1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响
黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众

肝　癌

1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因*p53*的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓

1663 肝癌组织中TGF-β1、TGF-β1R Ⅱ和NF-κB的表达
缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春

1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达
吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛

1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义
吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛

1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林

1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达
丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌

病毒性肝炎

1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因
张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠

1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛

1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕

1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳

基础研究

1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用
路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚

1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进

1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成

1721 ^{103}pd诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响
何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯

文献综述

1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建

1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐

1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣

1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建

1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴凤华

1747 聚乙二醇a-干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江

1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣

研究快报

1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏

1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓

1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周

1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋

1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定
温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿

1773 阿霉素对胃癌细胞内游离Ca^{2+}浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛

1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验

1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春
1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳
1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜
1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊
1787 中国人与非洲黑人*H. pylori*相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA
1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华
1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然
1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民
1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊

致　　谢

1800 致谢世界华人消化杂志编委

封面故事

1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响
黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657
http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.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
isgcon2005.com

Advanced Capsule Endoscopy Users Course
November 18-19, 2005
www.asge.org/education

II Latvian Gastroenterology Congress
November 29, 2005
gec@stradini.lv
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
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
www.isde.net

世界華人消化雜志

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 2005-07-28
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: wcjd @ 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年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1645-1649
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•述评 EDITORIAL•

进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究

姚希贤,崔东来

姚希贤,崔东来,河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
姚希贤,男,汉族,1955年河北医学院本科毕业,现任河北省消化病研究所所长(省重点实验室主任),博士生导师,中西医结合高徒导师,主任医师,教授,省管优秀专家,享受国务院特贴,主要从事慢性肝病、慢性胃病研究,发表论文170篇,主要编著、主编书6部.
河北省自然科学基金项目,No. 300358.
河北省中医药局资助经项目,No. 200335
通讯作者:姚希贤,050000,河北省石家庄市,河北医科大学第二医院内科.
yaoxi-xian@163.com
电话:0311-7814356
收稿日期:2005-04-07 接受日期:2005-04-09

摘要

抗病毒、抗肝纤维化治疗是近年来慢性病毒性肝炎治疗的关键.单一应用抗病毒药物干扰素对HBV的完全应答约为30-40%,长效干扰素使疗效及耐受性均有提高;LMV虽系应用广泛的核苷类抗病毒药物,但最大的问题是需要长期治疗,而较长时间用药容易产生病毒YMDD变异与耐药;阿德福韦、恩替卡韦能有效抑制LMV的YMDD变异株复制,用于LMV治疗出现YMDD变异耐药者.新的抗病毒治疗策略如联合治疗、序贯治疗以及免疫调节治疗等能否进一步提高疗效有待深入研究.中医药肝纤维化治疗虽然取得了良好效果,但迫切需要根据循证医学原理,深入开展和加强肝纤维化的临床病理研究工作.

关键词:慢性肝炎;肝纤维化;抗病毒

姚希贤,崔东来.进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究.世界华人消化杂志 2005;13(14):1645-1649
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1645.asp

0 引言

常见的嗜肝病毒有甲、乙、丙、丁、戊五型,导致慢性化者主为乙型和丙型.我国乙肝病毒(HBV)人群感染率57.6%,乙肝表面抗原(HBsAg)阳性者9.75%[1],全国现症慢性乙型肝炎(简称慢乙肝)约3 000-4 000万,全球慢性HBV感染者达3.5亿[2].成年慢乙肝中40-70%有病毒复制[3-4]和活动性肝炎[5-6],其中15-20%进展为肝硬化[7-8].丙肝病毒(HCV)感染率为3.2%,慢性化率高达50-85%,10-30%发展为肝硬化,3-10%可演变为肝癌[9-11].

对慢乙肝主要采用抗病毒、免疫调节、改善肝功能等,抗病毒是治疗的关键影响疗效的主要因素是机体对HBV的免疫耐受、共价闭锁环状DNA(cccDNA)难以清除[12-13]以及HBV不断发生变异,逃逸免疫攻击有关.随着慢性肝炎病变的发展,肝脏纤维组织增生益重.因此,慢乙肝的治疗仍然是复杂而长期的难题.为此,加强慢性肝炎、肝纤维化合理治疗是摆在面前的重要问题.

1 抗病毒治疗

抗病毒治疗是慢性病毒性肝炎治疗的关键,目前国内外公认的抗病毒药物有干扰素、拉米夫定(lamivudine,LMV)以及阿德福韦(adefovir,ADV)等,但尚乏满意疗效.为此,应探讨抗病毒治疗新策略.

1.1 抗病毒药物治疗

1.1.1 干扰素(interferon,IFN) 是目前抗病毒有效药物.对HBV的完全应答为30-40%,对丙肝病毒(HCV)约为HBV的一半,IFN主要用于病程在半年以上,有活动性病毒复制和活动性肝病,丙氨酸氨基转移酶(ALT)升高患者,剂量宜较大(一般3-5 kU),疗程不能太短(4-6 mo),对HBeAg阴性者可能需1 a[14-15].IFN对HBV-DNA有报道转阴率为37%,HBsAg转阴率7.8%,长期治疗可增加患者的生存率,降低肝癌的发生率[16-21].IFN与LMV相比,对减少HBV-DNA和ALT复常率方面不及LMV,但HBeAg血清转换高于LMV,停药后可继续增加,很少出现耐药为另一优点.本药不良反应较多,肝硬化患者不宜应用.长效干扰素-聚乙二醇(PEG),使IFN在血中浓度维持时间延长,每周给药一次,副作用减少,疗效及耐受性提高.PEG-IFN-2α、2β单用于治疗慢性丙型肝炎(简称慢丙肝)完全应答率分别达36-39%和23-25%,对IFN-α治疗无效或复发患者取得较好疗效[15].目前上市的有佩乐能(Peg-intron)和派罗欣(Pegasys),治疗慢乙肝随机、对照初步结果显示HBV-DNA滴度下降较快,HBeAg血清转换率提高,伴随着生化及组织学病变改善,其具体疗效有待进一步评价[22-25].

1.1.2 LMV 能有效地抑制乙型肝炎病毒复制,减少血液和肝脏病毒载量,从而减轻肝脏炎症、坏死和纤维化,清除HBeAg和促进HBAeg/抗-HBe的血清转换.连续用药1 a,HBV-DNA转阴率可达80%,而HBAeg/抗-HBe的血清转换率仅16-21%,但对cccDNA无效,故停药后HBV-DNA很快恢复阳性.亚洲一项多中心实验研究表明,治疗24 mo后HBAeg/抗-HBe转换率高

至27%，36 mo后达40%[26-31]. 治疗前ALT水平是血清转换的重要预测因素. ALT基线水平大于5倍正常值上限的患者，经LMV治疗12 mo后HBeAg/抗-HBe的血清转换率为38-80%，ALT基线水平在2-5倍正常值上限时，转换率为5-12%，ALT正常者，无一例出现血清HBeAg转阴. 因此，治疗适应证的选择至关重要. 治疗前1 mo至少1-2次，ALT>2×ULN或于既往3-6 mo内ALT反复波动，至少有1-2次>2×ULN，可推荐抗病毒治疗;慢乙肝患者，ALT在1-2×ULN之间是否需治疗，应做肝活检决定，如组织学有明显坏死性炎症，可进行抗病毒治疗，一般疗效较好. 但对ALT正常的HBV感染者暂不考虑抗病毒治疗[32-34]，此种患者并非不需要治疗，而是治疗乏效，罔受可能发生的不良反应所累. 但面对当前众多此类患者，迫切需要治疗. 有关联用抗病毒、增强免疫功能研究值得引起更多重视.

LMV虽系应用广泛的核苷类抗病毒药物，但最大的问题是需要长期治疗，而较长时间用药容易产生病毒YMDD变异与耐药[36]，而使治疗乏效或疗效降低. 研究显示长期治疗未发生YMDD变异者，组织学改善率为77%，恶化率很低，为5%. 一旦发生耐药，组织学改善率仅45%，恶化率高达14%，出现病毒学指标反弹. YMDD变异通常发生在LMV治疗6 mo后，随治疗时间延长发生率逐渐增高. LMV治疗1、2、3 a和4 a YMDD变异发生率分别为14%、38%、49%和66%[37]. 因此，如何减少、延缓LMV耐药也是当前研究的热点问题.

HBV是高变异病毒，当机体免疫系统对已感染的野生株产生强烈特异性免疫应答后，野株型HBV复制即被抑制，变异株的产生可逃逸已形成的抗病毒免疫力攻击并对抗病毒药物产生耐药. HBV前C或/和基本核心启动子(BCP)变异最为常见[38]. 我国HBeAg阴性慢乙肝中38%存在前C终止密码子，42%有BCP变异，12%二者共存. 特点是HBsAg持续阳性，HBeAg阴性，抗HBe阳性，以PCR法测定HBV-DNA水平高于10^8-10^9copies/L，具有活动性肝病，易于慢性化或者发生重症肝炎，对干扰素往往耐药，治疗难度增大，亚洲和我国的慢乙肝中约1/5为此类患者. 干扰素治疗此类患者最大的问题是停药后复发，平均复发率60%. 疗程4-6 mo，持续应答率10-15%;疗程增至12-24 mo者持续应答率22-30%[39-41].

对有前C区突变的慢乙肝患者，LMV可产生明显治疗反应，但很难确定其治疗终点，长期服用可望提高疗效，但随着LMV治疗时间延长，耐药变异率也随之增高，造成治疗困难[42-44]. ADV能有效抑制LMV的YMDD变异株复制，随着血清HBV-DNA的下降，cccDNA也有显著下降，对LMV治疗出现YMDD变异耐药患者，应用ADV有良好疗效[45-46]. 恩替卡韦(entecavir)等临床药物的应用将给LMV耐药、治疗失效者带来希望[47-48]，值得重视.

1.2 *联合或序贯治疗* 不同药物同时应用的治疗的策略为联合治疗(combination therapy);先后应用的治疗策略称为序贯治疗(sequential therapy).

1.2.1 *联合治疗* 现有的抗乙肝病毒药物如干扰素、LMV主要作用于cccDNA以下的复制阶段，单一用于慢乙肝抗病毒治疗，疗效皆有限. 长疗程应用单一抗病毒药物不仅会增加药物毒性，而且可能发生病毒变异，引起耐药. 应用作用于不同病毒复制靶位的抗HBV药的联合治疗可望提高疗效，但迄今对联合用药优势尚无肯定结论，持慎重态度者认为联合治疗可能增加药物毒性和治疗费用. 联合治疗方案有:(1)LMV与IFN联用:二者抗病毒作用环节与机制不同，LMV可控制HBV-DNA迅速降低其水平，IFN治疗创造条件，一般将之联合用于慢乙肝. 最近欧洲完成了一项多中心随机、双盲、对照IFN联合LMV治疗慢乙肝的临床研究. 治疗52 wk HBeAg/抗HBe血清转换率联合治疗组为29%，比单用IFN组(19%)和LMV组(18%)为高[48-49]. PEG-IFN与LMV联用的临床试验正在进行中，初步结果令人鼓舞，治疗52 wk时，PEG-IFN与LMV联合治疗组持续病毒学应答率显著高于单用LMV组(36% *vs* 14%)，HBV-DNA含量显著降低，YMDD变异显著减少(21% *vs* 40%)[50-51]. (2)LMV与泛昔洛韦(famciclovir，FCV)以及LMV、百塞诺或苦参素联合治疗等;(3)IFN与利巴韦林(ribavirin，RBV)联合:可清除HCV感染效果，对单用IFN无应答、停药后复发者，本联合治疗往往有效. 同时推荐方案为IFN-α 3-5 kU，3次/wk，RBV 800-1 200 mg/d，6 mo以上. (4)LMV、ADV联合用于LMV长期治疗发生耐药者，疗效较停用LMV，单一用药为好[52]. 对此，今后对联合用药应根据循证医学原则，采用双盲、随机对照临床研究进一步验证.

1.2.2 *序贯治疗* 是应用不同有效抗HBV药，连续、轮换、顺序治疗，可以维持较长疗程，防止病毒变异，减少药物毒性. 新的有效抗HBV药不断开发和应用，为序贯治疗创造了更好的、可供选择的药物，是今后值得研究的途径. IFN与核苷类药物的序贯治疗以及LMV与ADV几种核苷类药物的序贯治疗等，已被证明比单用任何一种药物具有更好疗效. 目前已有不少应用IFN、LMV序贯治疗慢乙肝可以提高疗效，减少YMDD变异和严重不良反应减少的报道. 当前多用的序贯治疗方案是首用LMV，如未发生耐药突变，则继续用药，如发生了，则更换为ADV，从而完成长达数年的长期治疗[53-54]. Entecavir能明显抑制HBV复制，且能改善肝功能和肝组织病变，国内已完成I、II期临床试验，准备启动III期临床试验，有望成为新的有效抗病毒药物[55].

2 免疫调节治疗

慢乙肝患者多有机体免疫调节障碍，多表现为$CD4^+$减少，$CD8^+$升高，二者比值降低，尤其免疫耐受问题使HBV不易被清除. 研究表明ALT水平高低是反应机体免疫状态的重要指标. 抗病毒治疗出现应答者多伴有ALT升高伴有免疫功能的恢复和增强，反之，免疫功能不够强，ALT水平不高，抗病毒疗效差[56-57]. 因此，免疫调节治疗有可能在抗病毒治疗中起着举足轻重的作用. 不少研究表明IFN或核苷类药物联用调免药物胸腺肽α1取得了较为良好疗效[41]. 但目前对免疫调节剂的应用还存在不少问题. 首先，目前虽然免疫调节剂如胸腺肽、胸腺肽α1、胸腺五肽、免疫核糖核酸、胎盘转移因子、左旋咪唑、卡介苗以及中草药制剂甘草酸、苦参素(氧化苦参碱)、猪苓多糖、云芝多糖等，有一定提高免疫作用，但除胸腺肽α1、胸腺五肽外，疗效均有限;其次，特异性免疫调节剂如各种治疗性疫苗，如S和前S2蛋白疫苗、特异性细胞毒性T淋巴细胞多肽疫苗、HBsAg抗HBs免疫复合物疫苗、HBV特异性核酸疫苗等是较为有希望的免疫调节剂，亟待深入研究.

3 加强肝纤维化临床治疗研究

肝纤维化是肝脏对慢性损伤的一种修复反应，是慢性肝病共有的病理改变，其特征性改变是肝内细胞外基质(ECM)的过多沉积. 研究表明慢性肝炎早期即有纤维组织增生，随着肝病加重，肝纤维化程度逐渐加重. 美国著名肝病学家Hans Popper教授提出“谁能阻止或延缓肝纤维化的发生，谁将治愈大多数慢性肝病”. 近10多年来，随肝纤维化发生机制的逐渐阐明，本病治疗成为可能[58-59]，但当前现代医学对之尚乏良好治疗药物. 近年来，中西医结合对基因调控、细胞凋亡、信号转导等研究的开展，极大地拓宽了肝纤维化的治疗途径. 新出现的技术如反义寡核苷酸、核酶、基因导入等显示出令人鼓舞的前景，但由于其靶向性和可调控性缺陷，用于体内还有较长一段时间摸索. 中药861合剂(含丹参、桃仁、冬虫夏草、当归)，一方面抑制肝星状细胞(HSC)合成ECM，又增加HSC表达基质金属蛋白酶(MMPs)，提高其降解活性，并能促进细胞凋亡. 我们以“淤血”立论重用丹参为主联用一组活血化瘀药组成的“益肝冲剂”- 及其新一代中药益肝康以及拆方小复方具有良好地抗肝纤维化作用，而且早期用药较晚期具有更好疗效[14, 60-67]. 但目前抗肝纤维化中药多为体外或动物实验研究，尚乏基于肝活检的病理组织学随机对照、盲法、多中心、足够病例的临床研究. 因之，面对本病中医药初步取得良好抗肝纤维化效果，迫切需要中西医结合根据循证医学原理，深入开展和加强肝纤维化的临床病理研究工作.

4 参考文献

1 斯崇文. 乙型肝炎抗病毒治疗策略的探讨. 中华内科杂志 2003;42:363-364

2 Maynard JE. Hepatitis B: global importance and need for control. *Vaccine* 1990;8(Suppl):S18-20

3 Beasley RP, Hwang LY, Lee GC, Lan CC, Roan CH, Huang FY, Chen CL. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet* 1983;2:1099-1102

4 Alberti A, Pontisso P, Fattovich G, Schiavon E, Chemello L, Bortolotti F, Tremolada F, Realdi G. Changes in serum hepatitis B virus (HBV) DNA positivity in chronic HBV infection: Results of a long-term follow-up study of 138 patients. *J Infect Dis* 1986;154:562-569

5 Bonino F, Hoyer B, Nelson J, Engle R, Verme G, Gerin J. Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: A marker of active hepatitis B virus replication in the liver. *Hepatology* 1981;1:386-391

6 Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 1983;3:656-662

7 Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Chen TJ. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology* 1988;8:493-496

8 Fattovich G, Brollo L, Giustina G, Noventa F, Pontisso P, Alberti A, Realdi G, Ruol A. Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. *Gut* 1991;32:294-298

9 Wands JR. Prevention of Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2004;351:1567-1570

10 Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556-562

11 Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990;12:671-675

12 Zoulim F. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: can we clear the virus and prevent drug resistance? *Antivir Chem Chemother* 2004;15:299-305

13 Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:761-785

14 Yao XX, Jiang SL, Yao DM. Current research of hepatic cirrhosis in china. *World J Gastroenterol* 2005;11:617-622

15 姚希贤, 南月敏. 干扰素治疗病毒性肝炎进展. 中国处方药 2003;6:52-56

16 Alexander GJ, Brahm J, Fagan EA, Smith HM, Daniels HM, Eddleston AL, Williams R. Loss of HBsAg with interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Lancet* 1987;2:66-69

17 Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1993;119:312-323

18 Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, Haussinger D. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1996;334:1422-1427

19 Lin SM, Sheen IS, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1999;29:971-975

20 Yuen MF, Hui CK, Cheng CC, Wu CH, Lai YP, Lai CL. Long-term follow-up of interferon alfa treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B infection:the effect on hepatitis B e antigen seroconversion and the development of cirrhosis-related complications. *Hepatology* 2001;34:139-145

21 van Zonneveld M, Honkoop P, Hansen BE, Niesters HG, Murad SD, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004;39:804-810
22 Amarapurkar DN, Patel ND. Combination of peginterferon alpha-2b(12 kDa) and lamivudine in difficult-to-treat chronic hepatitis B-an indian experience. *Ann Hepatol* 2005;4:56-59
23 Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P, Pluck N; Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Study Group. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004;351:1206-1217
24 Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, Chutaputti A, Chang WY, Zahm FE, Pluck N. Peginterferon α-2a (40 KDa): an advance in the treatment of hepatitis Be antigen-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2003;10:298-305
25 Liaw YF. Management of patients with chronic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:406-408
26 Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:61-68
27 Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Lamivudine as inial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999;341:1256-1263
28 Liaw YF, Leung NW, Chang TT. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;119:172-180
29 Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003;124:105-117
30 Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condreay LD, Chien RN; On behalf of the Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B eantigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001;33:1527-1532
31 Chien RN, Liaw YF, Atkins M. Pretherapy alanine transaminase level as a determinant for hepatitis B e antigen seroconversion during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. Asian Hepatitis Lamivudine Trial Group. *Hepatology* 1999;30:770-774
32 van Nunen AB, Hansen BE, Suh DJ, Lohr HF, Chemello L, Fontaine H, Heathcote J, Song BC, Janssen HL, de Man RA, Schalm SW. Durability of HBeAg seroconversion following antiviral therapy for chronic hepatitis B: relation to type of therapy and pretreatment serum hepatitis B virus DNA and alanine aminotransferase. *Gut* 2003;52:420-424
33 Chien RN, Liaw YF, Atkins M. Pretherapy alanine transaminase level as a determinant for hepatitis B e antigen seroconversion during lamivudine patients with chronic hepatitis B. Asian Hepatitis Lamivudine Trial Group. *Hepatology* 1999;30:770-774
34 Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GK, Merican I; Asian-Pacific Consensus Working Parties on Hepatitis B. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: an update. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:239-245
35 Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711-1716
36 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999;30:567-572
37 Liaw YF. Impact of YMDD mutations during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Chem Chemother* 2001;12(Suppl 1):67-71
38 Manesis EK, Hadziyannis SJ. Interferon α treatment and retreatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2001;121:101-109
39 Brunetto MR, Oliveri F, Coco B, Leandro G, Colombatto P, Gorin JM, Bonino F. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. *J Hepatol* 2002;36:280-282
40 Wu GX, Zha YS, Zheng J, Wang YZ, Zhou GP. Effect of interferon combined with lamivudine in treatment of chronic hepatitis B patients infected with HBV with mutation of YMDD. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003;11:752-753
41 Saruc M, Ozden N, Turkel N, Ayhan S, Hock LM, Tuzcuoglu I, Yuceyar H. Long-Term outcome of thymosin-alpha 1 and interferon alpha-2b combination therapy in patients with hepatitis B e antigen (HBeAg) negative chronic hepatitis B. *J Pharm Sci* 2003;92:1386-1395
42 Santantonio T, Mazzola M, Iacovazzi T, Miglietta A, Guastadisegni A, Pastore G. Long-term follow-up of patients with anti-HBe/HBV DNA-positive chronic hepatitis B treated for 12 months with lamivudine. *J Hepatol* 2000;32:300-306
43 Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, Hawley S, Barber J, Condreay L, Gray DF. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* 1999;29:889-896
44 Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C. Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis Be antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000;32:847-851
45 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348:800-807
46 Perrillo R, Hann HW, Mutimer D, Willems B, Leung N, Lee WM, Moorat A, Gardner S, Woessner M, Bourne E, Brosgart CL, Schiff E. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2004;126:81-90
47 van Bommel F, Wunsche T, Mauss S, Reinke P, Bergk A, Schurmann D, Wiedenmann B, Berg T. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004;40:1421-1425
48 Schalm SW, Heathcote J, Cianciara J, Farrell G, Sherman M, Willems B, Dhillon A, Moorat A, Barber J, Gray DF. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut* 2000;46:562-568
49 Barbaro G, Zechini F, Pellicelli AM, Francavilla R, Scotto G, Bacca D, Bruno M, Babudieri S, Annese M, Matarazzo F, Di Stefano G, Barbarini G; Lamivudine Italian Study Group Investigators. Long-term efficacy of interferon alpha-2b and lamivudine in combination compared to lamivudine monotherapy in patients with chronic hepatitis B: an Italian multicenter, randomized trial. *J Hepatol* 2001;35:406-411
50 Santantonio T, Niro GA, Sinisi E, Leandro G, Insalata M, Guastadisegni A, Facciorusso D, Gravinese E, Andriulli A, Pastore G. Lamivudine/interferon combination therapy in anti-HBe positive chronic hepatitis B patients: a controlled pilot study. *J Hepatol* 2002;36:799-804
51 Chan HL, Leung NW, Hui AY, Wong VW, Liew CT, Chim AM, Chan FK, Hung LC, Lee YT, Tam JS, Lam CW, Sung JJ. A randomized, controlled trial of combination therapy for chronic hepatitis B: comparing pegylated interferon-α2b and lamivudine with lamivudine alone. *Ann Intern Med* 2005;142:240-250

52 Perrillo R, Schiff E, Yoshida E, Statler A, Hirsch K, Wright T, Gutfreund K, Lamy P, Murray A. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology* 2000;32:129-134
53 Ying C, De Clercq E, Nicholson W, Furman P, Neyts J. Inhibition of the replication of the DNA polymerase M550V mutation variant of human hepatitis B virus by adefovir, tenofovir, L-FMAU, DAPD, penciclovir and lobucavir. *J Viral Hepat* 2000;7:161-165
54 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL; Adefovir Dipivoxil 437 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348:808-816
55 Lai CL, Rosmawati M, Lao J, Van Vlierberghe H, Anderson FH, Thomas N, Dehertogh D. Entecavir is superior to lamivudine in reducing hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 2002;123:1831-1838
56 Boni C, Bertoletti A, Penna A, Cavalli A, Pilli M, Urbani S, Scognamiglio P, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998;102:968-975
57 Marinos G, Naoumov NV, Williams R. Impact of complete inhibition of viral replication on the cellular immune response in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1996;24:991-995
58 Friedma SL. Liver fibrosis, from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38(Suppl 1):S38-53
59 姚希贤, 徐克成. 肝纤维化的基础与临床 上海: 上海科技教育出版社, 2003:85-98
60 Yao XX, Cui DL, Sun YF, Feng LY, Sun ZM, Song M. Study on the anti-liver fibrosis effect of benefit liver granule and its mechanism in rats. *Chin J Integr Med* 2002;8:118-121
61 姚希贤, 姚欣, 修贺明, 孙泽明, 宋梅, 冯丽英. “益肝浓缩煎剂”等活血化淤药抗大鼠肝纤维化作用实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2001;10:217-222
62 蒋树林, 李校天, 姚希贤. 益肝康对大鼠肝纤维化的防治作用. 中国全科医学 2002;5:525-527
63 姚希贤, 唐有为, 姚冬梅, 修贺明. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:263-267
64 姚欣, 姚希贤, 冯丽英, 修贺明, 唐有为. 益肝浓缩煎剂与强肝胶囊抗大鼠肝纤维化作用实验研究. 中西医结合肝病杂志 2002;12:246-348
65 房红梅, 姚东梅, 姚希贤, 王天铁. 益肝康的药物血清对大鼠HSCs增殖及PDGF基因表达的影响. 第三军医大学学报 2004;26:611-613
66 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan decoction on proliferation and apoptosis of liver stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514
67 蒋树林, 姚希贤, 孙泽明, 宋梅, 杨林, 杨川杰, 姚冬梅, 吕涛. 活血化淤中药对大鼠纤维化肝间质胶原的抑制作用. 中华实用医学 2002;4:10-13

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获我国期刊界的最高政府奖项－国家期刊奖百种重点期刊

本刊讯 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓，由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后，第二次获得此项殊荣.

第三届国家期刊奖颁奖大会于2005-02-28在北京举行. 中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关方面负责同志出席了颁奖大会. 新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向，促进期刊繁荣”的重要讲话. 国家期刊奖是经中共中央宣传部批准，由国家新闻出版总署于1999年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项，每两年评选一次，至今已举办了三届.

第三届国家期刊奖评选活动于2004-08开始. 所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后，由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选，于2004-12-21产生初评入围期刊名单，并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示，接受全社会的监督，最终从推荐参评的976种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊100种.

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国9000余种期刊的优秀代表，反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果.（世界胃肠病学杂志社 2005-03-10）

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1650-1651
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•述评 EDITORIAL•

胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭

丁连安, 黎介寿

丁连安, 黎介寿, 青岛大学医学院附属医院普通外科, 山东省青岛市 266003
丁连安, 男, 1958-3-17生, 山东省青岛市人, 汉族. 1984年原青岛医学院(现青岛大学医学院)本科毕业, 2003年南京大学博士毕业, 主要从事胃肠外科.
通讯作者: 丁连安, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院. dlahaolq@hotmail.com
电话: 0532-82911324 传真: 0532-82911840
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

摘要

胃肠道不仅具有消化吸收功能，还具有重要的屏障功能.后者包括四部分:机械屏障、生物屏障、免疫屏障、化学屏障.机体在遭受任何有害刺激作用下，都会对上述屏障产生影响，导致其发生改变;如超过了机体所能适应代偿的程度，胃肠道将会发生一系列的病理生理变化，出现胃肠道功能障碍和全身症状.严重者，将发生严重的肠功能障碍－肠衰竭.因此，“胃肠道是外科应激反应的一个中心器官”.

关键词: 胃肠道生理学; 肠衰竭; 肠屏障功能

丁连安, 黎介寿. 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭. 世界华人消化杂志 2005; 13(14):1650-1651
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1650.asp

0 引言

一般认为在疾病状态下，肠道是静止不动的，故胃肠道不象ICU患者的其他器官那样受到重视及保护.由于研究技术的发展和外科技术的进步，使得人们对胃肠道的代谢和营养以及解剖结构、生理功能等诸多方面有了新的认识，因此对胃肠道功能的深入研究和生理功能的重新认识，有着实际的临床意义.

1 胃肠道生理功能的新认识

1.1 胃肠道是人体四大菌库之首(其他为呼吸道、阴道、皮肤) 肠腔内菌群与肠黏膜上皮、机体总体状态处于动态平衡中.一般情况下，细菌每20 min分裂1次，但在肠道内的细菌每1 d仅分裂4-5次.一旦致伤因素打破这一平衡，将会导致肠菌群紊乱，就可能发生细菌易位，导致疾病.一般上消化道及空肠上部细菌数少于或等于10^3，被认为是无菌的[1-2].

1.2 不同肠段的吸收功能 上段小肠液(200 cm以内)稀释食靡，可达摄入容量的5-8倍.故上段空肠造瘘和高位小肠瘘可造成严重的水、电解质和营养的丢失.胃和十二指肠基本不吸收;空肠上段吸收碳水化合物、蛋白质和大多数水溶性维生素;脂肪则需要更长的一段小肠;小肠大部切除后，剩余小肠和结肠的结构和功能发生适应和代偿性变化[2].

1.3 胃肠道的免疫功能 现代研究表明胃肠道是机体最大的免疫器官，其主要组成为胃肠道相关样淋巴组织(gut associated lymphatic tissue，GALT)，约占人体总体液免疫的80%，细胞免疫的50%[3].

1.4 特殊的营养吸收机制 机体所有的组织器官均接受动脉血液供应的营养需求，唯独肠黏膜从血供接受的养分只占其总需求的30%，余70%直接从肠腔内摄取.这也就是为什么全肠外营养可以供给全身所有组织器官的需要，满足其组织代谢更新需求，但却导致肠黏膜萎缩.这也是长期静脉营养可引起肠屏障功能障碍，发生细菌易位的重要原因[4-6].

2 肠道的屏障功能

肠道是一个大的细菌库，含有10^{12}-10^{13}(兆)的细菌，每克粪便含细菌约10^{10}-10^{12}.如此庞大的天文数字量的细菌其产生的毒素也是巨大的，但肠道却有选择的只吸收机体所需要的养分和物质，不发生疾病，依靠的就是肠黏膜的屏障功能.一般说来，肠黏膜屏障由3部分组成:机械屏障，生物屏障和免疫屏障.任何因素导致此屏障组成破坏，均可发生细菌及内毒素易位(BT)[4, 7].

健康机体肠腔内的细菌与肠黏膜和整个机体之间构成了一个微生态平衡(婴儿出生后数日肠道菌群即达到正常定植).三者任何一个环节的改变将破坏这一平衡，即造成疾病状态，如整体健康状况的损害(表现为免疫屏障的损害)、肠黏膜结构的破坏(表现为机械屏障的损伤)和肠腔内细菌过度生长(表现为生物屏障的破坏).另外，胃酸及胃肠道所有消化液以及其他黏膜上皮分泌的生物活性物质也参入了肠黏膜屏障的组成，有人称之为化学屏障[4, 8-9].

3 胃肠道是机体应激反应的一个中心器官

3.1 临床现象 (1)重危患者无论其原发病因是否感染，在其整个病程过程中，均可能出现感染，而且感染的细菌大都为肠道正常菌丛;(2)白血病、骨髓移植和严重烧伤患者尽管置于无菌隔离病房，仍然有很高的感染率，其细菌培养表明感染菌种基本是肠道

居留菌;(3)上述患者给予静脉应用抗生素或SDD(Selected digestive decontmamination，选择性消化道去污染)疗法可显著降低感染的发生率;(4)过度应用广谱抗生素可导致“二重感染”[4, 10-12].

3.2 *动物实验* (1)小肠和结肠细胞增生快，覆盖面积广，故能量需求高，代谢快[9];(2)免疫学研究发现肠道存在大量黏膜内淋巴细胞、Peyer小结、分泌性IgA、淋巴滤泡和系膜淋巴结等(统称为GALT)，在受到应激刺激时，会发生剧烈地免疫反应[3];(3)大量实验研究发现肠黏膜上皮吞噬细菌和细菌越过上皮进入其他组织(即细菌易位-BT)的现象，说明了肠黏膜屏障的客观存在[4, 13];(4)给予同样肠外营养的动物，切除肠道的动物较之未切除者，对创伤和打击耐受性强、存活时间长、感染率低[14];(5)无菌动物对应激刺激耐受较普通动物好，感染发生率低[14].

4 肠功能障碍

肠衰竭这一术语于1980年由Irving定义为:当肠道吸收功能减退，需要补充营养素和/或水及电介质以维持机体健康和生长的需要时，即存在肠衰竭.此时如不给予治疗或代偿机制未奏效，就会发生营养不良和/或脱水.但从当代对肠功能的认识，肠衰竭一词显然不能包含肠道的功能，以功能障碍替代衰竭较更合理，正如以MODS代换MOF.

4.1 *以往文献中对肠衰竭作如下分期* (1)急性肠衰竭:为可逆性(6 mo内)且具有外科性病因(如肠瘘，肠梗阻)和内科性病因(由于化疗或急性放射性损害引起的肠炎，或包括HIV在内的感染性肠炎);(2)慢性肠衰竭，可由下列疾病引起:胃肠道切除(如短肠综合征或胃切除术)、肠捷径术(如治疗肥胖的手术)或小肠功能不良(假性肠梗阻或慢性肠炎如克罗恩病、放射性，微绒毛萎缩或自身免疫性肠病)，全胃或部分胃切除患者残留肠道功能经常发生紊乱而需要补充营养者也属肠功能衰竭范畴.

这一分期仅以消化吸收功能而言.不能涵盖肠道的其他功能，尤其是肠屏障功能.Marshall曾提出胃肠功能复杂，难以评分.

4.2 *国内补充意见* 仅有消化吸收功能的障碍尚不足以代表胃肠道功能不良或障碍，而应考虑到肠黏膜屏障功能障碍.完整的肠功能障碍概念应涵盖消化吸收功能与肠屏障功能.

5 常见的肠功能障碍性疾病

5.1 *急性* (1)炎性肠病、克罗恩病和溃疡性结肠炎发作期，尤其合并外科并发症者;(2)溃疡病;(3)胰腺炎;(4)肠系膜血管性疾病;(5)恶性肿瘤;(6)肠外瘘;(7)化疗和造血干细胞移植;(8)AIDS病;(9)其他如急性肠梗阻、胃瘫、肠道严重的急性感染和腹部外伤等.

5.2 *慢性* (1)假性肠梗阻;(2)放射性肠炎;(3)胃手术后;(4)短肠综合征;(5)治疗肥胖性手术后;(6)其他如严重的各种原因引起的便秘等.

肠功能障碍概念的提出，得益于危重病医学、感染免疫学及临床营养支持等学科的发展和研究，得益于现代外科技术的发展和新的研究技术手段的应用.是临床医学尤其是胃肠道疾病理论的一大进展，对于我们胃肠外科乃至所有专业的临床医生，充分认识到疾病状态下胃肠道的重要作用，在疾病治疗过程中不要忽视胃肠道屏障功能的保护，都有着实际的指导意义.

6 参考文献

1 Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984;86:174-193

2 Klein S, Alpers DH, Grand RJ, Levin MS, Lin HC, Mansbach CM, Burant C, Reeds P, Rombeau JL. Advances in nutrition and gastroenterology: summary of the 1997 A. S. P. E. N. research workshop. *J Parenter Enteral Nutr* 1998;22:3-13

3 Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci P, Kvale D, Rognum TO, Scott H, Sollid LM. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1989;97:1562-1584

4 MacFie J. Enteral versus parenteral nutrition: the signigicance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition* 2000;16:606-611

5 Sugiura T, Tashiro T, Yamamori H, Takagi K, Hayashi N, Itabashi T, Toyoda Y, Sano W, Nitta H, Hirano J, Nakajima N, Ito I. Effects of total parenteral nutrition on endotoxin translocation and extent of the stress response in burned rats. *Nutrition* 1999;15:570-575

6 van der Hulst RR, von Meyenfeldt MF, van Kreel BK, Thunnissen FB, Brummer RJ, Arends JW, Soeters PB. Gut permeability, intestinal morphology, and nutritional depletion. *Nutrition* 1998;14:1-6

7 Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20:411-417

8 黎介寿. 加强对肠屏障功能障碍的研究. 中华医学杂志 1999;79:581

9 MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999;45:223-228

10 Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Ziegler TR, Wang XD. The gut: A central organ after surgical stress. *Surgery* 1988;104:917-923

11 Yu P, Martin CM. Increased gut permeability and bacterial translocation in pseudomonas pneumonia-induced sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:2573-2577

12 Naaber P, Smidt I, Tamme K, Liigant A, Tapfer H, Mikelsaar M, Talvik R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. *Med Microbiol* 2000;49:431-439

13 Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 1995;3:149-154

14 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29:189-201

编辑 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1652-1657
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 胃癌 GASTRIC CANCER •

AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响

黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众

黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 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
黄彩云, 女, 1979-02-26生, 福建省漳州市人, 汉族. 2003年福建医科大学硕士生, 主要从事胃肠道肿瘤的研究.
福建省教育厅基金项目, No. JA03094
通讯作者: 陈丰霖, 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.
电话: 0591-83357896-8482
收稿日期: 2005-04-11 接受日期: 2005-05-14

Expression of 12-lipoxygenase and its inhibitor's effect on proliferation of human AGS cell line

Cai-Yun Huang, Feng-Lin Chen, Jian-Ying Li, Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang

Cai-Yun Huang, Feng-Lin Chen, Jian-Ying Li, Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Supported by the Fund from Education Commision of Fujian Province, China, No. JA03094
Correspondence to: Feng-Lin Chen, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China.
Received: 2005-04-11 Accepted: 2005-05-14

Abstract

AIM: To investigate the expression of 12-lipoxygenase (12-LOX) and the possible effect of its inhibitor on proliferation of human gastric cancer cell line AGS.

METHODS: AGS cells were cultured in RPMI-1640 medium with 100 mL/L fetal bovine serum (FBS), 100 kU/L penicillin and 100 kU/L streptomycin. 12-LOX mRNA was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The effect of baicalein on the proliferation of the cells was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) method. The morphological changes of cellular and subcellullar structures were observed under inverted microscope and electron microscopy. AO-EB double and TUNEL staining were used to evaluate the apoptotic index of AGS cells.

RESULTS: 12-LOX mRNA was expressed in human AGS cells. At concentrations from 20 to 80 μmol/L, baicalein inhibited the proliferation of AGS cells in a concentration- and time-dependent manner from 24 to 72 hours. There were significant differences between any other groups (P<0.01) except 40 μmol/L group at 24 h and 48 h. The maximum survival rate of the cells was 82.1% and the minimum one was 38.4%. Morphological changes such as chromatin condensatio, apoptotic bodies were observed after treated with baicalein, and some cells become round and suspended. Significant apoptosis was also induced by baicalein, and the apoptotic indexes detected by AO-EB staining showed marked differences between any other groups (P<0.01) except in 0 μmol/L group. The apoptotic index detected by TUNEL staining showed marked difference between 80 and 0 μmol/L at 48 h (38.37±0.36% *vs* 7.27 ± 0.21%, P<0.01).

CONCLUSION: 12-LOX mRNA is expressed in AGS cell line. Baicalein not only promotes proliferation, but also induces apoptosis of human gastric cancer cells *in vitro*.

Key Words: 12-lipoxygenase; Baicalein; Gastric cancer; Proliferation; Apoptosis; Reverse transcription polymerase chain reaction

Huang CY, Chen FL, Li JY, Chen ZX, Wang XZ. Expression of 12-lipoxygenase and its inhibitor's effect on proliferation of human AGS cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1652-1657

摘要

目的: 探讨人胃癌细胞系AGS中12-脂肪氧化酶(12-lipoxygenase，12-LOX)的表达情况及其抑制剂黄芩甙元(baicalein)对AGS细胞增殖的影响.

方法: AGS在含100 mL/L小牛血清+100 kU/L青、链霉素的RPMI1640培养基中常规培养.用RT-PCR检测12-LOX在AGS中的表达情况，分别以20，40，80 μmol/L baicalein干预细胞，用四氮唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide，MTT)法在24，48，72 h测量细胞吸光度，检测baicalein对细胞增殖的影响;用倒置显微镜和电子显微镜进行形态观察;通过脱氧核糖核酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)和吖啶橙-溴化乙锭(AO-EB)染色法检测细胞凋亡指数.

结果: AGS细胞中存在12-LOXmRNA表达;MTT显示baicalein大致呈时间、剂量依赖性抑制细胞增殖(各组间P<0.01，除外40 μmol/L 24 h组与48 h组);AGS细胞存活率最高为82.1%，最低为38.4%.倒置显微镜下可见baicalein干预后的细胞皱缩，部分细胞胞体变圆，脱离贴壁状态，成为悬浮细胞;电镜下可见baicalein干预后的细胞出现了凋亡的特征性改变:核染色质边集及凋亡

小体形成; AO-EB 染色法显示除 0 μmol/L 组不同时间点细胞凋亡指数无显著差异外(P>0.05)，其余各干预组细胞凋亡指数均有显著差异(P<0.01); TUNEL染色法显示 48 h 时，baicalein 80 μmol/L 细胞调亡指数为 38.37 ± 0.36% 而 0 μmol/L 组细胞调亡指数为 7.27 ± 0.21%，两组间存在显著差异 (P<0.01).

结论: 人胃癌细胞AGS 中存在 12-LOXmRNA 表达，其特异性抑制剂baicalein能抑制AGS细胞增殖并促进其凋亡.

关键词: 12- 脂肪氧化酶; 黄芩甙元; 胃癌; 增殖; 凋亡; 逆转录聚合酶链反应

黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众. AGS 细胞系中 12-LOX 的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1652.asp

0 引言

12-LOX 是脂肪氧化酶家族(Lipoxygenases:5，8，12，15-LOX)中的成员之一[1-4]，他是催化花生四烯酸(arachidonic acid，AA)转化为 12- 羟基廿碳四烯酸(12-hydroxyeicosatetraenoic acid，12-HETE)的关键酶[5]，其与肿瘤的关系已成为近年来的研究热点. 尽管 12-LOX 已被证实在多种肿瘤组织及细胞系中表达[6-10]，但其在胃癌细胞系 AGS 中的表达情况及其确切作用却少有报道. baicalein是从中草药黄芪中提取的一种具有抗炎、抗氧化和抗癌活性的黄酮类化合物，作为12-LOX的特异性抑制剂，他在体和离体实验均显示有较强的抑制生长和诱导凋亡的作用[11-16]. 我们用 RT-PCR 检测 12-LOX mRNA 在 AGS 中的表达情况，应用 12-LOX 的特异性抑制剂baicalein对体外培养的AGS细胞进行干预，分别采用 MTT、电镜、AO-EB 和 TUNEL 对 AGS 细胞增殖与凋亡进行研究，试图探讨 12-LOX 的特异性抑制剂 baicalein 对胃癌 AGS 细胞增殖与凋亡的影响.

1 材料和方法

1.1 *材料* 人胃癌细胞系 AGS(中分化胃腺癌细胞系)购自中国科学院上海细胞生物研究所，baicalein 购自 Alexis Biochemicals公司，四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Fluka 公司，RPMI1640 购自 Gibco 公司，胰蛋白酶购自 Sigma 公司，小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司，TUNEL 试剂购自北京中山公司，RT-PCR 体系购自深圳晶美公司，RNA提取试剂(RNA isolation kit)购自 Gentra Systems Inc，其余试剂均为国产生化试剂.

1.2 *方法* AGS 细胞在含 100 mL/L 小牛血清＋100 Uk/L 青、链霉素的 RPMI1640 培养基中，于 37℃，50 mL/L CO_2 培养箱中常规培养. 收集未经药物干预的 AGS 细胞 2×10^6，PBS 洗涤 2 遍后，按 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA，测其 A_{260} 为 0.1 880(A_{260}/A_{280} = 1.8 970)，取 RNA 样品 4 μg，42℃，60 min，95℃，5 min 合成 cDNA，12-LOX 基因上游引物:5’-CTTCCCGTGCTACCGCTG-3’，下游引物:5’-TGGGGTTGGCACCATTGAG-3，337 bp;内参 β-actin 基因上游引物:5’-CTATTGGCAACGAGCGGTTC-3’，下游引物:5’-CTTAGGAGTGGGGGTGGCTT-3’，776 bp. 取 RT 反应产物 2.0 μL 进行 PCR 扩增(反应体系 25 μL)，扩增条件:94℃，5 min;94℃，45 s;50℃，30 s;72℃，60 s;35 个循环;72℃，7 min. PCR 产物 10 μL 在 17 g/L 琼脂糖凝胶上(含 0.5 g/L 溴化乙锭)进行电泳分离，在紫外光下自显影，经计算机扫描成像. 取对数生长期的 AGS 细胞，经 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后，以 3×10^4/ 孔接种于 6 孔培养板中，常规培养 24 h 后，换成无血清的 RPMI1640 培养液同步化 24 h 后进行分组，即: 对照组(含等体积无水乙醇)，baicalein(baicalein 溶于无水乙醇中，用含 10 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 稀释至 baicalein 终浓度，使乙醇浓度<1 mL/L)20 μmol/L 组、40 μmol/L 组、80 μmol/L 组，加试剂后继续培养 72 h，分别于加试剂后 24，48 和 72 h 取各浓度实验组和对照组细胞，倒置显微镜下观察细胞形态. 所有实验均独立重复 3 遍. 取未干预细胞和经 80 μmol/L baicalein 干预 48 h 的细胞经 30 g/L 戊二醛-15 g/L 多聚甲醛前固定 2 d(4℃)，10 g/L 锇酸-15 g/L 亚铁氰化钾后固定 1.5 h，PBS 漂洗;700 mL/L 乙醇饱和醋酸铀块染，乙醇-丙酮梯度脱水，环氧树脂 618 包埋，超薄切片 80 nm，醋酸铀、柠檬酸铅染色各 5 min;在日立 Hu-12A 型透射电镜下观察、摄影.

1.2.1 *MTT 法检测 AGS 增殖情况* 以 5×10^3/ 孔接种 AGS 细胞于 96 孔培养板中，药物干预同前，于加试剂后的 24，48 和 72 h 每组各取 7 孔用 0.01 mol/L PBS 冲洗两遍后加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μL，37℃ 孵育 4 h，吸去孔内培养液，每孔加入 DMSO 溶液 150 μL 于振荡器上振荡 10 min，以空白孔调零，在酶联免疫检测仪上测 490 nm 波长每孔的吸光度值(absorbance)，求其平均值. 细胞存活率 = (实验组吸光度值/对照组吸光度值)×100%(假定加药时细胞的存活率为 100%，此时记为 0 h).

1.2.2 *AGS 凋亡情况的检测* TUNEL 染色法按 TUNEL 试剂盒的产品说明书，以PBS代替TdT溶液作阴性对照，DNAase Ⅰ处理的切片作阳性对照，具体步骤如下:制备好的含有细胞的盖玻片干燥后加40 g/L多聚甲醛 50 μL 于室温固定 1 h，PBS 漂洗 3×5 min;加 3 mL/L 过氧化氢甲醇溶液 50 μL 于室温孵育 30 min，PBS 漂洗 3×5 min;加 50 μL 含 1 g/L TritonX-100 的枸橼酸钠溶液 4℃通透 3 min，PBS 漂洗 3×5 min;

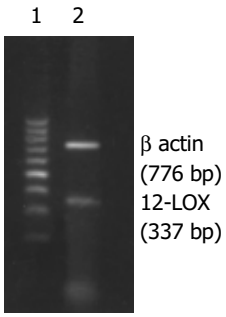


图1 12-LOX 基因电泳图(约 337 bp 阳性扩增带).

加50 μL TUNEL反应液于37℃湿盒中孵育1 h，PBS漂洗3×5 min;加50 μL Converter-POD于37℃湿盒中孵育30 min，PBS漂洗3×5 min;加50 μL DAB底物显色液室温孵育10 min，双蒸水洗涤10 min，苏木素复染10 s，中性树胶封片，光镜下观察、计数并拍照，每片计数500个细胞，计算细胞凋亡指数(即每100个细胞中TUNEL阳性细胞所占的百分比).

AO-EB双染色法 细胞培养于培养瓶中，药物干预同前，于规定时间分别取各浓度干预细胞和未干预细胞，常规胰蛋白酶消化并制成单个细胞悬液，取细胞悬液90 μL，加AO染液(acridine orange，AO，100 mg/L溶于PBS)和EB染液(ethidium bromide，EB，100 mg/L溶于PBS)各5 μL，用前混合，盖玻片封片后立即于490 nm蓝色荧光下观察、计数并拍照.每片计数500个细胞，计算细胞凋亡指数，凋亡指数 =(早期凋亡细胞＋晚期凋亡细胞)/总细胞数×100%.

统计学处理 数据以平均数±标准差(mean±SD)表示，采用SPSS10.0 for windows软件包进行分析，均数间两两比较用方差分析，率间比较用χ^2检验.

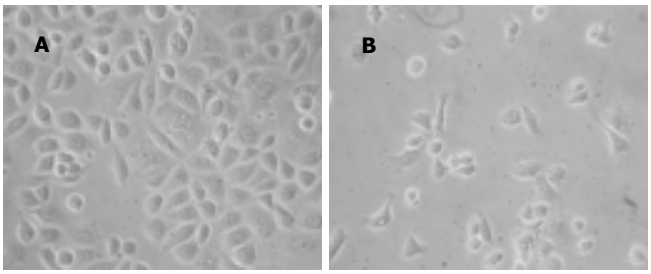


图2 AGS细胞倒置显微镜图像×200. A: 未经baicalein干预的AGS细胞; B: 经80 μmol/L baicalein干预48 h的AGS细胞.

2 结果

AGS细胞RT-PCR产物经电泳分析，可见1条约776 bp的内参β-actin基因扩增带和1条约337 bp的12-LOX基因扩增带(图1).倒置显微镜下干预组细胞皱缩，部分细胞肿胀明显，细胞质内可见泡状结构，部分细胞细胞体变圆，脱离贴壁状态，成为悬浮细胞，baicalein对AGS细胞形态变化的影响与时间和剂量有关，随着时间的延长，药物浓度的加大，正常形态细胞数明显减少，异常形态细胞数逐渐增多(图2B);未干预组细胞则呈多边形贴壁生长，悬浮细胞很少(图2A).透射电镜下未经baicalein干预的细胞表面存在丰富的微绒毛，胞膜完整，各细胞器形态结构无异常改变，核染色质分布均匀(图3A);经baicalein干预的细胞表面微绒毛减少甚至消失，胞膜完整，细胞皱缩，核染色质固缩，边集于核膜下，部分凋亡细胞可见核碎裂及凋亡小体形成(图3B-D).

2.1 baicalein干预后AGS细胞的生长情况 不同浓度baicalein在72 h内大致呈时间、剂量依赖性抑制AGS增殖(除40 μmol/L 48 h组与24 h组P = 0.122

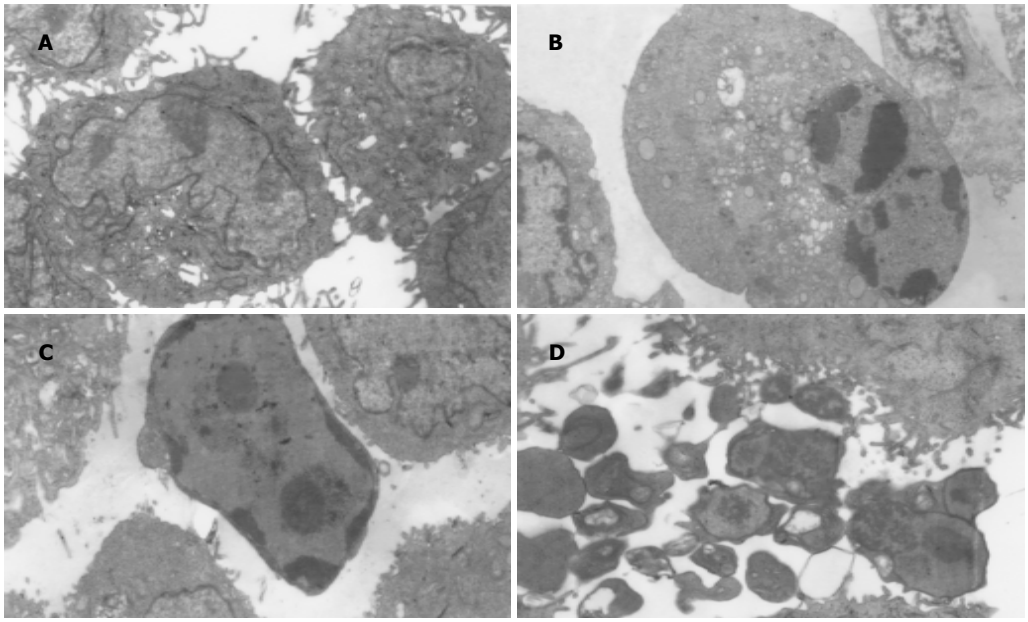


图3 AGS细胞电镜图像. A: 未经baicalein干预的AGS细胞(×6000); B: 80 μmol/L baicalein干预48 h的典型凋亡细胞(×4800); C: 含核的凋亡小体(×6000); D: 典型凋亡小体形成(×7000).

外，其余各组间两两比较 $P<0.01$)，细胞存活率呈下降趋势，baicalein 干预 72 h，AGS 细胞存活率最高为 82.1%，最低为 38.4%(图 4).

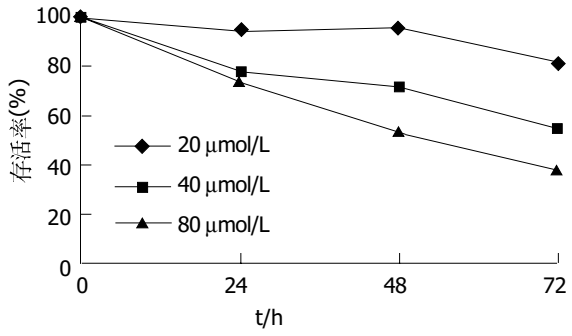


图 4 baicalein 干预后胃癌细胞 AGS 的存活率(MTT 法).

2.2 baicalein 干预后 AGS 细胞的凋亡指数 AO-EB 双染色法:正常活细胞核染色质被 AO 染成均匀一致的绿色或黄绿色,核染色质结构正常(图6A或图6B中1所示);早期凋亡细胞核染色质也被AO染成绿色或黄绿色,但染色不均匀，荧光增强，核染色质呈固缩状或圆株状(图 6B 中 2 所示);晚期凋亡细胞核染色质被EB染成橙色呈固缩状或圆株状(图 6B 中 3 所示);死细胞核染色质也被EB染成橙色或红色,但细胞核染色质结构尚正常(图 6B 中 4 所示). 同一时间点不同浓度的细胞凋亡指数均显著高于对照组($P<0.01$)(图5A);实验组48 h 细胞凋亡指数比 24 h 明显增多($P<0.01$)，但 72 h 细胞凋亡指数却比 48 h 明显减少($P<0.01$)，而对照组 3 个时间点细胞凋亡指数均无显著差异($P>0.05$)(图 5B),各实验组中以80 μmol/L组作用48 h引起AGS 凋亡的作用最明显，baicalein 诱导 AGS 细胞凋亡呈现剂量依赖性. 经 TUNEL 染色与苏木素复染后，80 μmol/L baicalein干预48 h的AGS非凋亡细胞，细胞核染成蓝色，但细胞大小不一，形态各异;凋亡细胞皱缩，细胞核染成棕色(图 7B);对照组凋亡细胞少见(图7A),细胞大小一致,在不同视野下进行细胞计数，测得其凋亡指数为 7.27 ± 0.21%(n = 3)，而干预组AGS细胞凋亡指数明显高于未干预组，凋亡指数为 38.37 ± 0.36%(n = 3)，二者之间有显著性差异($P<0.01$).

3 讨论

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤，其机制迄今未明，但胃黏膜上皮细胞增殖过度及凋亡受抑是胃癌发生发展的重要原因. 随着对胃癌发病机制研究的进一步深入，花生四烯酸代谢与胃癌的关系已越来越受到人们的关注. 花生四烯酸代谢至少有两条途径，即:环氧化酶途径和脂肪氧化酶途径. 其中环氧化酶代谢途径在胃癌的发生发展中起重要作用已有大量文献报道[17-20]，而脂肪氧化酶代谢途径与胃癌形成的关系国内外报道较少，尤其是 12-LOX 与胃癌的研究更是罕见报道. 在本次研究中我们发现，12-LOX参与了胃癌细胞AGS增殖与凋亡之间的调控. 12-LOX有 3 个亚型，即:白细胞型、表皮型和血小板型[21]，其中，

图 5 baicalein 干预后胃癌细胞 AGS 的凋亡指数(AO-EB 法). A: 时间效应 t/h; B: 浓度效应 c/(μmol/L).

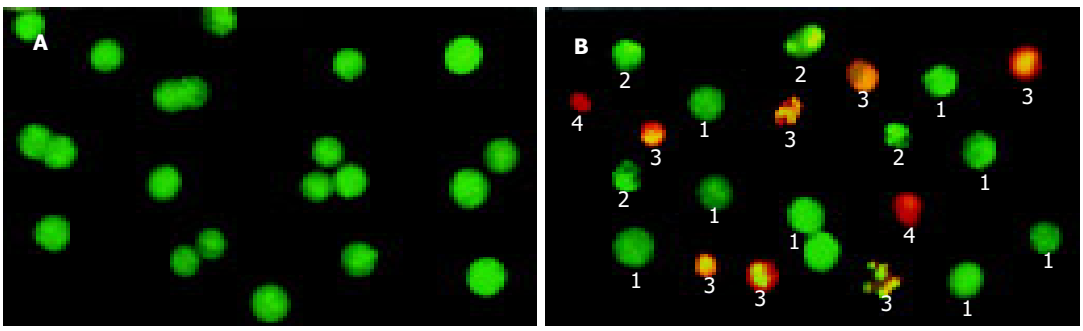


图 6 AGS 细胞 AO-EB 染色 × 400. A: 未经baicalein 干预组; B: 80 μmol/L baicalein 干预 48 h 组.

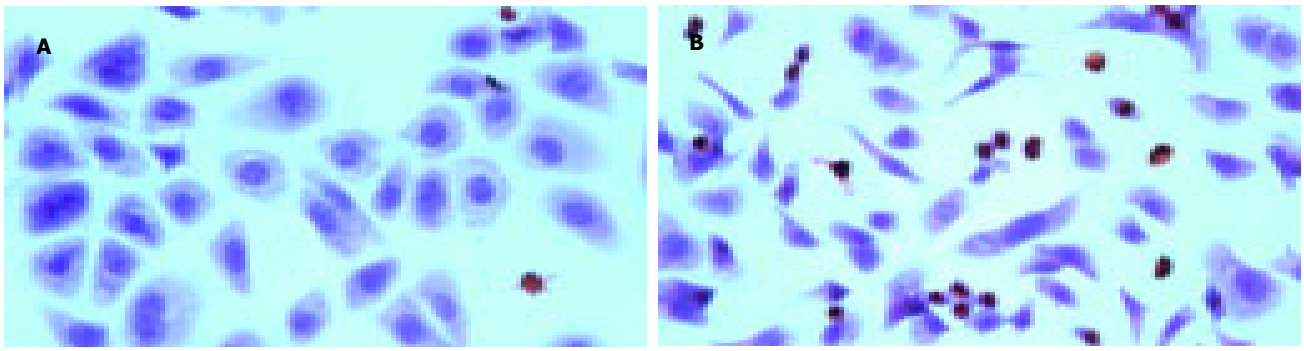


图7 AGS细胞TUNEL染色×400. A: 未经baicalein干预组; B: 经80 μmol/L baicalein干预组.

血小板型12-LOX及其代谢产物12-HETE被认为具有刺激肿瘤细胞生长与增殖，提高肿瘤细胞侵袭能力及诱导肿瘤血管形成等作用，而这些作用又均可被12-LOX特异性抑制剂baicalein所抑制[22-25]. Baicalein作为12-LOX的特异性抑制剂，其作用机制仍在探讨中，但目前比较一致的观点认为baicalein是通过阻断细胞周期，启动线粒体凋亡途径而发挥其生物学作用的[13, 26-29]. 12-LOX在正常组织中低表达或不表达，在肿瘤组织中却过度表达[8, 10]，因此，12-LOX过度表达可能是其促进肿瘤发生发展的原因之一.

我们在体外培养AGS细胞的基础上，使用RT-PCR技术从mRNA水平证实了12-LOX在胃癌细胞系AGS中存在表达. 实验还从细胞水平证明了baicalein可能具有抑制AGS增殖和促进AGS凋亡的作用. 在研究baicalein对AGS增殖的影响中，我们发现，baicalein大致呈时间、剂量依赖性的抑制AGS细胞增殖，这点与文献[30]报道一致，但baicalein只有达到较高浓度并且作用足够的时间方能起到显著抑制作用，与文献[30]报道的低浓度作用较短时间即可起到显著抑制作用略有不同; 在研究baicalein对AGS凋亡的影响中，倒置显微镜下可见baicalein干预后，细胞形态发生了显著变化，透射电镜下可以见到典型的凋亡细胞. TUNEL结果显示，实验组细胞的凋亡指数与对照组存在显著性差异，在用AO-EB双染色法计算细胞凋亡指数时我们发现，细胞凋亡指数与药物浓度成正比，但和时间却没有明显的线性关系，细胞的凋亡指数至72 h反而呈现下降趋势，这可能与72 h细胞死亡率相应增加有关，此现象提示，baicalein抑制细胞生长除与诱导凋亡有关可能还存在其他机制，因为在实验中我们还发现，随着时间的推移，实验组的死亡细胞数也随之增加，尤以药物作用72 h最为明显，而此现象在对照组却不明显. 总之，胃癌细胞AGS中存在12-LOXmRNA表达，且12-LOX还参与了胃癌细胞AGS增殖与凋亡的调控，12-LOX具有促进胃癌细胞增殖并抑制其凋亡的作用，至于12-LOX是如何促进胃癌细胞增殖并抑制其凋亡，其机制有待进一步探索.

致谢: 福建医科大学电镜室.

4 参考文献

1 Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989;259:315-324
2 Shimizu T, Wolfe LS. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 1990;55:1-15
3 Kuhn H, Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 1999;449:7-11
4 Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999;274:23679-23682
5 Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:3400-3404
6 Yoshimura R, Inoue K, Kawahito Y, Mitsuhashi M, Tsuchida K, Matsuyama M, Sano H, Nakatani T. Expression of 12-lipoxygenase in human renal cell carcinoma and growth prevention by its inhibitor. *Int J Mol Med* 2004;13:41-46
7 Yoshimura R, Matsuyama M, Tsuchida K, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Expression of lipoxygenase in human bladder carcinoma and growth inhibition by its inhibitors. *J Urol* 2003;170:1994-1999
8 Yoshimura R, Matsuyama M, Mitsuhashi M, Takemoto Y, Tsuchida K, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Relationship between lipoxygenase and human testicular cancer. *Int J Mol Med* 2004;13:389-393
9 Jiang WG, Douglas-Jones A, Mansel RE. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:275-281
10 Matsuyama M, Yoshimura R, Mitsuhashi M, Hase T, Tsuchida K, Takemoto Y, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Expression of lipoxygenase in human prostate cancer and growth reduction by its inhibitors. *Int J Oncol* 2004;24:821-827
11 Ikemoto S, Sugimura K, Kuratukuri K, Nakatani T. Antitumor effects of lipoxygenase inhibitors on murine bladder cancer cell line (MBT-2). *Anticancer Res* 2004;24:733-736
12 Chang WH, Chen CH, Gau RJ, Lin CC, Tsai CL, Tsai K, Lu FJ. Effect of baicalein on apoptosis of the human HepG2 cell line was induced by mitochondrial dysfunction. *Planta Med* 2002;68:302-306
13 Pidgeon GP, Kandouz M, Meram A, Honn KV. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:2721-2727
14 Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:942-948
15 Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, Yasumoto R, Wada S,

Yamamoto K, Kishimoto T. Antitumor effects of Scutellariae radix and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology* 2000;55:951-955
16 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002;1:929-935
17 Fan XM, Zheng FS, Liu HY, Ma YH, Wong B. Mechanism of apoptosis induced by specific COX-2 inhibitor SC236 in gastric cancer cells. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005;27:145-147
18 Wu CY, Wang CJ, Tseng CC, Chen HP, Wu MS, Lin JT, Inoue H, Chen GH. *Helicobacter pylori* promote gastric cancer cells invasion through a NF-kappa B and COX-2-mediated pathway. *World J Gastroenterol* 2005;11:3197-3203
19 Fu YG, Sung JJ, Wu KC, Wu HP, Yu J, Chan M, Chan VY, Chan KK, Fan DM, Leung WK. Inhibition of gastric cancer-associated angiogenesis by antisense COX-2 transfectants. *Cancer Lett* 2005;224:243-252
20 Chen XL, Su BS, Sun RQ, Zhang J, Wang YL. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:1228-1231
21 Yamamoto S, Suzuki H, Ueda N. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 1997;36:23-41
22 Pidgeon GP, Tang K, Cai YL, Piasentin E, Honn KV. Overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase promotes tumor cell survival by enhancing alpha (v) beta (3) and alpha (v) beta (5) integrin expression. *Cancer Res* 2003;63:4258-4267
23 Nie D, Nemeth J, Qiao Y, Zacharek A, Li L, Hanna K, Tang K, Hillman GG, Cher ML, Grignon DJ, Honn KV. Increased metastatic potential in human prostate carcinoma cells by overexpression of arachidonate 12-lipoxygenase. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:657-663
24 Nie D, Hillman GG, Geddes T, Tang K, Pierson C, Grignon DJ, Honn KV. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 1998;58:4047-4051
25 Timar J, Raso E, Dome B, Li L, Grignon D, Nie D, Honn KV, Hagmann W. Expression, subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential. *Int J Cancer* 2000;87:37-43
26 Lee HZ, Leung HW, Lai MY, Wu CH. Baicalein induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Anticancer Res* 2005;25:959-964
27 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002;1:929-935
28 Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:942-948
29 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002;1:929-935
30 Wong BC, Wang WP, Cho CH, Fan XM, Lin MC, Kung HF, Lam SK. 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2001;22:1349-1354

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006 年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

本刊讯 世界华人消化杂志主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的新进展及原创性等基础或临床研究的文章.

据中国科技期刊引证报告（潘云涛，马峥著. 北京：科学技术文献出版社，2004：1-289）统计，世界华人消化杂志 2003 年发表文章 594 篇，地区分布 25 个，机构分布 191 个，基金论文比 31%，总被引频次 5249 次，影响因子 2.924，即年指标 0.529，引用期刊数 260 种，被引半衰期 3.06. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标，并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊.

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》 (戴龙基，蔡蓉华主编. 北京：北京大学出版社，2004：1-678)，采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标，选作评价指标统计源的数据库有 51 种，统计到的文献数量共计 9435301 篇次，涉及期刊 39893 种次. 参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位. 经过定量筛选和专家定性评审，从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊. 世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览.

世界华人消化杂志发表的英文摘要被美国《化学文摘（Chemical Abstracts）》，荷兰《医学文摘库/医学文摘（EMBASE/Excerpta Medica）》，俄罗斯《文摘杂志（Abstracts Journals）》收录.

世界华人消化杂志 2006 年由北京报刊发行局发行，国内统一刊号 CN 14 1260/R，邮发代号 82-262, 出版日期 8, 18, 28 日, 页码 160, 月价 72.00. （世界胃肠病学杂志社 2005-06-29）

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1658-1662
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•肝癌 LIVER CANCER•

Maxizyme 对肝癌突变抑癌基因 p53 的抑制作用

李 岩, 林菊生, 孔心涓

李岩, 林菊生, 孔心涓, 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
李岩, 女, 1981-12-25 生, 河南省驻马店人, 汉族, 华中科技大学同济医学院硕士生, 研究方向分子肝脏病学.
国家自然科学基金资助项目, No. 30171061
通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2001@163.com
电话: 027-83662578
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

Inhibitory effect of maxizyme on mutant-type p53 in hepatocellular carcinoma

Yan Li, Ju-Sheng Lin, Xin-Juan Kong

Yan Li, Ju-Sheng Lin, Xin-Juan Kong, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30171061
Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. linjusheng2001@163.com
Received: 2005-04-04 Accepted: 2005-04-09

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of maxizyme on the mutant-type p53 (mtp53) gene at codon 249 in exon 7 (AGG→AGT) in cell-free system, hepatocellular carcinoma (HCC) cell line MHCC97, and nude mice bearing human HCC, and to explore a new method for gene therapy of HCC.

METHODS: Anti-mtp53 and control mutant maxizyme were designed and then cloned into the vector pBSKU6 and pEGFPC1, respectively. The ^{32}p-labeled mtp53 transcript was the target mRNA. Cold maxizyme transcript was incubated with ^{32}p-labeled target RNA in cell-free system. The products were quantified by measuring the radioautographed count per minute (cpm) in 1 μL solution. The MHCC97 cells were the target cells which contained a mutation at the third-base position of codon 249 of the p53 gene(AGG→AGT). PEGFPMz (recombinant eukaryotic vector) was transfected into MHCC97 cells by LipofectamineTM2000. The expression of mtp53 was analyzed by Northern Blot and Western Blot. The nude mice bearing human liver cancer were prepared and divided into blank control pEGFP and pEGFPMz group. The growth curve of the tumor in mice and the survival rate of mice were observed. The expression of mtp53 mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (PT-PCR).

RESULTS: The established pEGFPMz had the correct structure. Maxizyme had a specific cleavage activity for mtp53 with a cleavage efficiency of 49% extracellularly, while the wild type p53 was not cleaved. The control maxizyme had no significant effect on both mutant and wile type p53. After pEGFPMz were transfected into MHCC97 cells, the expression of mtp53 mRNA and protein in pEGFPMz group were 65% and 67% respectively, which were significantly lower than those in blank control and pEGFP group (P<0.05). The tumor size decreased and mtp53 mRNA was down-regulated in mice treated with pEGFPMz as compared with those in mice of blank control and pEGFP group (mtp53 mRNA: 0.95±0.13 *vs* 1.44 ± 0.14, 1.47 ± 0.12; P<0.05), and also the survivals of the mice in pEGFPMz were improved.

CONCLUSION: Maxizyme can effectively inhibit the expression of mtp53 mRNA and protein as well as the growth of hepatocellular carcinoma cells.

Key Words: Maxizyme; Mutant type p53; Hepatocellular carcinoma

Li Y, Lin JS, Kong XJ. Inhibitory effect of maxizyme on mutant-type p53 in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005; 13(14):1658-1662

摘要

目的: 通过 Maxizyme 胞外、胞内及整体水平对肝癌突变抑癌基因 p53 的抑制作用，为肝癌的基因治疗探索一条新途径.

方法: 应用计算机设计针对人肝癌突变抑癌基因 p53 (mtp53)249 位密码子的 Maxizyme(Mz)和对照大酶 asMz，应用分子克隆技术构建核酶的细胞外转录载体和真核表达载体.应用 RiboMAXTM large Scale RNA production systems 胞外转录出核酶和靶基因，进行细胞外切割反应,检测大酶对 mtp53 的切割作用，同时检测对野生型 p53(wtp53)是否具有切割作用.在脂质体 LipofectamineTM2000的介导下稳定转染含有突变型p53，且突变位点在 249 位密码子的人肝癌细胞 MHCC97,应用Northern Blot,Western Blot等方法检测大酶在细胞内的表达及对肝癌细胞 mtp53 的抑制作用.建立人肝癌裸

鼠皮下移植瘤模型，将荷瘤裸鼠随机分为空白对照组、空载体组和基因治疗组.观察肿瘤生长情况并记录动物死亡时间，绘制肿瘤生长曲线和生存期图.RT-PCR检测mtp53mRNA表达水平的变化.

结果: 成功构建核酶基因并将其正确克隆入细胞外转录载体pBSKU6和真核载体pEGFPC1中.Mz在细胞外具有良好的切割靶基因mtp53活性，切割效率为49%，而对野生型p53无切割作用，asMz对突变型p53及野生型p53均无明显切割作用.在脂质体LipofectAMINETM2000的介导下成功转染肝癌细胞MHCC97,嵌于U6表达系统中的Mz在细胞内高效表达.Northern Blot检测证实pEGFPMz组mtp53的mRNA水平明显下调，Mz在细胞内的切割效率为65%.Western Blot结果提示基因治疗组mtp53的蛋白表达明显下降，切割效率为67%.动物试验证实Mz可减慢裸鼠肿瘤生长速度,Mz治疗组荷瘤鼠生存期明显延长.PT-PCR检测到Mz治疗组裸鼠肿瘤组织mtp53的mRNA水平明显下调(mtp53 mRNA: 0.95 ± 0.13 *vs* 1.44 ± 0.14, 1.47 ± 0.12; $P<0.05$).

结论: Mz可有效切割mtp53，抑制其mRNA和蛋白质的表达，有效抑制肝癌细胞的生长.

关键词: Maxizyme; 突变型p53; 肝细胞癌

李岩, 林菊生, 孔心涓. Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1658-1662
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1658.asp

0 引言

p53基因是人类恶性肿瘤中发生变异频率最高的抑癌基因.其异常表达和很多肿瘤的发生发展密切相关[1-6].突变是p53失活的主要形式，肝癌中p53的突变率高达60%，且突变热点集中在249位密码子(AGG-AGT)[7-10].突变型p53具有癌基因特性且稳定性增高，降低肿瘤对放化疗药物的敏感性.Maxizyme是由锤头状核酶(Hammerhead ribozyme)演变而来的，Maxizyme的发现弥补了锤头状核酶对切割位点的限制.我们应用计算机设计了针对突变型p53的Maxizyme，构建其体外转录载体和真核表达载体，检测其在胞外、胞内和整体水平对mtp53的抑制作用，为肝癌的基因治疗提供了一条新途径.

1 材料和方法

1.1 材料 含wtp53和mtp53基因全长的质粒pCMV-neo-BAM载体由美国Huward Hughs Medical Institude的Bert Vogelstein教授惠赠，pBSKU6和pEGFPC1载体由上海中国科学院生物化学研究所金由辛研究员惠赠，人肝癌细胞系MHCC97购自复旦大学医学院肝癌研究所，Balb/c裸鼠购自华中科技大学同济医院器官移植研究所，大肠杆菌DH5α本室保存，小剂量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司，各种限制性内切酶、DNA连接酶、DL2000 Marker、PCR试剂、PT-PCR kit均为日本Takara公司产品，pGEM-T vector，X-gal，IPTG，Trizol试剂和RiboMAX TM large Scale RNA production systems为美国Promega公司产品，Lipofectamine TM2000 Reagent为Invitrogen公司产品，胎牛血清为Hyclone公司产品，DMEM培养基为Gibco公司产品.

1.2 方法 应用中国科学院上海生物化学研究所陈农安教授编写的软件设计Mz的基因片断.Mz由两个单体组成Mz right(MzR)与Mz left(MzL)，序列如下:MzL: 5’CTAGAGAGGATGGCTGATGAGCGAAAGGTATGG3’;5’GATCCCAGACCTTTGGCTCATCAGCCATCCTCT3’.MzR:5’CTAGAAGTTTCCACTGATGAGCGAAACTCCGGG3’;5’GATCCCCGGAGTTTCGCTCATCAGTGGAAACTT3’.同时设计突变的Mz(asMz，G5→A5)以排除反义序列互补作用.Mz的两边设计*Xba* Ⅰ和*Bam*H Ⅰ酶切位点，便于克隆操作，用中国科学院生物化学研究所美国产Beckman Oligo 1000 M DNA/RNA自动合成仪合成.应用分子克隆技术构建出体外转录载体pBSKU6Mz和真核表达载体pEGFPMz，DNA测序仪分析所合成的序列，酶切鉴定.应用PCR技术从质粒pCMV-neo-BAM中扩增出野生型(wild type p53，wtp53)和mtp53片断(1 002 nt)，PCR产物纯化回收后，与pGEM-T载体连接，经DNA测序证实，分别命名为pwtp53和pmtp53.PCR上游引物:5’GATTCTCTTCCTCTGTGC3’，下游引物:5’CTTTCCACGACGGTGACA3’.pwtp53和pmtp53经Sac Ⅰ线形化，Mz经Sma Ⅰ线形化，体外转录，纯化，放射自显影.[α-^{32}P]dUTP标记的大酶、对照大酶和靶RNA水溶液各取1 μL，测每分钟计数(cpm).按同位素的比放及底物和Mz中U的含量进行定量，切割率(CE)通过底物(S)与产物(P)放射性条带的放射强度(cpm)求得:CE = [P/(S+P)]× 100%.人MHCC97肝癌细胞株培养在含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中，置37℃，50 mL/L的CO_2培养箱，待细胞长至对数生长期，按每孔4 × 10^4接种至24孔细胞培养板上，G418筛选(200 mg/L)，应用Invitrogen公司的Lipofect amine TM 2000转染试剂盒进行转染，按操作说明书进行.筛选15 d后，挑选单克隆细胞扩大培养.

1.2.1 Western blot分析p53蛋白表达水平 分别收集转染pEGFPMz、空载体pEGFP和未转染任何质粒的肝癌细胞MHCC97(1 × 10^7个)，收集被无盐裂解液裂解的细胞裂解物，常规制胶，每样品15 μL，Marker上样15 μL，1 × SDS电泳缓冲液，恒压200 V，40 min.用转移缓冲液平衡凝胶和醋酸纤维素滤膜PVDF 30 min，

4℃湿度电转仪30 mA转移过夜.PVDF膜浸泡在50 g/L脱脂奶粉TBS溶液中，室温封闭30 min，洗涤液中洗涤30 min，加入10 mL 10 g/L脱脂奶粉(含0.5 g/L Tween20)，加入5 μL一抗(抗p53抗体)，室温摇动1 h，然后20 mL 10 g/L脱脂奶粉洗4次，将PVDF膜与辣根过氧化物酶标记的第二抗体共同温浴60 min.将膜放至等体积配置的检测试剂中孵育1 min，Saran包装膜包裹，X光片曝光并显像.将膜用PBS洗涤两次，然后用 β-actin抗体进行检测，方法同上.

1.2.2 Northern blot分析mtp53 mRNA的表达 应用Promega公司的探针标记试剂盒Prime-a-Gene Labeling System，将p53PCR和β-actinPCR片断进行探针同位素标记.DNA片断沸水2 min，速至冰上.Labeling 5×buffer 1 μL，Mixture of unlabeled dNTPs 1 μL，DNA template 5 ng，Nuclease-free BSA 1 μL，[α-^{32}P]dATP 1 μL(3 000 Ci/mmol)，Klenow fragment 1 μL(5 U)，总体积10 μL混匀，室温60 min，95℃ 2 min，溶于EDTA，终浓度20 mmol/L.收集转染pEGFPMz、空载体pEGFP和未转染任何质粒的肝癌细胞MHCC97(1×10^7个)，Trizol试剂盒提细胞内总RNA.样品制备:RNA(20 μg，5.5 μL)，10×MOPS 1 μL，甲醛3.5 μL，甲酰胺10 μL，总体积20 μL，65℃，温育15 min，冰浴冷却.电泳，印迹转移过夜，封闭非特异性结合位点后，65℃杂交过夜，X片曝光.

1.2.3 动物试验4-5周龄Balb/c-nu裸鼠24只，雌雄各半，体重13.5±1.5 g.收获处于对数生长期的MHCC97细胞，按每只裸鼠1×10^7个(0.2 mL)接种于其颈背部皮下，16 d左右均出现瘤结节，成瘤率100%.待肿瘤长径达0.4±0.05 cm时，随机分为3组，每组8只.1组为生理盐水对照组，瘤体内多点注射150 μL生理盐水;2组为pEGFP对照组，瘤体内多点注射50 μg空质粒载体(50 μg pEGFP+30 μL Lipofectamine TM 2 000+120 μL无血清培养基);3组为pEGFPMz治疗组，瘤体内多点注射50 μg pEGFPMz(50 μg pEGFPMz+30 μL Lipofect amine TM 2 000+120 μL无血清培养基).隔天注射1次，共注射5次.每两天用游标卡尺(精确到0.02 mm)测肿瘤体积(V = AxB^2/2，A为肿瘤最长径，B为肿瘤最短径)，观察并记录动物死亡时间，当有裸鼠死亡时，将其取瘤称重.50 d后将未死亡动物全部处死，取瘤称重，绘制裸鼠皮下移植瘤平均生长曲线，Kaplan-Meier方法进行生存期分析.取0.1 cm^{3}肿瘤组织做PT-PCR检测，具体如下:p53引物序列同上，β-actin mRNA作为内部参照物，引物序列:上游引物:5'CTCGCTCTCGCTCTTTTTT 3';下游引物:5' GCGGTGGTGGCGCGTCGCGCCGCT 3'.RT反应:总RNA 2 μg，5×buffer 6 μL，dNTPmixture (10 mmol/L)1 μL，RNase inhibitor(40 MU/L) 1 μL，Oligo dT primer(20 μmol/L)1 μL，M-MLV (200 MU/L)1 μL，3 d H2O 10 μL，总体积为20 μL，混匀，42℃逆转录1 h，95℃灭活5 min.取上述反应产物5 μL，5×PCR buffer 10 μL，dNTPmixture (10 mmol/L)8 μL，引物各5 μL，Taq 1 μL，56 μL 3 d H_2O，总体积为100 μL，94℃变性30 s，54℃退火30 s，72℃ 1 min，31个循环，72℃ 10 min.反应结束后，取产物8 μL，10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析结果，应用凝胶成像分析系统，分析每个条带(lanes)的定积分值和所占的百分比，并和β-actin比较，计算核酶的切割效率.

统计学处理 以上检测试验均重复3次.采用SPSS10.0统计学分析软件，采用Kaplan-Meier法进行分析并绘制生存曲线.$P<0.05$具有统计学意义.

2 结果

2.1 用*Sma* Ⅰ和*Sac* Ⅰ双酶切载体pEGFPMz，10 g/L琼脂糖鉴定应有920 bp的片段，与设计完全一致.细胞外切割反应显示pEGFPMz对pmt53切割条带为874 nt和128 nt，pwt53未被切割，体外切割效率为49%，pEGFPasMz对pmt53及pwt53均未见明显切割条带，和预期结果一致.说明我们设计的大酶对突变型p53具有特异性的高效切割作用.Western blot分析结果提示，转染pEGFP-Mz肝癌细胞MHCC97的p53(53 kDa)蛋白表达下降明显，为67%.而转染空质粒组和空白对照组的mtp53的蛋白表达没有明显变化($P<0.05$)，提示Mz能够特异性切割靶基因mtp53，促进p53蛋白表达水平下降(图1).

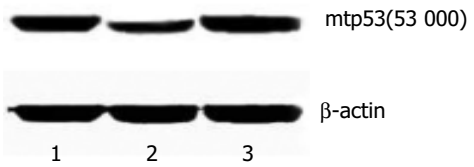


图1 Western blot分析p53和β-actin蛋白在肝癌细胞MHCC97中的表达. 1: MHCC97细胞转染空载体pEGFP(1.0 μg); 2: MHCC97细胞转染pEGFPMz(1.0 μg); 3: 空白对照组MHCC97细胞.

2.2 Northern blot分析mtp53 mRNA的表达 β-actin条带的亮度一致，表明总RNA的量是一致的.转染pEGFP-Mz的肝癌细胞MHCC97的p53 mRNA下降明显，为65%，而转染pEGFP和空白对照的细胞无下降($P<0.05$)，证实Mz能够使mtp53 mRNA表达水平下降，对靶基因mtp53具有特异性地切割作用(图2).

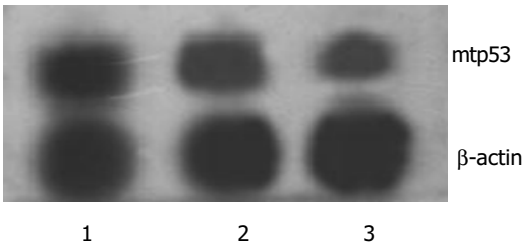


图 2 Northern blot 分析 MHCC97 细胞中 mtp53 mRNA 的表达. 1: 转染空载体 pEGFP; 2: 转染 pEGFPasMz; 3: 转染 pEGFPMz.

2.3 动物试验 RT-PCR 检测图像分析仪扫描 mtp53 和 β-actin 条带的灰度，计算出 pEGFP-Mz 组 mtp53/β-actin 为 0.95 ± 0.13，pEGFP 组为 1.47 ± 0.12，空白对照组为 1.44 ± 0.14. pEGFP-Mz 组 mtp53 表达明显减弱，与转染空载体组及空白对照组比较 mtp53 的水平有显著性差异($P<0.05$). 而转染空载体组及空白对照组比较 mtp53 的水平无明显差异($P>0.05$，图 3). 皮下移植瘤平均生长曲线显示 Mz 基因治疗组生长速度明显较空白对照组和空载体组减慢，SAS 软件进行 t 检验，证实差异有显著性意义($P<0.05$). 而空载体组和空白对照组肿瘤生长速度无明显差异($P>0.05$). 实验结果提示 Mz 具有显著抑制裸鼠移植瘤生长的作用(图 4). 应用 SPSS10.0 统计学分析软件，采用 Kaplan-Meier 法进行荷瘤裸鼠生存期的分析，绘制图表，显示基因治疗组裸鼠与空载体组和空白对照组相比，具有明显延长裸鼠生存期的作用($P<0.05$). 而裸鼠生存期在空载体组和空白对照组中无显著差异($P>0.05$，图 5).

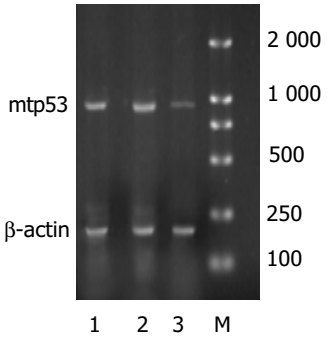


图 3 PT-PCR 分析肿瘤组织中 mtp53 mRNA 的表达. 1: 转染空载体 pEGFP 组; 2: 空白对照组; 3: 转染 pEGFPMz 组 M: DL2000marker.

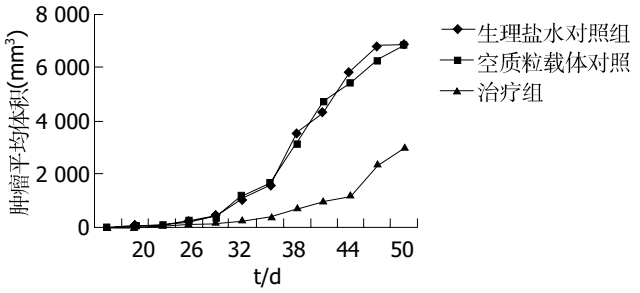


图 4 裸鼠皮下肿瘤生长曲线.

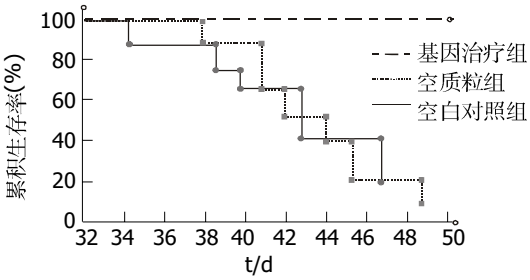


图 5 荷瘤裸鼠的生存期.

3 讨论

现代医学认为，肿瘤是多种基因突变引起的复合基因病(complex genetic disease)，旨在封闭突变基因表达或抑制其功能的基因疗法成为近年肿瘤研究领域的热点. 而核酶(Ribozyme)是其中极富挑战性的课题，核酶是一类具有催化作用的 RNA 分子，又称催化 RNA(catalytic RNA)[11-15]，和反义寡核苷酸相比，核酶用于基因治疗有很大的优势，被称为“分子剪刀”和“分子外科”，在抗 HIV、抗病毒、治疗白血病、抗多药耐药(multidrug resistance，MDR)及肿瘤方面得到广泛的研究[16-19]. 锤头状核酶(Hammerhead ribozyme，Rz)因其结构简单、易于设计而得到广泛的应用[20-25]. 用短链核苷酸替代茎Ⅱ即变短的核酶仍保持一定的切割活性称为 minizyme[26-28]. Minizyme 可以形成二聚体结构，形成二聚体后切割活性明显增强，此二聚体命名为 Maxizyme[29-31]. Maxizyme 的发现弥补了锤头状核酶对切割位点严格限制的不足. 自 Maxizyme 发现以来主要用于嵌合基因或突变基因所致疾病的治疗，例如导致慢性粒细胞性白血病(CML)的融合基因 BCR-ABL，显示出良好的应用前景.

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma，HCC)的发生存在着多种病因与多种机制，这些因素在 HCC 的发生中起着协同作用，但无论何种原因，HCC 的发生均与癌基因的激活和(或)抑癌基因的失活有关. 在肝癌发生发展中抑癌基因的突变占有重要地位. 抑癌基因中研究最多的是 p53 基因，p53 基因定位于 17 号染色体短臂. 野生性 p53(wild type p53，wtp53)基因监视着基因组的完整性，有利于细胞启动修复机制，可诱导细胞凋亡，抑制肿瘤的形成. p53 突变导致与 DNA 结合力改变，使 p53 依赖性反式激活作用下降. 突变型 p53(mutant type p53，mtp53)基因具有癌基因特性且稳定性增高，导致细胞转化和过度增生，同时降低肿瘤对化疗药物的敏感性. 肝癌中 p53 的突变率达 60%，且突变多发生于 249 位密码子(G:T 颠换). 针对抑癌基因 p53 的突变，国内外研究主要是借助基因转移技术恢复或添加肿瘤细胞中失活的 p53，从而对肿瘤产生一定的治疗作用或抑制肿瘤转移. 但这种

方法不能调节抑癌基因的表达水平，亦不能减少突变基因的表达，限制了临床应用的前景.本实验应用新的基因阻断技术-maxizyme，设计了针对肝癌突变抑癌基因p53的maxizyme，可在249位密码子处切断mtp53mRNA，从而阻断其表达，对mtp53具有抑制作用.实验结果表明我们设计的maxizyme不仅在细胞外对突变型p53具有特异性的高效切割作用，而且在细胞内同样能够特异性切割靶基因mtp53，促进p53蛋白表达水平(Western blot)和mRNA水平(Northern blot)下降.在整体水平上，maxizyme也可明显抑制裸鼠移植瘤的生长，延长荷瘤裸鼠生存期.本实验证实了我们设计的maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53在胞外、胞内和整体水平的显著抑制作用，为肝癌的治疗提供了一条新的途径.

4 参考文献

1 Liang Y, Wu J, Stancel GM, Hyder SM. p53-dependent inhibition of progestin-induced VEGF expression in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;93:173-182

2 Du CH, Xu J, Zhong NS. Roles of mutant p53 gene in malignant phenotypes and resistance to drugs in anti-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide benzo(a)pyrene-induced lung cancer cells. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi* 2005;28:176-179

3 Hu W, Kavanagh JJ, Deaver M, Johnston DA. Frequent overexpression of STK15/Aurora-A/BTAK and chromosomal instability in tumorigenic cell cultures derived from human ovarian cancer. *Oncol Res* 2005;15:49-57

4 Flores ER, Sengupta S, Miller JB. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 2005;7:363-373

5 Yao R, Wang Y, D'Agostini F, Izzotti A. K-ras mutations in lung tumors from p53 mutant mice exposed to cigarette smoke. *Exp Lung Res* 2005;31:271-281

6 Kim EL, Yoshizato K, Kluwe L, Meissner H. Comparative assessment of the functional p53 status in glioma cells. *Anticancer Res* 2005;25:213-224

7 Lee YI, Han YJ, Lee SY, Lee YI. Activation of insulin-like growth factor II signaling by mutant type p53: physiological implications for potentiation of IGF-II signaling by p53 mutant 249. *Mol Cell Endocrinol* 2003;203:51-63

8 Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat* 2003;21:201-216

9 Jin Y, Abe K, Sato Y, Aita K, Irie H, Shiga J. Hepatitis B and C virus infection and p53 mutations in human hepatocellular carcinoma in Harbin, Heilongjiang Province, China. *Hepatol Res* 2002;24:379-384

10 Qian GS, Kuang SY, He X, Groopman JD. Sensitivity of electrospray ionization mass spectrometry detection of codon 249 mutations in the p53 gene compared with RFLP. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1126-1129

11 Hayashidani Y, Hiyama E, Murakami Y, Sueda T. Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozymes targeting human telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase in pancreatic carcinoma cells. *Hiroshima J Med Sci* 2005;54:21-27

12 Callison SA, Hilt DA, Jackwood MW. In vitro analysis of a hammerhead ribozyme targeted to infectious bronchitis virus nucleocapsid mRNA. *Avian Dis* 2005;49:159-163

13 Willkomm DK, Minnerup J, Huttenhofer A, Hartmann RK. Experimental RNomics in Aquifex aeolicus: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1949-1960

14 Pljevaljcic G, Klostermeier D, Millar DP. The tertiary structure of the hairpin ribozyme is formed through a slow conformational search. *Biochemistry* 2005;44:4870-4876

15 Pasquali S, Gan HH, Schlick T. Modular RNA architecture revealed by computational analysis of existing pseudoknots and ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1384-1398

16 Trang P, Kilani A, Lee J, Hsu A, Liou K, Kim J, Nassi A, Kim K, Liu F. RNase P ribozymes for the studies and treatment of human cytomegalovirus infections. *J Clin Virol* 2002;2:63

17 Xu RH, Lin J, Zhou XQ, Xie Q, Jin YX, Yu H, Liao D. Activity identification of anti-caspase-3 mRNA hammerhead ribozyme in both cell-free condition and BRL-3A cells. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:606-611

18 Bergeron LJ, Perreault JP. Development and comparison of procedures for the selection of delta ribozyme cleavage sites within the hepatitis B virus. *Nucleic Acids Res* 2002;30:4682-4691

19 Chang Z, Westaway S, Li S, Zaia J, Rossi J, Scherer L. Enhanced Expression and HIV-1 Inhibition of Chimeric tRNA (Lys3)-Ribozymes under Dual U6 snRNA and tRNA Promoters. *Mol Ther* 2002;6:481

20 Okunaga T, Abe Y, Tsuchide T, Hatanaka H, Oshika Y, Tomisawa M, Yoshimura M, Ohnishi Y, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Nakamura M. Ribozyme mediated cleavage of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor inhibits liver metastasis of a pancreatic cancer cell line. *Int J Oncol* 2002;21:1027-1032

21 Huesker M, Folmer Y, Schneider M, Fulda C, Blum HE, Hafkemeyer P. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-MDR1 ribozymes. *Hepatology* 2002;36:874-884

22 Wang CH, Tsai LJ, Tsao YP, Hsieh JH, Chien WW, Liao CL, Wang HW, Liu HS, Chen SL. Recombinant adenovirus encoding H-ras ribozyme induces apoptosis in laryngeal cancer cells through caspase-and mitochondria-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:805-814

23 Banerjea A, Li MJ, Remling L, Rossi J, Akkina R. Lentiviral transduction of Tar Decoy and CCR5 ribozyme into CD34+ progenitor cells and derivation of HIV-1 resistant T cells and macrophages. *AIDS Res Ther* 2004;1:2

24 Nahreini P, Hanson AJ, Andreatta CP, Koustas WT, Prasad KN. Altering cellular signaling pathways enhance gene silencing activity of shRNA, shRNA. ribozyme, and shRNA. antisense in neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:781-792

25 Goila R, Banerjea AC. Sequence-specific cleavage of hepatitis X RNA in cis and trans by novel monotarget and multitarget hammerhead motif-containing ribozymes. *Oligonucleotides* 2004;14:249-262

26 Tan TM, Zhou L, Houssais S, Seet BL, Jaenicke S, Peter F, Lim SG. Intracellular inhibition of hepatitis B virus S gene expression by chimeric DNA-RNA phosphorothioate minimized ribozyme. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;12:257-264

27 McCall MJ, Hendry P, Mir AA, Conaty J, Brown G, Lockett TJ. Small, efficient hammerhead ribozymes. *Mol Biotechnol* 2000;14:5-17

28 Kuwabara T, Warashina M, Orita M, Koseki S, Ohkawa J, Taira K. Formation of a catalytically active dimer by tRNA (Val)-driven short ribozymes. *Nat Biotechnol* 1998;16:961-965

29 Soda Y, Tani K, Bai Y, Saiki M. A novel maxizyme vector targeting a bcr-abl fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;104:356-363

30 Iyo M, Kawasaki H, Taira K. Maxizyme technology. *Methods Mol Biol* 2004;252:257-265

31 Oshima K, Kawasaki H, Soda Y, Tani K, Asano S, Taira K. Maxizymes and small hairpin-type RNAs that are driven by a tRNA promoter specifically cleave a chimeric gene associated with leukemia in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003;63:6809-6814

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1663-1666
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

肝癌组织中 TGF-β1、TGF-β1R Ⅱ和 NF-κB 的表达

缪 林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘 政, 张 平, 杨 春

缪林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春, 南京医科大学第二附属医院消化科 江苏省南京市 210011
张锁林, 江苏省丹阳市人民医院消化科 江苏省丹阳市 212300
缪林, 男, 1966-04-22 生, 1989 年南京医科大学, 医学硕士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤和消化内镜基础与临床研究.
江苏省教育厅自然科学基金资助, No. 02KJD320023
通讯作者: 缪林, 210011, 江苏省南京市, 南京医科大学第二附属医院消化科. miaofrest@yahoo.com.cn
电话: 025-83062836
收稿日期: 2005-04-11 接受日期: 2005-04-27

Expression of TGF-β1, TGF-β1RII and NF-κB in hepatocellular carcinoma

Lin Miao, Suo-Lin Zhang, Guo-Zhong Ji, Zhi-Ning Fan, Zheng Liu, Ping Zhang, Chun Yang

Lin Miao, Guo-Zhong Ji, Zhi-Ning Fan, Zheng Liu, Ping Zhang, Chun Yang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China
Suo-Lin Zhang, Department of Gastroenterology, Danyang People's Hospital, Zhenjiang 212300, Jiangsu Province, China
Supported by Natural Science Foundation the Department of Education of Jiangsu Province, No.02KJD320023
Correspondence to: Lin Miao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. miaofrest@yahoo.com.cn
Received: 2005-04-11 Accepted: 2005-04-27

Abstract

AIM: To explore the expression of TGF-β1, TGF-β1RII and NF-κB in hepatocellular carcinoma (HCC) tiussues.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of TGF-β1, TGF-βRII and NF-κB protein in 30 HCC and the corresponding cancer-adjacent tissues. The expression of TGF-β1 mRNA was determined in 30 HCC and the corresponding cancer-adjacent tissues by *in situ* hybridization. Vascular endothelial cells were labeled with CD34 to observe the microvessel density (MVD). Then the relationships between TGF-β1 protein and MVD, TGF-β1RII protein and MVD, NF-κB and TGF-β1 protein as well as between TGF-β1 protein and mRNA were analyzed.

RESULTS: The expression of TGF-β1 protein and mRNA in HCC tissues were significantly higher than those in the cancer-adjacent tissues (Mean optical density: 0.0 725±0.0 102 *vs* 0.0 442±0.0 103, $P<0.01$; 0.1 043±0.0 350 *vs* 0.0 620±0.0 225, $P<0.01$). The MVD in HCC tissues was also markedly higher than that in the cancer-adjacent tissues (31.23±9.25 *vs* 4.24±2.10, $P<0.01$). The level of NF-κB expression was significantly higher than that in the cancer-adjacent tissues (0.0 723±0.0 210 *vs* 0.0 305 ± 0.0 116, $P<0.01$), while the level of TGF-βRII was lower (0.0 402±0.0 113 *vs* 0.0 669±0.0 157, $P<0.01$). Obviously positive relationships existed between TGF-β1 protein and MVD ($t = 3.25$, $P<0.01$), TGF-β1 mRNA and TGF-β1 protein ($\chi^2 = 8.21$, $P<0.01$) as well as between NF-κB and TGF-β1 protein ($\chi^2 = 9.075$, $P<0.01$), but the expression of TGF-β RIIprotein was negatively related to MVD.

CONCLUSION: TGF-β1, TGF-β1RII and NF-κB protein is abnormally expressed in HCC tissues and they are significantly related to MVD. They may play important roles in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma. NF-κB may mediate the activation and production of TGF-β1.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; TGF-β1; TGF-β1RII; NF-κB

Miao L, Zhang SL, Ji GZ, Fan ZN, Liu Z, Zhang P, Yang C. Expression of TGF-β1, TGF-β1RII and NF-κB in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1663-1666

摘要

目的: 探讨转化生长因子 β1(TGF-β1)、转化生长因子 β1 Ⅱ型受体(TGF-β1R Ⅱ)、核转录因子 -κB(NF-κB)在肝细胞癌(HCC)中表达.

方法: 在 30 例肝癌组织和癌旁肝组织中，用免疫组化技术，分别检测 TGF-β1 TGF-β1R Ⅱ及 NF-κB 蛋白的表达;用原位杂交方法检测 TGF-β1mRNA 的表达，以CD34标记血管内皮细胞，观察TGF-β1及TGF-β1R Ⅱ蛋白与微血管密度(MVD)、TGF-β1 蛋白与 TGF-β1mRNA、NF-κB 与 TGF-β1 的关系.

结果: 肝癌组织TGF-β1mRNA平均光密度明显高于癌旁组织(0.1 043 ± 0.035 *vs* 0.0 620 ± 0.0 225, $P<0.01$)、TGF-β1 蛋白平均光密度表达明显高于癌旁组织(0.0 725 ± 0.0 102 *vs* 0.0 442 ± 0.0 103, $P<0.01$);肝癌组织TGF-β1R Ⅱ蛋白平均光密度表达明显低于癌旁组织(0.0 402 ± 0.0 113 *vs* 0.0 669 ± 0.0 157, $P<0.01$);肝癌组织 NF-κB 蛋白表达均明显高于癌旁组织(0.0 723 ± 0.0 210 *vs* 0.0 305 ± 0.0 116, $P<0.01$), 肝癌组织 MVD 明显高于癌旁组织(31.23 ± 9.25 *vs* 4.24 ± 2.10, $P<0.01$), 肝癌组织TGF-β1蛋白阳性表达与MVD呈正相关($t = 3.25$, $P<0.01$);TGF-β1 mRNA与TGF-β1

蛋白呈正相关($\chi^2 = 8.21$, $P<0.01$);NF-κB蛋白阳性表达与TGF-β1蛋白阳性表达呈正相关($\chi^2 = 9.075$, $P<0.01$);而TGF-βR Ⅱ蛋白与MVD呈负相关.

结论: 肝癌组织中TGF-β1基因的变化发生在多个水平，肝癌细胞中TGF-β1R Ⅱ、NF-κB蛋白表达异常，并与MVD相关，提示他们在肝细胞癌血管形成中发挥重要作用，NF-κB可能在介导TGF-β1的活化或产生中发挥一定的作用.

关键词: 转化生长因子β1; 转化生长因子β1 Ⅱ型受体; 核转录因子-κB; 肝细胞癌

缪林, 张锁林, 李国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春. 肝癌组织中TGF-β1、TGF-β1R Ⅱ和NF-κB的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1663-1666
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1663.asp

0 引言

转化生长因子-β1(transforming growth factor β1，TGF-β1)是TGF-β超家族的主要成员，能抑制肝细胞、内皮细胞、上皮细胞的增生，诱导细胞外基质的形成[1-3]. 其受体有3种，即TGF-βRI、TGF-βRII、TGF-βRIII. 研究表明他们在多种肿瘤中存在异常[4-6]. 转化生长因子的合成是由核转录因子(如NF-κB)来调控的. 有关其在肝细胞癌中表达情况目前报道不多. 我们研究TGF-β1及TGF-β RII、NF-κB在肝癌组织的表达，并研究其与微血管密度(MVD)的关系;同时研究NF-κB蛋白与TGF-β1蛋白阳性表达之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 原发性肝细胞癌标本30例，来自本院病理科存档石蜡包埋标本，蜡块连续切片，厚度为4 μm，CD34抗体为即用型，购自北京中山生物技术有限公司. TGF-β1、TGF-β1RII、NF-κB抗体(浓缩型)为Santa Cruz公司产品(北京中山生物技术有限公司).

1.2 方法 TGF-β1、TGF-β1RII、NF-κB蛋白表达及MVD的测定:采用链霉素亲生物素—过氧化物酶法(SP法). MVD采用CD34抗体标记法，稀释滴度均为1∶100. 步骤如下:石蜡切片常规二甲苯脱蜡至水;3% H_2O_2室温孵育10 min，以消除内源性过氧化物酶活性;PBS冲洗;分别滴加CD34抗体、TGF-β1抗体、TGF-β1RII抗体、NF-κB抗体(一抗)，室温下过夜;PBS冲洗;滴加生物素标记的二抗，37℃孵育30 min;PBS冲洗;滴加辣根酶标记链霉卵白素，37℃孵育30 min;PBS冲洗;DAB显色，封片观察. 对30例原发性肝细胞癌及癌周标本进行原位杂交染色. 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司，按试剂盒说明书操作. 免疫组化以细胞核或胞质着色棕黄色颗粒为阳性细胞，原位杂交以细胞核或胞质着色紫兰色颗粒为阳性细胞. CD34染色深褐色条索状细胞簇为微血管.

微血管密度(MVD)按Weidner方法进行[7]:CD34抗原染色后，在低倍镜下(×100)找出微血管最密集区，再在高倍镜下(×400)计算5个视野被染成棕色的血管数目，取其平均值作为微血管密度. TGF-β1、TGF-β1RII、NF-κB免疫组织化学结果:全部切片在显微镜下观察，阳性判断标准为:上皮细胞或癌细胞胞核或胞质染色呈棕黄色或棕褐色颗粒，阴性:胞核或胞质不着色. 对所有TGF-β1、TGF-β1RII、NF-κB蛋白阳性切片进行图像分析，每张切片放大200倍，随机选取5个视野，测量窗面积为430 205 μm^2，分别测量阳性细胞面积比(Na%)(阳性反应面积/测量窗面积)和阳性细胞平均吸光度(*A*). 对所有TGF-β1mRNA阳性切片进行图像分析，方法同免疫组化. 资料分析采用瑞医RY2000病理图文分析系统.

统计学处理 采用 *t* 检验和 χ^2 检验.

2 结果

2.1 肝癌组织TGF-β1、TGF-β1RII蛋白的表达 肝癌组织TGF-β1蛋白明显高于癌旁组织，经统计学处理二者差异均有显著性($P<0.01$);肝癌组织TGF-β1RII蛋白明显低于癌旁组织，经统计学处理二者差异均有显著性($P<0.01$)(表1，图1A).

2.2 肝癌组织TGF-β1 mRNA、NF-κB蛋白、MVD的表达 30例原发性肝细胞癌及癌周标本TGF-β1 mRNA阳性例数分别为17例和15例，肝癌组织TGF-β1 mRNA明显高于癌旁组织，肝癌组织中NF-κB蛋白明显高于癌旁组织，肝癌组织中微血管密度明显高于癌旁组织，统计学处理二者差异均有极显著性(表2，图1B-C).

表1 肝癌组织TGF-β1 TGF-β1R Ⅱ蛋白的表达(mean±SD)

	TGF-β1蛋白			TGF-β1R Ⅱ蛋白		
	n	A	Na%	*n*	A	Na%
肝癌	20	0.0 725 ± 0.0 102[b]	62.45 ± 11.56[b]	16	0.0 402 ± 0.0 113[b]	30.21 ± 14.24[b]
癌旁	20	0.0 442 ± 0.0 103	23.26 ± 15.35	16	0.0 669 ± 0.0 157	58.33 ± 13.85

[b]$P<0.01$ *vs* 癌旁组织.

表2 肝癌组织TGF-β1 mRNA、NF-κB蛋白、MVD的表达的表达(mean±SD)

	TGF-β1 mRNA			NF-κB蛋白			微血管密度	
	n	A	Na%	*n*	A	Na%	*n*	MVD
肝癌	17	0.1 043 ± 0.035[b]	52.20 ± 10.46[b]	20	0.0 723 ± 0.0 210[b]	60.25 ± 12.04[b]	30	31.23 ± 9.25
癌旁	15	0.0 620 ± 0.0 225	32.54 ± 11.21	17	0.0 305 ± 0.0 116	28.11 ± 10.45	30	4.24 ± 2.10

[b]$P<0.01$ *vs*癌旁组织.

2.3 肝癌组织中TGF-β1蛋白表达的相关性 肝癌组织TGF-β1蛋白阳性表达组微血管密度明显高于TGF-β1蛋白阴性表达组，统计学处理二者差异有显著性($P<0.01$)(表3);肝癌组织TGF-β1蛋白、TGF-β1 mRNA表达均阳性者占50.0%(15/30)，TGF-β1蛋白、TGF-β1 mRNA表达均阴性者占26.7%(8/30)，二者表达一致率达76.7%(23/30)，统计学处理二者呈显著相关(χ^2 = 8.21，$P<0.01$);肝癌组织TGF-β1蛋白、NF-κB蛋白表达均阳性者占56.7%(17/30)，TGF-β1蛋白、NF-κB蛋白表达均阴性者占23.3%(7/30)，二者表达一致率达80.0%(24/30)，统计学处理二者呈显著相关(χ^2 = 9.075，$P<0.01$)(表4).

表3 肝癌组织中TGF-β1蛋白的表达与微血管密度的关系(mean±SD)

		n	微血管密度(MVD)
TGF-β1蛋白	+	20	35.65 ± 12.87
	+	10	25.12 ± 4.68

t = 3.25，$P<0.01$.

表4 肝癌组织中TGF-β1蛋白与TGF-β1 mRNA、NF-κB蛋白之间的关系

		TGF-β1 mRNA			NF-κB蛋白		
		+	−	合计	+	−	合计
TGF-β1蛋白	+	15	5	20	17	3	20
	−	2	8	10	3	7	10
合计		17	13	30	20	10	30

3 讨论

肿瘤的生长、侵袭及转移依赖于血管生成，肿瘤不仅通过肿瘤血管获得丰富的营养物质，而且还通过肿瘤血管向外输出肿瘤细胞，导致肿瘤不断生长和转移.肿瘤的微血管密度是反映肿瘤血管生成的有效指标，在活体，Chen *et al*[8]报道可采用动态螺旋CT增强扫描来反映肝癌微血管密度.在离体标本中，目前常采用标记血管内皮的方法来检测肿瘤的微血管密度，而CD34和VIII因子是常采用的标记方法.而CD34和VIII因子是常采用的标记方法.Poon *et al*[9]报道肝癌组织中MVD明显高于癌旁组织，且肝癌组织中MVD与肝癌预后相关，MVD高，预后差.本研究结果同样显示，肝癌组织中MVD明显高于癌旁组织，进一步说明了肿瘤血管生成在肿瘤发生发展中的重要作用.TGF-β是细胞生长、分化重要调控因子，其有5个亚型：TGF-β_{1-5}，在哺乳动物只有TGF-β1，2，3，三者的生物学作用相似，序列同源性70-80%，其中TGF-β1含量最高，有代表性.TGF-β受体有3种，即TGF-βRI、TGF-βRII、TGF-βRIII.他们相对分子质量分别为65×10^3，$85-110\times10^3$和6×10^5.起信号转导作用的是Ⅰ型和Ⅱ型受体.Ⅰ、Ⅱ型受体都是单次跨膜的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体.胞膜外区较短，胞质区较长.胞膜外区富含半胱氨酸.胞质区含有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域，具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的活性.与Ⅱ型受体相比，Ⅰ型受体的胞外区和胞质区均较短.TGF-β1首先与TGF-βRII结合形成二聚体，而后TGF-βRI加入形成三聚体，参与信号转导.TGF-β1

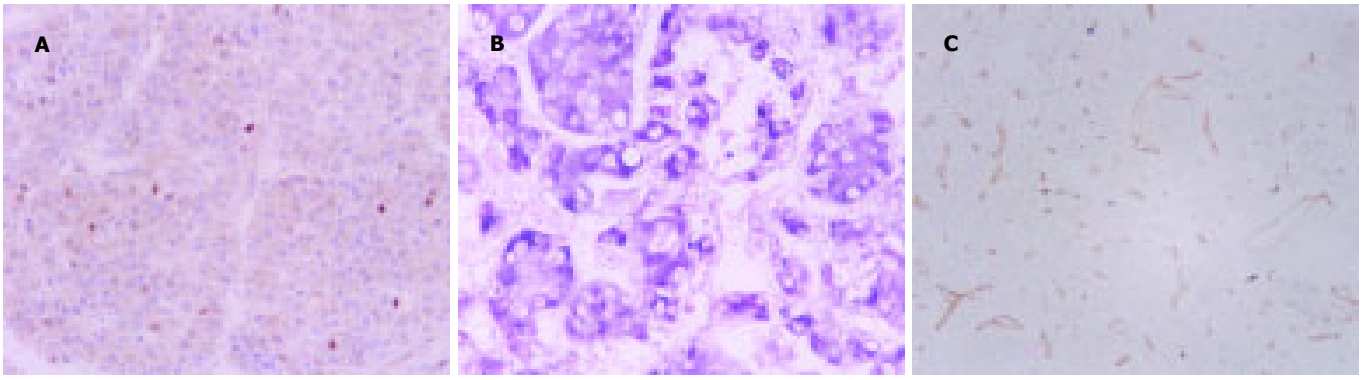


图1 肝癌组织中TGF-β1蛋白、TGF-β1mRNA及MVD的表达(×200). A: TGF-β1蛋白; B:TGF-β1mRNA; C: MVD.

对肝细胞增殖具有强烈的抑制作用.例如在肝大部切除肝再生后期，正是由于肝组织中TGF-β1的大量表达，才导致肝再生的自然终止.另外，TGF-β1在很低浓度(<20 pmol/L = 即可诱导肝细胞凋亡[10]，Kim *et al*[11]亦同样证实TGF-β1诱导肝细胞凋亡.因此，TGF-β1对肝细胞的生长调控至关重要.Bedossa *et al*[12]研究发现，肝癌组织表达TGF-β1，正常肝脏、肝硬化不表达TGF-β1;正常肝细胞膜周可表达TGF-β1RII，而肝癌组织细胞膜周不表达TGF-β1RII，但部分肝癌细胞核周可见到TGF-β1RII聚集.本研究结果显示，在肝癌组织中TGF-β1表达增强，TGF-β1RII表达减弱，而癌旁组织相反.说明二者在肝癌发生中起重要作用.TGF-β1能抑制血管增殖，促进肝细胞凋亡，但由于肝癌组织TGF-βRII表达减弱，使肝癌细胞逃逸了TGF-β1的抑制作用[13]，从而导致了肝癌的发生发展.本研究结果还显示，肝癌组织中TGF-β1 mRNA存在异常，说明肝癌组织中TGF-β1基因存在多个水平异常.且TGF-β1蛋白与TGF-β1 mRNA呈正相关，由于蛋白表达的检测简单易行，而原位杂交条件要求较高，因此前者更适合广大医务工作者开展.

TGF-β1的合成受核转录因子的调控，目前发现的核转录因子主要有NF-κB、AP-1等.NF-κB是1986年Sen和Baltimore应用凝胶电泳迁移率实验研究发现的B细胞核提取物中存在的一种能与免疫球蛋白κ轻链基因的增强子κB序列特异性结合的蛋白质因子，他是由p65和p50组成的二聚体.正常情况下他存在于胞质，当受到刺激后，NF-κB的抑制因子IκB从NF-κB复合体上脱落，活化的NF-κB进入细胞核促进靶基因转录.由于TGF-β1活化因子组织转谷氨酰氨酶(tissue transglutaminase，tTG)基因的启动子中含有NF-κB的结合位点，因而NF-κB能促进TGF-β1表达.本研究结果证实NF-κB表达与TGF-β1表达呈正相关.总之，肝癌组织中TGF-β1基因的变化发生在多个水平，肝癌细胞中TGF-β1、TGF-β1R Ⅱ、NF-κB蛋白表达异常，并与MVD相关，提示他们在肝细胞癌血管形成中可能发挥重要作用，NF-κB可能在介导TGF-β1的活化或产生中发挥一定的作用.

4 参考文献

1 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807

2 Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 2002;71:731-740

3 Zimmerman CM, Padgett RW. Transforming growth factor beta signaling mediators and modulators. *Gene* 2000;249:17-30

4 应月强, 曹晓智, 伍先久, 李希麟. 结直肠癌组织中转化生长因子β表达的意义. 世界华人消化杂志 2004;12:2184-2185

5 张朋彬, 李宜辉, 徐采朴. 转化生长因子βII型受体在胃癌组织中表达的研究. 世界华人消化杂志 2004;12:1531-1533

6 Woszczyk D, Gola J, Jurzak M, Mazurek U, Mykala-Ciesla J, Wilczok T. Expression of TGF beta1 genes and their receptor types I, II, and III in low-and high-grade malignancy non-Hodgkin's lymphomas. *Med Sci Monit* 2004;10:CR33-37

7 Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995;147:9-19

8 Chen WX, Min PQ, Song B, Xiao BL, Liu Y, Ge YH. Single-level dynamic spiral CT of hepatocellular carcinoma: Correlation between imaging features and density of tumor microvessels. *World J Gastroenterol* 2004;10:67-72

9 Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Yang ZF, Fan ST, Wong J. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 2002;20:1775-1785

10 Lin JK, Chou CK. In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 1992;52:385-388

11 Kim BC, Mamura M, Choi KS, Calabretta B, Kim SJ. Transforming growth factor beta 1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 2002;22:1369-1378

12 Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 1995;21:760-766

13 Ueno T, Hashimoto O, Kimura R, Torimura T, Kawaguchi T, Nakamura T, Sakata R, Koga H, Sata M. Relation of type II transforming growth factor-beta receptor to hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2001;18:49-55

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1667-1672
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原 SSX–2 和 SSX–5 的表达

吴力群, 王新建, 张 斌, 卢 云, 杨金镛

吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科 山东省青岛市 266003
吴力群, 男, 1958–10–31 生, 江苏省丹阳市人, 汉族, 1982 年青岛医学院本科毕业, 主任医师, 主要从事肝胆外科专业.
通讯作者: 吴力群, 266003, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科. jiaoqin@mail.qdcatv.com.cn
电话: 0532–82911369 传真: 0532–2911999
收稿日期: 2005–03–31 接受日期: 2005–04–09

Expression of cancer-testis antigen SSX-2 and SSX-5 in tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma

Li-Qun Wu, Xin-Jian Wang, Bin Zhang, Yun Lu, Jin-Yong Yang

Li-Qun Wu, Xin-Jian Wang, Bin Zhang, Yun Lu, Jin-Yong Yang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Correspondence to: Li-Qun Wu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. jiaoqin@mail.qdcatv.com.cn
Received: 2005-03-31 Accepted: 2005-04-09

Abstract

AIM: To investigate the expression of SSX-2 and SSX-5 mRNA in the tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and their relations with kinds of cilinical indexes, and to evaluate the possibility of using them as the targets for specific immunotherapy of HCC as well as the markers to in adjuvant diagnosis and prognosis and recurrence detection of HCC.

METHODS: One-step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) wasused to detect the expression of SSX-2 and SSX-5 mRNA in the cancer tissues, corresponding cancer-adjacent tissues and peripheral blood of 26 patiernts with HCC, as well as in12 cirrositic tissues and 10 normal tissuesOne sample, selected from each gene with positive PCR outcomes, was sequenced to testify the reliability. The relation between SSX-2, SSX-5 expression and kinds of clinical indexes, such as α-fetoprotein (AFP), HBsAg, diameter of the tumor, TNM staging, was analysed.

RESULTS: The positive rates of SSX-2 and SSX-5 mRNA expression were 34.6%(9/26) and 46.2%(12/26) in HCC tissues respectively, while none of the two genes was detected in the corresponding cancer-adjacent tissues. At least one gene was expressed in 65.4%(17/26) of HCC tissues and the co-expression was found in 15.4%(4/26). In the peripheral blood of the 26 HCC patients, the positive-expression rates of SSX-2 and SSX-5 mRNA were 19.2% (5/26) and 23.1%(6/26) respectively. The positive rates of single expression and co-expression were 34.6%(9/26) and 7.7%(2/26) respectively. In the 12 patients with hepatic cirrhosis and 10 nomal controls, none of SSX-2 and SSX-5 mRNA was detectable in liver tissues and peripheral blood. After sequencing, the RT-PCR products were confirmed to be the target cDNA. No relationship was found between the expression of the two genes and the clinical indicators such as age, sex, tumor size, serum AFP level and infection of hepatitis B virus (P>0.05). However, in some patients with normal serum AFP (<20 ng/L), specific expression of SSX-2 and/or SSX-5 genes were/was observed in the peripheral blood.

CONCLUSION: SSX-2 and SSX-5 mRNA are expressed with a high frequency and specificity in HCC, and they can be also co-expressed. They can be used as the targets for specific immunotherapy of HCC. No relationship exists between the expression of SSX-2 and SSX-5 and clinical indicators, and the expression of the two genes may be used as the markers in diagnosis and prognosis prediction of HCC.

Key Words: Hepatocellular caicinoma; SSX-2; SSX-5; Reverse transcription polymerase chain reaction

Wu LQ, Wang XJ, Zhang B, Lu Y, Yang JY. Expression of cancer-testis antigen SSX-2 and SSX-5 in tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1667-1672

摘要

目的: 检测 SSX 家族中 SSX−2 和 SSX−5mRNA 在肝细胞癌(HCC)组织和外周血中的表达情况及其与临床指标之间的关系, 评价其作为肝癌免疫治疗特异性靶位的可能性, 及作为肝癌辅助诊断和监测预后、复发指标的可能性.

方法: 用一步法逆转录−聚合酶链反应(RT−PCR)方法对 HCC 患者 26 例的癌组织、相应癌旁组织和外周血及对照(肝硬化和正常肝组织)中 SSX−2,SSX−5mRNA

的表达进行了检测，为验证结果的可靠性，随机选取每一种抗原RT-PCR呈阳性的产物1例进行DNA序列测定，并对检测结果与AFP，HBSAg，肿瘤直径，TNM分期等临床指标之间的相关性进行分析.

结果: 26例HCC肝癌组织SSX-2和SSX-5基因表达阳性率分别为34.6%和46.2%，两种基因同时表达的有4例(15.4%)，至少有一种基因表达的有17例(65.4%)，癌旁组织表达的阳性率皆为0%;在26例HCC患者外周血中，SSX-2mRNA的表达率为19.2%，在组织呈阳性的患者外周血中的表达率为55.6%;SSX-5mRNA的表达率为23.1%，在组织呈阳性的患者外周血中的表达率为50%;两种基因同时表达者为7.7%，至少有一种表达者为34.6%.对照组中12例肝硬化和10例非肿瘤肝组织及外周血均未检测到SSX-2和SSX-5的表达.二者均取1例DNA测序，结果表明RT-PCR产物为SSX-2和SSX-5 cDNA.SSX-2和SSX-5的表达与年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、AFP水平、HBV感染等无显著相关性(P>0.05).部分AFP正常(<20 ng/L) HCC患者外周血中存在SSX-2或/和SSX-5基因的表达.

结论: SSX-2和SSX-5基因在HCC中呈高频率、高特异表达，二者可同时在HCC中表达，可以作为肝癌免疫治疗特异性靶位.二者的表达与年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期、血清AFP水平、肝炎病毒感染无显著相关性; SSX-2，SSX-5基因的表达可用于HCC的辅助诊断和作为监测复发和预后的指标.

关键词: 肝细胞癌; SSX-2; SSX-5; 逆转录聚合酶链反应

吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛. 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1667-1672
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1667.asp

0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma，HCC)是世界范围内常见的恶性肿瘤之一，居我国恶性肿瘤致死类型的第2位.在HCC的治疗方面，主要是以手术为主，辅之以化疗、放疗、酒精注射及射频消融等，在一定程度上改善了患者的预后，并提高了生活质量，但是依然有近一半HCC的患者死亡.目前治愈性肝切除术后5 a生存率估计在17-33%，但治愈性切除术后5 a复发率高达61.5%，小肝癌的复发率也高达43.5%.在HCC中，SSX家族基因研究较少，我们对SSX基因家族中的SSX-2和SSX-5在肝癌组织和外周血中的表达情况进行研究，以期能找到适合HCC免疫治疗的新靶位，并探讨是否能将其作为一种新的HCC的诊断指标，或监测预后和复发的指标.

1 材料和方法

1.1 材料 手术前取外周抗凝血约100 mL(加入肝素200 kU/L)，留待分离外周血单核细胞.手术切下标本后立刻先取癌旁组织(距病变边界2-5 cm外)，分别切成约0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm的小块，置于冻存管中，立即放入液氮中速冻;然后再取癌组织，切成约0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm的小块，置于冻存管后也经液氮速冻.然后将这些标本保存于-70℃低温冰箱中，用于检测CTA基因的mRNA表达.用同样的方法取12例肝硬化组织和10例非肿瘤肝组织作为研究对照.另取正常人的睾丸组织作为阳性对照.将所取外周血用PBS稀释，PBS和血液的稀释比是1∶1.取50 mL离心管数个，每管加入10-15 mL淋巴细胞分离液，加入上述已稀释的抗凝血，血液和分离液的比例为2∶1，向分离液加入血液时，应使血液沿管壁缓慢流下叠于分离液上.上述各关置于离心机，2 500 r/min离心20 min，用移液管吸出PBMC层.PBMC置于新离心管中，加入5倍体积的PBS，离心1 500 r/min，10 min，如此漂洗PBMC2次.用PBS重悬漂洗后的PBMC，取细胞悬液10-20 uL，加入等量4 g/L台盼蓝，混匀后上细胞计数板进行计数，细胞总数=四个大方格总数/2×10^4×细胞悬液总量.一般情况下，100 mL血可获得8-10×10^7个PBMC.将细胞悬液离心1 500 r/min 10 min，其上清，加入冻存液重悬细胞，分装于冻存管中，每管装1×10^7个细胞.将冻存管先置于4℃冰箱，约1 h后移入-80℃冰箱，24 h后移入液氮中保存.

1.2 方法 从液氮中取出细胞标本在37℃水浴箱内快速解冻，以4℃，2 000 r/min离心10 min，弃去冻存液加入Trizol(美国Gibco公司)1 mL，反复吹打使细胞充分裂解.从-70℃冰箱中取出组织标本约50-100 mg置入研钵内，在有液氮存在的情况下研成碎末，待液氮干燥后，立即加Trizol 1 mL不断研磨直到完全成为液体后，移入1.5 mL离心管中.在上述裂解液中加入三氯甲烷200 μL，用力摇晃15 s，室温放置2-3 min.12 500 g，4℃离心15 min，小心吸取上清液将其移入另一1.5 mL离心管中，加入异丙醇0.5 mL，于室温放置10 min进行RNA沉淀.12 500 g，4℃离心10 min，小心弃去上清液，加入DEPC处理水配制的750 mol/L乙醇1 mL，将白色RNA沉淀整块吹起进行漂洗.7 500 g，4℃离心5 min后，弃去上清液，再加入750 mol/L乙醇1 mL重复洗涤一次，7 500 g，4℃离心5 min后，小心弃去上清液，吸尽管壁残留的液体.冰上放置5-10 min，待残留的乙醇干燥后，根据肉眼观察的RNA量的多少，将所得RNA溶于30-80 μL DEPC处理过的纯净水中.取RNA样品4 μL，加无RNA酶的水196 μL稀释50倍，用紫外分光光度计对RNA在260 nm下的吸光度进行定量.RNA浓度(g/L) = A_{260}×核酸稀释倍数×40/1 000.

用紫外分光光度计对RNA在260 nm和280 nm下的吸光度 A_{260} 和 A_{280} 进行定量，计算 A_{260}/A_{280}，所有标本的比值要求在1.75-1.95之间.低于此值者表明其含有蛋白质杂质，用三氯甲烷重新提纯.琼脂糖1 g，加入0.5×TBE到总体积为50 μL，配成20 g/L的凝胶，经微波炉加热100s，冷却到微烫手时加入EB(0.5 g/L)2.5 μL充分混匀后灌胶.取RNA溶液3 μL，加0.5×TBE 2 μL，6×loading Buffer 1 μL，混匀后上样.在0.5×TBE的电泳液中，以5 V/cm的电压电泳20 min，在紫外灯下观察RNA的电泳带，比较核糖体RNA(rRNA)28 S和18 S两条带，如果在EB作用下显色强度为2∶1，说明本实验提取的RNA比较完整.

1.2.1 *逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)* 所用的引物和内参照 β_2 微球蛋白(β_2-MG)引物均委托上海生工公司合成，引物序列、扩增片段大小及其在基因结构图上的位置详见表1，图1，2.所用引物序列参照了以前研究者的设计[11].SSX-2含有6个外显子(exon)，我们所采用的引物位于第1和第5，6外显子(跨越一个内含子)上，扩增片段长度为435 bp，若为基因组DNA污染的产物，因包含4个内含子，片段远较目的产物长，在电泳图上容易区分.SSX-5含有6个外显子(exon)，所采用的引物位于第1和第5外显子上，扩增片段长度为314 bp，若为基因组DNA污染的产物，因包含4个内含子，片段远较目的产物长，在电泳图上容易区分.一步法RT-PCR按照50 uL反应体系，依次向薄壁PCR管中加入无RNA酶水26 μL;5倍缓冲液10 μL;10 mmol/L dNTPs 2 μL;15 mmol/L上游引物2 μL;15 mmol/L下游引物2 μL;10 μmol/L β_2-M P1 2 μL;10 μmol/L β_2-M P2 2 μL;RT-PCR酶2 μL;所提取的RNA 2 μL;总体积50 μL.反应条件:先50℃ 30 min，进行逆转录产生cDNA，然后进行PCR扩增.按照试剂盒的要求所有PCR扩增程序的第一步均为94℃，15 min以激活DNA聚合酶，此后步骤:SSX-2:变性94℃ 45 s，退火54℃ 45 s，延伸72℃ 60 s;SSX-5:变性94℃ 45 s，退火52℃ 45 s，延伸72℃ 45 s;于PCR仪内扩增35个循环，延伸72℃ 12 min.

表1 PCR所用的引物序列和扩增片段

引物名称	序列	扩增片断(bp)
SSX-2A(5')P1	5'-GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC-3'	
SSX-2B(3')P2	5'-TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G-3'	435
SSX-5A(5')P1	5'-GTT CTC AAA TAC CAC AGA AGA TG-3'	
SSX-5B(3')P2	5'-CTC TGC TGG CTT CTC GGG CG-3'	314
B_2-M A(5')P1	5'-CTC GCG CTA CTC TCT CTT TCT GG-3'	
B_2-M B(3')P2	5'-GCT TAC ATG TCT CGA TCC CAC TTA A-3'	168

图1 SSX-2基因结构示意图.

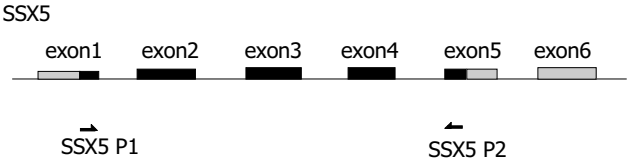


图2 SSX-5基因结构示意图.

1.2.2 *CTA基因PCR产物的纯化和测序* 取PCR产物100 μL，在5 V/cm的电压下行10 g/L的琼脂糖凝胶电泳，电泳30 min，在紫外灯下快速切下含目的片段的琼脂糖凝胶(切胶时应尽可能多的去掉不含DNA的琼脂糖).按每100 mg琼脂糖加入 S_1 液300 μL，置于50℃水浴10 min，是琼脂糖完全熔化，每分钟颠倒混匀一次.加入1/3 S_1 液体积的异丙醇，混匀，置于50℃水浴1 min，混匀.将熔化后的Agarose液已入吸附柱，离心30 s，倒掉收集管中的液体，在将吸附柱放入同一收集管中.在吸附柱中加入 W_1 液500 μL，离心15 s，倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一收集管中.在吸附柱中加入500 μL W_1 液，静置1 min，离心15 s，倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一收集管，离心1 min.将吸附柱放入一个干净的1.5 mL离心管中，在吸附膜中央加入 T_1 液50 μL，静置1 min，离心1 min.将回收产物进行20 g/L的琼脂糖凝胶电泳，如果电泳带很清晰并且无杂带，说明回收和纯化成功.所回收和纯化的样品及相应的PCR上游引物送请上海生工公司进行DNA序列测定.

统计学处理 采用SSPS统计软件(10.0版本)进行，所用的统计学方法为 χ^2 检验，$P<0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 *SSX-2和SSX-5基因在HCC组织中的表达* 在26例HCC组织中，SSX-2，SSX-5基因mRNA阳性率分别是34.6%和46.2%，两种基因同时表达的有4例(15.4%)，至少有一种基因表达的有17例(65.4%)，癌旁组织表达的阳性率皆为0%;对照组中12例肝硬化和10例非肿瘤患者正常肝组织均未检测到SSX-2和SSX-5的表达.电泳显示PCR产物与阳性对照大小一致(图3-6).RT-PCR产物与从GeneBank检索的SSX-2(NM_003147)，SSX-5(NM_021015)扩增范围序列基本一致，证实所得到的cDNA确为要扩增的目的基因，所得结果未发

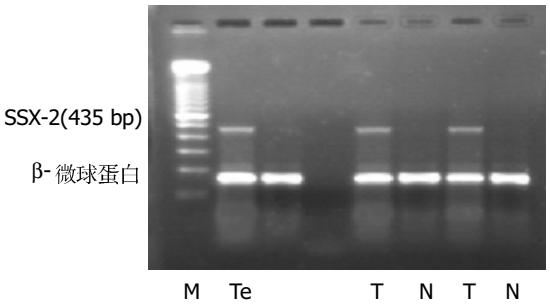


图3 SSX-2基因在肝癌组织中表达电泳图.

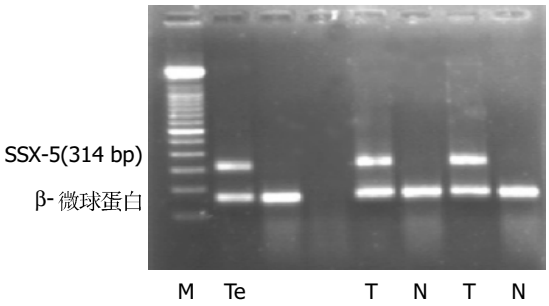


图4 SSX-5基因在肝癌组织中表达电泳图.

现有固定的碱基改变.在不同的HCC标本中SSX-2和SSX-5基因的RT-PCR产物电泳带的亮度存在较大差异，而在同一标本中二者的表达也存在有强弱不等的现象，说明二者的表达存在差异

2.2 SSX-2，SSX-5基因的表达与临床指标的关系 表2 在26例HCC患者中，男21例，女5例，年龄17-79(平均年龄53±14.8)岁;有完整随访资料的病例有20例，随访时间6-15(平均9.6±2.6)mo，共有7例复发，HBsAg阳性23例，HCV阳性3例，AFP阳性18例，AFP阴性8例;术后病理显示中分化15例，低分化11例;TNM分期III期和IV期各13例.通过统计学分析发现SSX-2及SSX-5基因在HCC组织中的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期、血清AFP水平、肝炎病毒感染无显著相关性(P>0.05).但是，在8例AFP阴性的(<20 ng/L)HCC患者中有2例SSX-2基因表达阳性，有3.例SSX-5基因表达阳性.随访的20例病例中，术后6 mo期间有7例出现复发，其中SSX-2基因表达阳性者2例，占随访病例中SSX-2表达阳性者的22.2%;SSX-5基因表达阳性者2例，占随访病例中SSX-5表达阳性者的18.2%(有1例SSX-5表达阳性者失去随访)，复发与阳性表达之间无显著的相关性(P>0.05).

表2 HCC组织中SSX-2、5表达与临床指标的关系(n = 26)

临床指标	SSX-2	SSX-5
年龄<40岁	1/4(25%)	2/4(50%)
≥40岁	8/22(36.4%)	10/22(45.5%)
男性	8/21(38.1%)	10/21(47.7%)
女性	1/5(20%)	2/5(40%)
肿瘤大小		
≤5 cm	5/16(31.2%)	7/16(43.8%)
>5 cm	4/10(40%)	5/10(50%)
TNM分期		
Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ期	4/13(30.8%)	5/13(38.5%)
Ⅳ期	5/13(38.5%)	7/13(53.8%)
HBV(+)	8/23(%)	11/23(%)
HBV(-)	1/3(%)	1/3(%)
AFP≤20 ug/L	2/8(25%)	3/8(37.5%)
AFP>20 ug/L	7/18(38.9%)	9/18(50%)

2.3 SSX-2及SSX-5mRNA在HCC患者外周血中的表达 在26例HCC患者外周血中，SSX-2mRNA的表达率为19.2%，在组织呈阳性的患者外周血中的表达率为55.6%;SSX-5mRNA的表达率为23.1%，在组织呈阳性的患者外周血中的表达率为50%.两种基因同时表达者为7.7%，至少有一种表达者为34.6%.在外周血中表达为阳性者，其在组织中的表达都为阳性;组织中表达为阴性者，其在外周血中表达也为阴性.对照组中12例肝硬化和10例非肿瘤患者外周血中均未检测到SSX-2和SSX-5的表达.在实验中严格设立阳性对照、空白对照和内参照，所有的内参照均为阳性，说明逆转录产物cDNA的质量良好;所有的阳性对照电泳带显示良好，而空白对照均为阴性，说明无假阳性或假阴性情况出现，所有目的带与阳性对照带的大小相同，结果可靠.

2.4 SSX-2及SSX-5基因在HCC患者外周血中的表达与临床指标的关系 表3 患者的各项临床指标同前，统计学分析显示SSX-2及SSX-5基因在HCC患者外周血中的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期、血清AFP水平、肝炎病毒感染无显著相关性(P>0.05).在8例AFP为阴性的(<20 ng/L)HCC患者外周血中有2例SSX-2基因表达阳性，有2例SSX-5基因表达阳性.随访的20例病例中，术后6 mo期间有7例出现复发，其中有1例外周血SSX-2的表达为阳性，占随

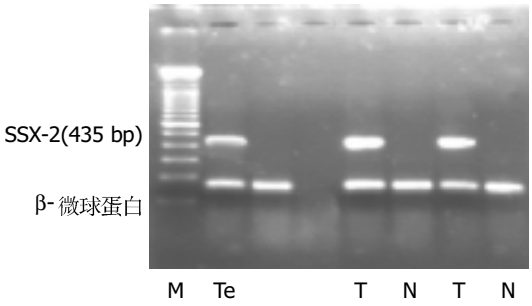


图5 SSX-2基因在HCC外周血中的表达电泳图.

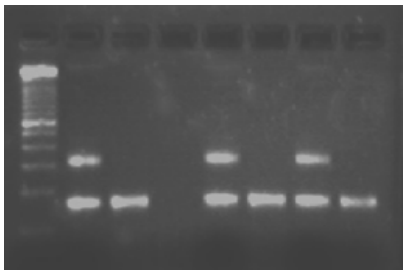


图6 SSX-5 基因在 HCC 外周血中的表达电泳图.

访病例中 SSX-2 表达阳性者的 20%，; 有 2 例外周血 SSX-5 的表达为阳性，占随访病例中 SSX-5 表达阳性者的 40%(有 1 例 SSX-5 表达阳性者失去随访); SSX-2 或 SSX-5 表达阳性者，随访 6mo 内的复发率为 37.5% (3/8). 复发与外周血中基因的表达之间无显著相关性.

表3 HCC 外周血中SSX-2、5 表达与临床指标的关系(n = 26)

临床指标	SSX-2	SSX-5
年龄<40 岁	1/4(25%)	0/4(0%)
≥40 岁	4/22(18.2%)	6/22(27.3%)
男性	5/21(23.8%)	5/21(23.8%)
女性	0/5(0%)	1/5(20%)
肿瘤大小		
≤5 cm	3/16(18.8%)	4/16(25%)
>5 cm	2/10(20%)	2/10(20%)
TNM 分期		
Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ 期	1/13(7.7%)	2/13(15.4%)
Ⅳ期	4/13(30.8%)	4/13(30.8%)
HBV(+)	5/23(21.7%)	6/23(26.1%)
HBV(-)	0/3(0%)	0/3(0%)
AFP ≤ 20 ug/L	2/8(25%)	1/8(12.5%)
>20 ug/L	3/18(16.7%)	5/18(27.8%)

3 讨论

关于SSX-2和SSX-5基因在HCC中的表达情况的研究较少，Chen *et al*[1]应用巢式 PCR 的方法检测了 SSX 基因亚家族在肝癌中的表达情况，结果发现 SSX-2 和 SSX-5 基因 mRNA 在肝癌中的阳性率分别为 46.7% 和 33.3%，在相应的癌旁组织中为 0% 和 10%. 我们采用一步法RT-PCR的方法研究了SSX-2和SSX-5基因在肝癌组织中的表达情况. 在所检测的 26 例 HCC 组织中，SSX-2 和 SSX-5 基因 mRNA 阳性率分别是 34.6%(9/26) 和 46.2%，表达频率较高; 两种基因同时表达的有 4 例 (15.4%)，至少有一种基因表达的有 17 例(65.4%); 发现 SSX-2 和 SSX-5 基因在癌旁组织及对照组的肝硬化和正常肝组织中均没有表达. 此结果与 Chen *et al*[1] 的结果大致相同(两种基因表达阳性率分别为34.6%和 46.2%)，但我们的研究结果中，两种基因在癌旁和正常肝组织中均无表达，至于为什么 SSX-5 会在癌旁组织中出现，原因仍不清楚，Chen *et al*[1]认为可能是由于在癌旁存在微型转移灶，或者是因为在肝硬化时期肝组织已经有 SSX-5 的表达. 根据我们的研究结果，我们认为前一种可能性较大，因为巢式 PCR (两轮 PCR) 是一种高度敏感的方法，可达到检测一个肿瘤细胞的水平，而现有的形态学检查尚不能达到此水平，因此不能完全排除SSX-5基因呈阳性的癌旁组织存在微小转移的可能性. 同时也不能排除采集标本时标本受到污染的可能. 我们的研究结果提示 SSX-2 和 SSX-5 基因在肝癌中呈高频率、高特异表达，这可能为肝癌的免疫治疗提供了新的潜在的靶位. 另外，这两个基因在肝癌中可同时表达为采用多价瘤苗进行肝癌的免疫治疗提供了实验依据. 但是，由于 SSX 基因的表达存在个体差异性，即异质性问题(我们的研究也显示 SSX-2 和 SSX-5 基因在不同的标本中的表达有差异)，而且目前我们只是进行定性检测，以这种定性结果指导选择病例进行免疫治疗，其合理性值得商榷. 如能从蛋白质水平和定量检测其表达，可能对选择合适的病例进行免疫治疗更具指导价值. 我们发现 SSX-2 和 SSX-5 基因的表达与年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期、血清 AFP 水平、肝炎病毒感染无显著相关性(P>0.05).

目前对 HCC 的诊断仍 AFP 的检测和影像学检查为主，但都可造成一定的假阳性和假阴性，所以，临床上仍希望能找到一种特异性更高的诊断方法. 另外，肝癌细胞具有容易侵犯血管的特性，极易造成肝癌细胞的血行播散，可能造成手术切除后的高复发率和高转移率，目前临床仍以检测 AFP 作为检测 HCC 复发的指标，但其特异性仍不能令人满意，这就要求我们寻找一种特异性更高的检测HCC复发的指标. 近年来兴起的运用RT-PCR方法检测循环肿瘤细胞(这种方法敏感度极高，可以从 10^{7-8} 个单个核细胞中检测出 1 个癌细胞[2-3])，为在这方面的研究提供了广阔的前景. RT-PCR 技术已经成功地应用到多种实体肿瘤中，以检测进入循环中微量的肿瘤细胞，如黑色素瘤[4-5]、神经母细胞瘤[6]、前列腺癌[7-9]、乳腺癌[9-10]、胃癌[11-12]和结直肠癌[11-13]等，当然这种技术也可以被用于检测 HCC 患者的循环肿瘤细胞. 最近的资料证实可以应用 RT-PCR 方法检测循环中的肝癌细胞，但是所用的标志物都是组织特异性标记物. 换言之，现在尚未找到肝脏肿瘤特异的标志物，即在 100% 的肝脏肿瘤细胞中表达而在正常肝组织中完全不表达的标志物. 所以，关键是找到一种肝脏肿瘤特异性的标志

物.Mori *et al*[13]应用MAGE基因mRNA作为标记物检测胃肠道肿瘤患者的循环肿瘤细胞，结果显示敏感性为1个食管癌细胞系细胞/10^6个PBMC，特异性也比较高(正常人血液标本均不表达MAGE基因).同理，也可以用CTA基因作为肿瘤标志物检测HCC的循环肿瘤细胞.这对于HCC的诊断、指导治疗及判断治疗效果和预后都有重要的临床意义.我们应用RT-PCR技术对26例HCC患者外周血中SSX-2和SSX-5基因的表达进行了检测.二者表达的阳性率分别为19.2%和23.1%，二者同时表达为7.7%，至少有一种表达为34.6%，在HCC组织中未能检测到SSX-2和/或SSX-5基因的患者，在外周血标本中也不能检测到该基因，对照组患者(12例肝硬化和10例其他非肿瘤患者)的外周血中没有表达.这说明这两种基因在HCC的外周血中的表达呈特异性，所以对外周血中的SSX-2和SSX-5基因进行检测可作为HCC的一种诊断措施，但由于其表达频率不高，可造成一定的假阴性，应用可能受到一定的限制.而目前临床普遍采用的AFP检测法，由于其在慢性活动性肝炎、肝硬化患者中也有表达，存在一定的假阳性;同时，并非所有HCC患者都有AFP的表达，有一定的假阴性，而我们的研究结果显示，有4例AFP正常(<20 ug/L)的患者，其外周血可检测到SSX-2和/或SSX-5基因，这提示当怀疑有HCC但AFP又为阴性时，可检测外周血中的SSX-2和/或SSX-5基因，以作为HCC的辅助诊断指标.HCC外周血中SSX-2和SSX-5基因的表达与临床指标的关系:我们发现HCC外周血中SSX-2和SSX-5基因的表达与年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期、血清AFP水平、肝炎病毒感染无显著相关性(P>0.05).我们的研究结果显示，外周血SSX-2和/或SSX-5基因表达阳性的患者，6 mo内的复发率较高(37.5%)，但没有统计学意义，考虑可能与标本量较少有关，应进行大标本量的研究，可望将SSX-2和SSX-5作为监测HCC术后复发的指标.

总之，本实验得到了以下发现:SSX-2和SSX-5基因在肝癌组织中呈高特异、高频率表达，在非肿瘤肝组织中不表达，这就为HCC的特异性免疫治疗提供了新的潜在的靶位;SSX-2和SSX-5基因在部分HCC中同时表达，为采用多价瘤苗进行HCC的特异性免疫治疗提供了实验依据;相当一部分AFP正常(<20 μg/L)HCC患者存在SSX-2和SSX-5基因的表达，提示也许可能将SSX-2和SSX-5基因mRNA作为肿瘤标志物肿瘤标志物来检测循环肝癌细胞，用于HCC的辅助诊断和作为监测复发、转移和预后的指标.

4 参考文献

1 Chen CH, Chen GJ, Lee HS, Huang GT, Yang PM, Tsai LJ, Chen DS, Sheu JC. Expressions of cancer-testis antigens in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett* 2001;164:189-195

2 Mori M, Mimori K, Tanaka F, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Molecular diagnosis of circulating cancer cells using MAGE gene assays. *JAMA* 1997;278:476-477

3 Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, Zhang ZF, Rosai J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol* 1995;13:1195-1200

4 Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:725-729

5 Brossart P, Schmier JW, Kruger S, Willhauck M, Scheibenbogen C, Mohler T, Keilholz U. A polymerase chain reaction-based semiquantitative assessment of malignant melanoma cells in peripheral blood. *Cancer Res* 1995;55:4065-4068

6 Foss AJ, Guille MJ, Occleston NL, Hykin PG, Hungerford JL, Lightman S. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;72:155-159

7 Naito H, Kuzumaki N, Uchino J, Kobayashi R, Shikano T, Ishikawa Y, Matsumoto S. Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 1991;27:762-765

8 Gunther G, Haglund M, Lindquist L, Forsgren M, Skoldenberg B. Tick-bone encephalitis in Sweden in relation to aseptic meningo-encephalitis of other etiology: a prospective study of clinical course and outcome. *J Neurol* 1997;244:230-238

9 Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, Samadi DS, Powell CT, Heston WD, Wise GJ, Fair WR. Sensitive detection of prostate hematogenous tumor cell dissemination using prostate specific antigen and prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction. *J Urol* 1995;153(3 Pt 1):573-577

10 Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, Powell CT, Fair WR, Samadi DS, Huryk RF, DeBlasio A, Edwards ET, Wise GJ. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res* 1994;54:6306-6310

11 Kruger WH, Stockschlader M, Hennings S, Aschenbrenner M, Gruber M, Gutensohn K, Loliger C, Gieseking F, Jonat W, Zander AR. Detection of cancer cells in peripheral blood stem cells of women with breast cancer by RT-PCR and cell culture. *Bone Marrow Transplant* 1996;18(Suppl 1):S18-20

12 Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417-3420

13 Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Molecular etection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancerr* 1996;68:739-743

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1673-1678
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义

吴力群, 王新建, 卢 云, 张 斌, 杨金镛

吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科 山东省青岛市 266003
吴力群, 男, 1958-10-31 生, 江苏省丹阳市人, 汉族, 1982 年青岛医学院本科毕业, 主任医师, 主要从事肝胆外科专业.
通讯作者: 吴力群, 266003, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科. jiaoqin@mail.qdcatv.com.cn
电话: 0532-82911999 传真: 0532-82911999
收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

Expression of cancer-testis antigens SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

Li-Qun Wu, Xin-Jian Wang, Yun Lu, Bin Zhang, Jin-Yong Yang

Li-Qun Wu, Xin-Jian Wang, Yun Lu, Bin Zhang, Jin-Yong Yang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Correspondence to: Li-Qun Wu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. jiaoqin@mail.qdcatv.com.cn
Received: 2005-03-31 Accepted: 2005-04-09

Abstract

AIM: To investigate the expression of SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA in hepatocellular carcinoma (HCC) and their clinical significances.

METHODS: The expression of SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA were detected in the cancer tissues, the corresponding cancer-adjacent tissues and the peripheral blood of 26 patients with HCC as well as of 20 controls by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). A randomized sample of the RT-PCR products was selected for DNA sequencingto examine the reliability of results.

RESULTS: The positive rates of SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA expression were 61.5%(16/26) and 11.5% (3/26), respectively, in cancer tissues, and they were 46.2%(12/26) and 3.8%(1/26) in the peripheral blood. HCC patients, whose peripheral blood expressed SSX-1 or NY-ESO-1 mRNA, also expressed the same gene in their cancer tissues. SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA were not expressed in cancer-adjacent tussues, and tissues and peripheral blood of the controls. DNA sequencing confirmed that the RT-PCR products were the target cDNA. No significant relationship was found between the expression of SSX-1 and NY-ESO-1 and the clinical indicators such as age, gender, tumor size, extent of differentiation, serum α-fetoprotein (AFP) level and infection of hepatitis B virus (P>0.05). However, in 37.5% patients with normal serum AFP (<20 ng/L), specific expression of SSX-1 mRNA was observed. The short-term recurrent rate was 50%(4/8) in patients whose peripheral blood expressed SSX-1 mRNA, while the rate in patients with no SSX-1 mRNA expression was 25%(3/12).

CONCLUSION: SSX-1 and NY-ESO-1 are expressed with a high specificity in HCC, and they can be used as the targets for specific immunotherapy of HCC. The combination of SSX-1 mRNA and AFP detection can help to improve the accuracy of diagnosis for HCC. The expression of SSX-1mRNA may be used as an indicator for reccurrence, metastesis and prognosis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; SSX-1; NY-ESO-1; Reverse transcription polymerase chain reaction

Wu LQ, Wang XJ, Lu Y, Zhang B, Yang JY. Expression of cancer-testis antigens SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1673-1678

摘要

目的: 检测SSX-1及NY-ESO-1mRNA在肝细胞性肝癌(HCC)患者的外周血及肝癌组织中的表达情况及其临床意义.

方法: 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法对26例HCC患者的外周血、癌组织、相应的癌旁组织及20例对照研究标本进行SSX-1和NY-ESO-1mRNA检测.为验证结果的可靠性,对SSX-1和NY-ESO-1的RT-PCR产物进行了DNA测序.

结果: SSX-1及NY-ESO-1 mRNA在26例HCC组织中的表达率分别为61.5%和11.5%,在相应的外周血中的表达率分别为46.2%和3.8%.外周血中表达SSX-1或NY-ESO-1 mRNA的HCC患者,其组织标本中也表达上述基因.所有的癌旁组织,作为对照的肝硬化和正常肝组织以及非肿瘤患者的外周血中均未发现这两种

基因的表达.测序结果表明所得到的cDNA确为要扩增的目的基因.SSX-1和NY-ESO-1基因的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、血清AFP水平、肝炎病毒感染等临床指标无显著相关性(P>0.05).37.5%的AFP正常(<20 ng/L)的HCC患者外周血中有SSX-1基因表达.外周血中表达SSX-1mRNA的患者的短期(6 mo)复发率为50%(4/8)，不表达者的复发率为25%(3/12).

结论: 在HCC患者及癌组织中SSX-1和NY-ESO-1基因高特异性表达，在检查AFP的同时检测外周血SSX-1 mRNA的表达，有助于提高HCC的检出率.表达SSX-1 mRNA的HCC患者的短期复发率明显增高，可作为监测HCC复发、转移和预后的指标.

关键词: 肝细胞癌; SSX-1; NY-ESO-1; 逆转录聚合酶链反应

吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛. 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1673-1678
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1673.asp

0 引言

原发性肝细胞性肝癌(HCC)常见，恶性程度高，预后差.我国每年约23万人死于肝癌，占全世界肝癌死亡数的53%[1].即使小肝癌术后5 a的复发率也超过50%，大肝癌的复发率则更高[2]，复发与转移成为制约肝癌预后的瓶颈.据估计直径小于1 cm的HCC约有20%发生血管侵犯，大于5 cm的约有90%发生血管侵犯，对血管的浸润直接造成了肝癌细胞的血源性播散[3].当前，手术切除仍是治疗肝癌复发灶的最有效的方法[4].RT-PCR技术检测循环血液中的肿瘤播散细胞(DTC)的灵敏度可达1/(10^6-10^8)[5].以ALBmRNA及AFPmRNA作为检测指标，缺乏特异性[6-7].近年来肿瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigens，CTA)，包括MAGE[8]，SSX[9]，GAGE[10]，BAGE，SCP-1和NY-ESO-1等家族，有望成为检测肿瘤细胞的特异性指标.MAGE-1和MAGE-3在HCC组织中呈高表达[11-12]，其抗原肽在体外能诱导产生CTL反应[13-14]，可用于肿瘤复发的监测[15].我们以SSX-1和NY-ESO-1mRNA为标记检测HCC外周血中肿瘤细胞，对于HCC辅助诊断，复发与预后的预测可能具有重要的意义，目前国内外尚无此类研究报道.

1 材料和方法

1.1 材料 术前自深静脉通道或外周静脉采血30-40 mL立即加入肝素100 U抗凝，在1 h内采用梯度离心法分离淋巴细胞，在显微镜下计数并计算所得淋巴细胞的总量，根据细胞数加入适量冻存液，使其密度为1×10^{10}/L，按每管1 mL装入冻存管内，先在4℃冰箱内过渡30 min，然后放入-70℃冰箱过夜，次日将其转入液氮中长期保存备用.肝癌标本离体后立即将其剖开，更换刀片后，先切取距肿瘤边缘2-5 cm的癌旁组织，然后沿肿瘤边缘切取生长活跃的瘤组织，将所取组织切成3-5 mm的小碎块装入冻存管内，并立即放入液氮中，随后将其转入-70℃冰箱内保存.采用同样的方法，切取和保存作为对照的肝硬化及正常肝组织.对照标本均取自非肿瘤患者，另取正常人的睾丸组织作为阳性对照.

1.2 方法

1.2.1 RNA的提取和测定 将提取RNA用的研钵刷洗干净，经强酸浸泡过夜，用自来水洗净残余酸，用双蒸水清洗3遍，200℃干烤6 h备用.从液氮中取出细胞标本，在37℃水浴箱内快速解冻.以4℃，2 000 r/min离心10 min，弃去冻存液，每10^7个细胞中加入Trizol(美国Gibco公司)1 mL，反复吹打使细胞充分裂解.从-70℃冰箱中取出组织标本约50-100 mg，置入研钵内，在有液氮存在的情况下研成碎末，待液氮干燥后，立即加Trizol 1 mL不断研磨直到完全成为液体后移入1.5 mL离心管中.在上述裂解液中加入氯仿200 μL，用力摇晃15 s，室温放置2-3 min.12 500 g，4℃离心15 min，小心吸取上清液将其移入另一1.5 mL的离心管中，加入异丙醇0.5 mL，于室温放置10 min进行RNA沉淀.12 500 g，4℃离心10 min，小心弃去上清液，加入DEPC处理水配制的750 mL/L乙醇1 mL，将白色RNA沉淀整块吹起进行漂洗.7 500 g，4℃离心5 min后，弃去上清液，再加入750 mL/L乙醇1 mL重复洗涤1次，7 500 g，4℃离心5 min后，小心弃去上清液，吸尽管壁残留的液体.冰上放置5-10 min，待残留的乙醇干燥后，溶于30-80 μL DEPC处理过的纯净水中.取RNA样品4 μL，加无RNA酶的水196 μL稀释50倍，用紫外分光光度计对RNA在260 nm下的吸光度进行定量.RNA浓度(g/L) = A_{260}×核酸稀释倍数×40/1 000.用紫外分光光度计对RNA在260 nm和280 nm下的吸光度A_{260}和A_{280}进行定量，计算A_{260}/A_{280}，所有标本的比值要求在1.75-1.95之间.低于此值者表明其含有蛋白质杂质，用氯仿重新提纯.秤琼脂糖1 g，加入0.5×TBE到总体积为50 mL，配成2%的凝胶，经微波炉加热100 s，冷却到微烫手时加入2.5 μL EB(0.5 g/L)充分混匀后灌胶.取RNA溶液3 μL，加2 μL 0.5×TBE，1 μL 6×Loading Buffer，混匀后上样.在0.5×TBE的电泳液中，以5 V/cm的电压电泳20 min，在紫外灯下观察RNA的电泳带，比较核糖体RNA(rRNA)28 s和18 s两条带，如果在EB作用下显色强度为2∶1，说明本实验提取的RNA比较完整.

1.2.2 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 所用的目的引物和内参照β_2微球蛋白(β_2-MG)引物均委托上海生

工公司合成(表1).所用引物序列参照了以前研究者的设计[16]).将引物按照Qiagen QneStep RT-PCR试剂盒的要求溶解为15 μmol/L，保存在4℃冰箱内备用.目的基因及β_2微球蛋白的RT-PCR扩增:反应体积为50 μL，依次向薄壁PCR管中加入5×Buffer 10 μL，10 mmol/L dNTP 2 μL，15 mol/L SSX-1/NY-ESO-1上游引物2 μL，15 mol/L SSX-1/NY-ESO-1下游引物2 μL，15 mol/L β_2微球蛋白的上游引物2 μL，15 mol/L β_2微球蛋白的下游引物2 μL，混合酶2 μL，RNA溶液可变(每个反应体系所需的RNA模板量为0.5 pg-1 μg，RNA溶液的加样量根据所测浓度而定)，Q-selution 10 μL，无RNA酶水至50 μL.整个加样过程中各种试剂及PCR管均应放在冰上，在加样结束前数分钟打开PCR仪，设定逆转录程序，待PCR仪的温度升至50℃后迅速放入PCR管.先50℃ 30 min，进行逆转录产生cDNA，然后进行PCR扩增.按照试剂盒的要求所有PCR扩增程序的第一步均为94℃，15 min以激活DNA聚合酶，此后步骤分别如下:SSX-1:变性94℃ 45 s，退火52℃ 45 s，延伸72℃ 60 s;NY-ESO-1:变性94℃ 45 s，退火52℃ 45 s，延伸72℃ 45 s;于PCR仪内扩增35个循环，延伸72℃ 12 min.称取琼脂糖2.0 g，加入0.5×TBE到总体积为100 mL，配成15 g/L的凝胶，经微波炉加热90 s，冷却到微烫手后 加入5 μL EB(0.5 g/L)充分混匀后灌胶.取PCR产物5 μL，加1 μL 6×Loading Buffer混匀后上样.在0.5×TBE电泳液中，用5 V/cm的电压电泳45 min，在紫外线灯下观察DNA的电泳带，并用Korda成像系统对产物进行分析.PCR扩增后未出现β_2微球蛋白目的带的样本，表明cDNA，不完整，为排除加样错误重做1次，必要时重新提取该样本的RNA，对于出现β_2微球蛋白目的带的样本进行相关指标的阳性统计.取RT-PCR产物100 μL，在5 V/cm的电压下行20 g/L的琼脂糖凝胶电泳，电泳45 min，在紫外灯下快速切下含目的片段的琼脂糖凝胶，将其放入1.5 mL离心管内.将回收的胶称重.按照每100 mg胶300 mL S1液的比例加入S1液，置50℃水浴10 min，使琼脂糖块完全溶化，每2-3 min颠倒混匀一次.因为目的片段小于500 bp，所以还需向水浴后的胶样中加1/3 S1液体积的异丙醇，混匀.继续50℃水浴1 min.将溶化后的胶样移入吸附柱，12 000 *g*，离心30 s，倒掉收集管中的液体，再将吸附放入同一收集管.在吸附柱中加入500 μL W1液，离心15 s.倒掉收集管中的液体，再将吸附放入同一收集管.离心1 min.将吸附柱放入一个干净的1.5 mL的离心管中，在吸附膜中央加入30 μL T1液，静置1 min后，离心1 min.取3 μL加入2 μL 0.5×TBE 和1 μL 6×Loading Buffer，进行20 g/L的琼脂糖凝胶电泳，对回收产物进行鉴定，如果电泳带很清晰并且无杂带，说明回收和纯化成功.测序:将回收和纯化的样品交给上海生工生物工程技术服务有限公司.测序结果如下:将测序结果与从GeneBank检索的SSX-1(NM_005635)、NY-ESO-1(U87459)基因序列相对照，基本一致，证实所得到的cDNA确为要扩增的目的基因.

表1 PCR所用的引物序列和扩增片段

引物名称	序列	扩增片段(bp)
SSX-1A(5')	5'-CTA AAG CAT CAG AGA AGA GAA GC-3'	
SSX-1B(3')	5'-AGA TCT CTT ATT AAT CTT CTC AGA AA-3'	422
NY-ESO-1(5')	5'-ATG GAT GCT GCA GAT GCG G-3'	
NY-ESO-1(3')	5'-GGC TTA GCG CCT CTG CCC TG-3'	329
β_2-M A(5')	5'-CTC GCG CTA CTC TCT CTT TCT GG-3'	
β_2-M B(3')	5'-GCT TAC ATG TCT CGA TCC CAC TTA A-3'	168

统计学处理 采用SSPS统计软件(10.0版本)进行，所用的统计学方法为χ^2检验，$P<0.05$认为有统计学意义.

2 结果

2.1 SSX-1及NY-ESO-1基因在HCC组织中的表达

在HCC组织中，SSX-1及NY-ESO-1基因mRNA阳性率分别是61.5%和11.5%，PCR产物与阳性对照大小一致(图1A-B);相应的癌旁组织及作为对照的肝硬化和正

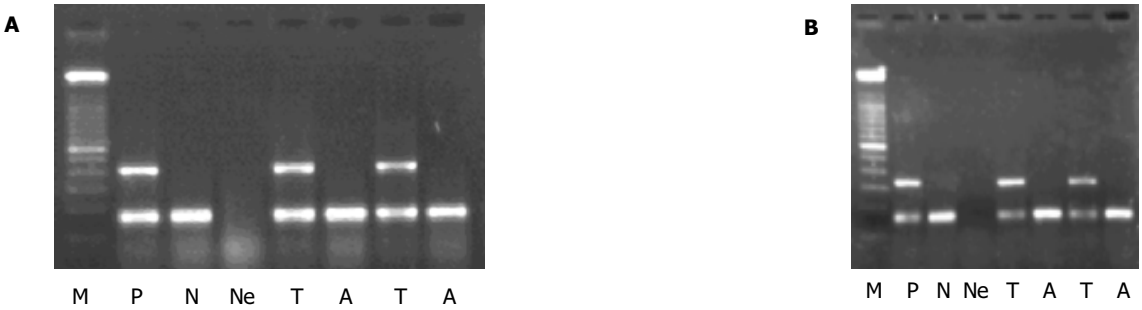


图1 SSX-1及NY-ESO-1基因在肝癌组织中表达电泳图. A: SSX-1; B: NY-ESO-1. T: 肿瘤组织; A: 癌旁组织; N: 对照肝组织; Ne: 空白对照; P: 阳性对照; M: 100 bp DNA marker.

常肝组织中无阳性表达.表达NY-ESO-1的3例标本同时表达SSX-1，二者间未呈现互补关系.阳性对照均为阳性，而空白对照均为阴性，说明结果可靠.实验中发现在不同的HCC标本中SSX-1基因的RT-PCR产物电泳带的亮度存在较大差异，说明SSX-1基因的表达存在差异.随机选取SSX-1，NY-ESO-1表达阳性的PCR产物各1例测序，测序结果表明所得的RT-PCR产物与从GeneBank检索的SSX-1(NM_005635)，NY-ESO-1(U87459)扩增范围序列基本一致，证实所得到的cDNA确为要扩增的目的基因.

2.2 SSX-1及NY-ESO-1表达与临床指标的关系 HCC患者26例，男21例，女5例，年龄17-79(平均53±14.8)岁;随访20例，随访时间最短6-15(平均9.6±2.6)mo，术后6 mo内有7例复发，HBsAg阳性23例，HCV阳性3例，AFP阳性18例，AFP阴性8例;术后病理显示中分化16例，低分化10例;TNM分期III期和IV期各13例.通过统计学分析发现SSX-1及NY-ESO-I基因在HCC组织中的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期、分化程度、血清AFP水平、肝炎病毒感染无显著相关性(P>0.05).但是，在8例AFP阴性的(<20 ng/L)HCC患者中有5例SSX-1基因表达阳性，随访期间复发的7例患者中，组织标本SSX-1基因阳性的5例，阴性的2例，组织SSX-1阳性者的复发率为41.7%(5/12)，阴性的复发率为25%(2/8);组织NY-ESO-1阳性的复发率为0(0/3)，阴性的复发率为41.2%(7/17).

2.3 SSX-1及NY-ESO-1mRNA在HCC患者外周血中的表达 SSX-1mRNA的表达率为38.5%，在组织表达SSX-1mRNA的患者的外周血中的表达率为62.5%(10/16)(图2A);NY-ESO-1的表达率为3.8%，在组织呈阳性的标本中的表达率为33.3%(1/3)(图2B).表达NY-ESO-1的血样不表达SSX-1，二者有互补关系.所有外周血中表达SSX-1或NY-ESO-1mRNA的患者，其肿瘤组织中亦呈表达相应基因.肝癌组织中不表达SSX-1或NY-ESO-1mRNA的患者，其外周血中亦不表达该基因.同法检测20例非肿瘤患者的外周血，未发现这两种基因的表达.统计学分析显示SSX-1及NY-ESO-I基因在HCC患者外周血中的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、TNM分期、分化程度、血清AFP水平、肝炎病毒感染无显著相关性(P>0.05).在8例AFP阴性的(<20 ng/L)HCC患者中有3例其外周血中SSX-1基因表达阳性.随访期间复发的7例患者中有4例外周血SSX-1的表达为阳性，外周血不表达SSX-1基因的3例患者中，有2例其组织标本也不表达SSX-1.外周血SSX-1阳性者的复发率为50%(4/8)，阴性的复发率为25%(3/12);提示外周血SSX-1阳性的患者似乎更易复发，因此以SSX-1基因mRNA为肿瘤标志物，也许可以用于HCC的辅助诊断和作为监测复发、转移和预后的指标.

3 讨论

3.1 SSX-1和NY-ESO-1在HCC中的表达 SSX-1基因位于X_p11.23-$_p$11.22.该基因DNA片段的长度为8 720 bp，含6个外显子，剪辑后的mRNA长度为766 bp，编码188个氨基酸残基的蛋白[17].研究SSX1基因在HCC组织及外周血中的表达，揭示其与HCC的转移，复发及预后间的关系，对于指导临床治疗，探讨其能否作为HCC免疫治疗的靶点，以及监测肿瘤的转移等可能具有重要的意义.NY-ESO-1的上述表达方式及基因位点(位于X染色体)与先前发现的CT基因相同，因此属于CT家族.研究NY-ESO-1mRNA在肝癌组织中的表达情况，及表达NY-ESO-1mRNA的肿瘤播散细胞在循环血液中的存在情况，对于肝癌的免疫治疗可能具有重要意义.我们发现虽然SSX-1基因在HCC组织中的表达与患者的性别，年龄，肿瘤大小及AFP等临床指标间无显著相关性，但是在20例随访患者中，组织SSX-1阳性患者的短期(6 mo)复发率为41.7%(5/12)，阴性患者的复发率为25%(2/8)，外周血中SSX-1阳性患者的短期复发率为50%(4/8)，阴性患者的复发率为25%(2/8)，阳性者明显增高，提示SSX-1阳性的患者可能更易复发，预后差.NY-ESO-1mRNA只在HCC组织中表达，在其相应的癌旁组织及对照的肝

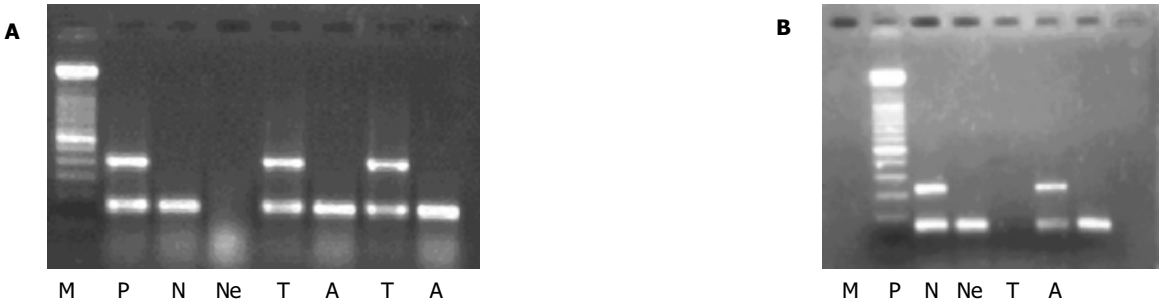


图2 SSX-1及NY-ESO-1基因在肝癌患者外周血中表达电泳图. A: SSX-1; B: NY-ESO-1. T: 肿瘤组织; A: 癌旁组织; N: 对照肝组织; Ne: 空白对照; P: 阳性对照; M: 100 bp DNA marker.

硬化及正常肝组织中均无表达，具有高度特异性，但是表达率偏低，仅为11.5%(3/26)，而且与另一研究指标SSX-1的表达间无互补关系，与各项临床指标间亦无显著相关性.关于NY-ESO-1mRNA在HCC组织中表达的研究不多，Boyer *et al*[16]报道的检测结果为0(0/22)，Chen *et al*[18]报道的为36.7%，我们的研究结果介于二者之间，显示NY-ESO-1基因在HCC组织中呈低表达.虽然NY-ESO-1在HCC中呈低表达，但是有研究表明，50%的NY-ESO-1阳性的黑色素瘤患者体内可检测到NY-ESO-1抗体，这一比例是已发现的CT抗原中最高的，而且已经发现了NY-ESO-1抗原肽的CTL表位(HLA-A2)，并证实NY-ESO-1抗原能在患者体内同时引发抗肿瘤的体液和细胞免疫，因此，如能证实 NY-ESO-1抗原在其阳性的HCC患者中也能引发如此高比例的细胞和/或体液免疫，那么NY-ESO-1抗原有可能成为NY-ESO-1阳性HCC患者最有效的免疫治疗靶点，但这有待于进一步研究证实.

3.2 以SSX-1及NY-ESO-1mRNA为标记检测外周血中的肿瘤播散细胞 对于血液中的肿瘤播散细胞(DTC)的检测，已经开展了约半个世纪，多数研究集中于DTC在骨髓中的检测.因为外周血中的DTC的含量较骨髓中的更少，因而对检测方法的灵敏度要求更高，常规的方法，包括用于检测骨髓中DTC的免疫细胞/组织化学技术(ICC/IHC)也不能满足其要求，所以对于外周血中DTC的检测主要开展于更灵敏的RT-PCR技术诞生后的近10 a间，尤其是近5-6 a.将RT-PCR技术用于检测外周血中的DTC具有两大优势:(1)他是目前用于检测DTC灵敏度最高的方法，依据不同的条件，其灵敏度可达1/(10^6-10^8)，体外试验中可以从1 mL全血中检测出一个肿瘤细胞[5];(2)因为mRNA分子极不稳定,而组织及血液中的RNA酶又无处不在,所以体内游离以及凋亡细胞中的mRNA会立即被RNA酶降解.因此如能从外周血中扩增出靶mRNA序列，即表明其中含有存活的靶细胞.如果所用mRNA具有肿瘤特异性，那么阳性结果将表明，外周血中存在活的肿瘤细胞.尽管对于外周血中的肿瘤细胞的临床意义，仅仅是代表从原发瘤脱落的无转移能力的肿瘤细胞，还是代表着转移播散?一直存在争议，但是有一个不容忽视的事实，即脱离原发灶的肿瘤细胞，如果不通过血液循环就不可能到达远隔器官形成转移灶，例如，肝癌的肺转移及脑转移.从这个角度来看，外周血中的肿瘤细胞与肿瘤的转移与复发间应该存在某种联系，近10 a来，已有相当一部分研究结果肯定了外周血中肿瘤细胞的临床意义.因此，选择肿瘤特异性mRNA为标记，检测肿瘤患者外周血中的肿瘤细胞，对于监测肿瘤的转移，复发及指导临床治疗可能具有重要意义.

以往的文献表明，SSX-1和NY-ESO-1mRNA具有肿瘤特异性[14, 19].本实验也证实二者在HCC组织中高特异性表达，适合于作为检测外周血中肿瘤细胞的标志，尤其是SSX-1，不但高度特异，而且还具有较高的表达率.本研究发现.(1)SSX-1mRNA在非肿瘤患者的外周血中的表达率为0，而在HCC患者外周血中的表达率为10/26，提示其具有辅助诊断的价值;(2)37.5%(3/8)的AFP正常患者的外周血中SSX-1mRNA阳性，提示二者联合应用可能有助于提高HCC的检出率.(3)外周血SSX-1mRNA阳性患者的短期复发率为50%(4/8)，阴性患者的复发率为25%(3/12)，虽然因例数较少不具有统计学意义，但提示外周血中SSX-1mRNA阳性的患者似乎更易复发.(4)虽然外周血中的NY-ESO-1mRNA阳性率很低，仅为3.8%(1/26)，但是与SSX-1mRNA在外周血中的表达有互补关系，因而仍有应用价值.

总之，本实验得到了以下发现:(1)SSX-1和NY-ESO-1基因在肝癌组织中高特异性表达，有望成为HCC的特异性免疫治疗新的潜在靶位;(2)SSX-1及NY-ESO-1mRNA在HCC外周血中高特异性表达，以他们为标记检测患者外周血中的肝癌细胞，对于HCC具有定性诊断价值;(3)部分AFP正常(<20 ng/L)HCC患者的外周血中有SSX-1mRNA的表达，提示二者联合应用有助于提高HCC的检出率.(4)表达SSX-1mRNA的HCC患者的短期复发率明显增高，提示可将SSX-1mRNA作为监测HCC患者复发、转移和预后的指标.

4 参考文献

1 Tang ZY, Yu YQ, Zhou XD, Ma ZC, Wu ZQ. Progress and prospects in heptocellular carcinorma surgery. *Ann Chir* 1998; 52:558-563

2 Ghossein RA, Osman I, Bhattacharya S, Ferrara J, Fazzari M, Cordon-Cardo C, Scher HI. Detection of prostatic specific membrane antigen messenger RNA using immunobead reverse transcripatase polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1999;8:59-65

3 Müller C, Petermann D, Pfeffel F, Oesterreicher C, Fugger R. Lack of specificity of albumin-mRNA–positive cells as a marker of circulating hepatoma cells. *Hepatology* 1997;29:879-879

4 Lemoine A, LeBricon T, Salvucci M, Azoulay D, Pham P, Raccuia J, Bismuth H, Debuire B. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein mRNA in humans during liver surgery. *Ann Surg* 1997;226:43-50

5 Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Hoshina T, Hara T. Immunotherapy with autologous dendritic cells and tumor-specific synthetic peptides for synovial sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:220-223

6 Tureci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5211-5216

7 Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci*

USA 1997;94:1914-1918
8 Chen YT, Gure AO, Tsang S, Stockert E, Jager E, Knuth A, Old LJ. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogenic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6919-6923
9 Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, Kudo J, Takenaka K, Itoh K, Niho Y. High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;24:1437-1440
10 Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1999;85:1234-1240
11 Jager D, Stockeert E, Karbach J, Herrlinger K, Atmaca A, Arand M, Chen YT, Gnjatic S, Old LJ, Knuth A, Jager E. Urine antibody against human cancer antigen NY-ESO-1. *Cancer Immunity* 2002;2:10
12 Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, Gill S, Shipley J, Chan AM, Gusterson BA, Cooper CS. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t (X;18)(p11. 2;q11. 2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 1994;7:502-508
13 Crew AJ, Clark J, Fisher C, Gill S, Grimer R, Chand A, Shipley J, Gusterson BA, Cooper CS. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J* 1995;14:2333-2340
14 Dos Santos NR, Torensma R, de Vries TJ, Schreurs MW, de Bruijn DR, Kater-Baats E, Ruiter DJ, Adema GJ, van Muijen GN, van Kessel AG. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res* 2000;60:1654-1662
15 Tureci O, Chen YT, Sahin U, Gure AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, Pfreundschuh M. Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* 1998;77:19-23
16 Chen YT, Boyer AD, Viars CS, Tsang S, Old LJ, Arden KC. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79:237-240
17 Lee SY, Obata Y, Yoshida M, Stockert E, Williamson B, Jungbluth AA, Chen YT, Old LJ, Scanlan MJ. Immunomic analysis of human sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2651-2656
18 Chen CH, Chen GJ, Lee HS. Expressions of cancer-testis antigens in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett* 2001;164:189-195
19 Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1998;16:128-132

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物，可作为理工科研究生的教学用书或自学教材，也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览.

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍，介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作，通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity)，分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写，举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项，总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范.

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题，结合实例举证，从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达，较为详尽地总结了英文标点符号的使用，从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系，综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动.

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料，书中按章节形式标引了参考文献约220篇(次).

编著: 任胜利，理学博士，《自然科学进展》责任编辑，1998年以来先后在Science，Nature，Scientometrics，Learned Publishing，《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文30余篇. 出 版:科学出版社. 定 价: 28元+2元(邮费). 邮购地址: 100085，国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室，北京市海淀区双清路83号. 联 系人: 刘俐，程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921.开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开 户 名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社，帐 号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1679-1683
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

重组人内皮抑素真核表达载体 pCD–sEndo 的构建和表达

邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林

邵俊伟, 卢绮萍, 广州军区武汉总医院普通外科 湖北省武汉市 430070
刘然义, 黄文林, 中山大学肿瘤研究所 广东省广州市 510060
易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科
湖北省武汉市 430030
邵俊伟, 男, 1970–01–15 生, 湖北省孝感市人, 汉族, 2004 年华中科技大学同济医学院医学博士毕业, 主治医师, 主要从事肝胆外科治疗和基础研究.
通讯作者: 邵俊伟, 430070, 湖北省武汉市武昌珞狮路 76 号书香门第 801, 广州军区武汉总医院普通外科. sjwsjw555555@yahoo.com
电话: 027–87164789
收稿日期: 2005–05–19 接受日期: 2005–06–08

Construction of recombinant eukaryotic expression vector for human endostatin and its expression in liver cancer cell line SMMC-7721

Jun-Wei Shao, Ran-Yi Liu, Ji-Lin Yi, Ji-Ping Lu, Wen-Lin Huang

Jun-Wei Shao, Ji-Ping Lu, Department of General Surgery, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Wuhan 430070, Hubei Province, China
Ran-Yi Liu, Wen-Lin Huang, Institute of Oncology, Zhongshan University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China
Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Jun-Wei Shao, Department of General Surgery, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Command of Chinese PLA, 801 Shuxiang Mendi, 76 Wuchang Lushi Road, Wuhan 430070, Hubei Province, China. sjwsjw555555@yahoo.com
Received: 2005-05-19 Accepted: 2005-06-08

Abstract

AIM: To construct the recombinant eukaryotic expression vector for human endostatin and express it in human liver cancer cell line SMMC-7721, and to observe its anti-angiogenesis activity *in vitro*.

METHODS: Human endostatin cDNA containing interleukin-2 (IL-2) secreting peptide was cloned into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.0 to construct recombinant plasmid pCD-sEndo. The plasmid pCD-sEndo was transfected intoSMMC-7721 cells by cationic liposome. The positive cell clones were selected by G418 and named SMMC/sEndo. The expression of endostatin protein was analyzed by Western-blot. The activity of endostatin protein in the supernatant of SMMC/sEndo cells was explored by the angiogenesis experiment of chicken chorioallantoic membrane (CAM).

RESULTS: The eukaryotic expression vector pCD-sEndo was successfully constructed and was confirmed by enzyme digestion and sequence analysis. The endostatin protein was expressed in the supernatant of SMMC/sEndo cells, about 20 ku in size. No expression of endostatin protein was found in the control cells. There were fewer blood vessels in the CAM treated with endostatin protein, and the blood vessel density markedly decreased. Furthermore, the density decreased with the increase of endostatin protein.

CONCLUSION: The recombinant eukaryotic expression vector is correctly constructed. The human endostatin protein with the activity of anti-angiogenesis can be expressed and secreted in the supernatant of SMMC-7721 cells tranfected with pCD-sEndo.

Key Words: Endostatin; Recombinant eukaryotic expression vector; Liver cancer

Shao JW, Liu RY, Yi JL, Lu JP, Huang WL. Construction of recombinant eukaryotic expression vector for human endostatin and its expression in liver cancer cell line SMMC-7721. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1679-1683

摘要

目的: 构建表达人内皮抑素的重组真核表达载体，并将其转染人肝癌 SMMC–7721 细胞，观察其体外抑制血管生成的活性.

方法: 将含有 IL–2 分泌肽的人 endostatin 全长 cDNA 插入真核表达载体 pcDNA3.0 产生重组质粒 pCD–sEndo，利用阳离子脂质体介导将其体外转染人肝癌细胞SMMC–7721 细胞，G418 筛选后得到阳性克隆，并被命名为 SMMC/sEndo，采用 Western–blot 检测转染细胞上清中 endostatin 蛋白的表达，鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管生成实验检测转染细胞上清中内皮抑素蛋白的生物活性.

结果: 成功构建 endostatin 基因的真核表达质粒 pCD–sEndo 并经酶切和序列测定证实，通过阳离子脂质体转染 SMMC–7721 细胞，Western–blot 显示转染细胞上清有人 endostatin 蛋白的表达，M_r 20 000，而转然空质粒对照组未检测到目的蛋白.CAM实验显示在给予内皮抑素蛋白的鸡胚绒毛膜血管稀疏，血管密度明显减少，并且随着蛋白量的增加，血管减少程度加强.

结论: 重组 endostatin 真核表达质粒构建正确，转染

SMMC-7721细胞后可有效表达具有生物学活性的人endostatin蛋白并能分泌到细胞外.

关键词: 内皮抑素; 重组真核表达载体; 肝癌

邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林. 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1679-1683
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1679.asp

0 引言

肿瘤的生长和转移依赖于血管生成，在缺乏血管供血的条件下，肿瘤将趋向于休眠状态，肿瘤细胞发生坏死和凋亡,这为肿瘤治疗提供了一条新思路[1].目前已发现多种因子具有抑制肿瘤血管生成的活性，其中内皮抑素(endostatin)效果最为理想[2-3].内皮抑素理化性质活泼，易变性，分离提纯过程复杂，大量获取比较困难，价格昂贵，采用基因治疗方法，在体内直接、持续表达内皮抑素，可避免其体外失活快和需反复注射的缺点.我们成功构建了分泌型人内皮抑素的真核表达质粒pCD-sEndo，将其转染肝癌细胞系SMMC-7721，为肝癌的基因治疗奠定实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 携带人内皮抑素基因的质粒pGEM-sEndo由中山大学肿瘤防治中心黄文林教授赠送，含人IL-2信号肽序列，IL-2信号肽序列加内皮抑素序列endostatin cDNA全长为666 bp，位于克隆载体pGEM-T的2个*Xba*I酶切位点间;真核表达载体pcDNA3.0，购自Invitrogen公司，其全长5.4 kb，含有CMV启动子，多克隆位点，氨苄青霉素(Amp^r)和新霉素(Neo^r)抗性基因选择标记;DNA大量制备纯化试剂盒、限制性内切酶*Eco*RI，*Hin*dIII，*Xba*I和小牛肠碱性磷酸酶(*CIAP*)及T4连接酶，TaqDNA聚合酶，Oligo(dT)，购自Promega公司;脂质体Dosper Liposomal Transfection Reagent购自Boehringer Mannheim公司;兔抗人endostatin多克隆抗体购自Chemicon International公司，二抗及其他免疫组织化学试剂购自武汉博士德公司.

1.2 方法 采用互补黏性末端连接构建质粒pCD-sEndo: pGEM-sEndo与pcDNA3.0经*Xba*I酶切、电泳鉴定后，冻融法凝胶回收DNA片段;线性化真核表达载体pcDNA3.0去磷酸化处理;将pcDNA3.0 0.1 μg，sEndostatin片段0.1 μg，T4DNA连接酶2U混匀后，置12-16℃保温瓶中温育16 h，取连接物(pCD-sEndo)5 μL转化感受态大肠杆菌DH-5α.应用Primer软件辅助设计endostatin基因 PCR引物(上海博亚生物技术有限公司合成)为:Sense:5'-CGACTTCCAGTGCTTCCAG-3'(Endo90-108)Antisense:5'-ACGATGTAGGCGTGATGGC-3'(Endo515-497)，扩增片段约426 bp，挑取LB培养基中氨苄青霉素筛选的抗性克隆菌落，加入500 μL Amp^+ LB培养液中，培养3 h，取出100 μL煮沸，12 000 *g*离心10 min，取上清作为PCR模板，用pGEM-sEndo菌种作为阳性对照，阴性对照为DH5α菌种，反应体系:10×PCR buffer(含Mg^{2+})5.0 μL，10 μmol/L dNTPs mix 1.0 μL，Sense(10 μmol/L)2.0 μL，Antisense(10 μmol/L)2.0 μL，Taq DNA聚合酶(5 MU/L)0.5 μL，ddH_2O_2 38.5 μL，模板1.0 μL(总共50.0 μL);PCR反应条件:94℃变性30 s，54℃退火30 s，72℃延伸1 min.35次循环后，在72℃继续延伸10 min，取PCR产物5 μL于15 g/L琼脂糖凝胶电泳.挑取经过PCR筛选的阳性克隆菌落，接种培养扩增，小量抽提重组质粒pCD-sEndo，分别与*Eco*RI、*Xba*I内切酶混匀后，置于37℃水浴3 h，取各酶切样品5 μL在80V恒压下电泳2 h，紫外灯下观察结果，用Olympus电泳成像系统成像.将构建的重组质粒pCD-sEndo送上海博亚生物技术有限公司，检测载体pcDNA3.0上2个多克隆位点之间插入片段序列，测序引物为T7和Sp6通用引物.

人肝癌细胞株SMMC-7721由华中科技大学同济医学院免疫学教研室馈赠，复苏后用100 mL/L新生牛血清RPMI1640培养基，在37℃ 50 mL/L CO_2条件下培养，培养液中加入青霉素100 kU/L，链霉素100 mg/L，常规传代.脂质体Dosper介导重组质粒pCD-sEndo转染SMMC-7721细胞:参见Dosper转染试剂盒制备脂质体Dosper和质粒的混合液，6孔培养板中每孔接种3×10^5个SMMC-7721细胞，至细胞长满约50%左右，更换细胞培养板中的培养液，加入脂质体质粒混合液，37℃ 50 mL/L CO_2温育6 h，去掉脂质体质粒混合液，重新加入新鲜培养基2.5 mL.抗性克隆细胞筛选:(1)SMMC-7721细胞培养于24孔培养板，给予G418分别用100、200、300、400、500、600 mg/L加入，各浓度3复孔，设正常对照3复孔，以10-14 d细胞全部死亡的浓度为G418筛选浓度，结果为400 mg/L.(2)转染细胞继续培养12-36 h,使转移基因得到表达，用含400 mg/L G418的完全培养基进行加压筛选，持续培养14 d后，筛选出来的抗性克隆细胞命名为SMMC/sEndo.挑取单个阳性克隆，继续在G418抗性培养液内筛选2 wk，将筛选转染成功的细胞扩大培养，待细胞接近汇合时，换无血清的培养基2 mL继续培养24 h，收集培养液，于4℃下，10 000 *g*离心5 min，除去死细胞和碎片，取上清，BCA法测定蛋白浓度,用离心式超滤浓缩装置(美国Millipore公司)浓缩，将转染空质粒的SMMC-7721细胞培养上清

同法处理作为对照，进行SDS-PAGE电泳，利用电转法将蛋白质转到硝酸纤维素膜上，封闭液处理，加入兔抗人endostatin多抗(用0.01 mol/L PBS按1∶200比例稀释)温育，用0.01 mol/L PBS分别洗膜，加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(用0.01 mol/L PBS按1∶500比例稀释)温育，充分洗膜后，加入显色液，避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应，以10 g/L BSA取代一抗作为阴性对照重复实验.检测转染重组质粒的SMMC-7721细胞培养上清对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响:将2 d龄的鸡胚用碘酒和酒精消毒后，在超净工作台用眼科尖嘴镊小心敲开蛋壳，用一次性注射器在壳膜下胎盘细胞周围的绒毛尿囊膜中分别注射0.005，0.01，0.02 mg浓缩后含内皮抑素蛋白的细胞分泌上清，但不要损坏胚盘细胞，然后用无菌的保鲜膜覆盖蛋壳缺口，避免蛋清直接与空气接触，放入37℃培养箱中培养4 d，每4 h翻动一次，5 d后打开保鲜膜，扩大蛋壳缺口，观察鸡胚绒毛膜血管生成情况，并用彩色相机摄影保存.

2 结果

质粒pGEM-sEndo经*Eco*RI和*Xba*I酶切后，电泳结果与其基因酶切图谱一致(图1).将重组质粒pCD-sEndo转化大肠杆菌DH5α，取培养细菌裂解上清为模板，行PCR检测，结果显示菌落2，3，4，5，10，11，12皆扩增出与阳性对照相同的约430 bp条带，与实验设计的预期结果一致，说明菌落2，3，4，5，10，11，12皆为转化了pCD-sEndo的阳性克隆(图2).把PCR筛选的阳性克隆菌落，继续接种培养，重组质粒抽提纯化后经过*Hin*dIII，*Xba*I，*Eco*RI以及*Eco*RI和*Xba*I双酶切鉴定，*Hin*dIII仅切出一约6.1 kb片段，*Xba*I切出5.4 kb和670 bp 2个片段，说明阳性克隆中已插入含IL-2信号肽序列的endostatin cDNA片段(sEndostatin)，*Eco*RI酶切切出6.0 kb和130 bp 2个片段(130 bp片段在电泳时看不到)，*Eco*RI和*Xba*I双酶切切出5.4 kb、580 bp、84 bp和45 bp 4个片段(84 bp和45 bp 2个片段在电泳时看不到)，说明sEndostatin插入方向正确(图3).将纯化的重组质粒用T7和Sp6通用引物检测pcDNA3.0载体上的外源插入片段，测得外源基因插入片段全长666 bp，包含人内皮抑素的完整序列和人IL_2信号肽序列，无任何碱基错配，证实重组质粒构建正确(图4).转染内皮抑素基因的SMMC-7721细胞上清，离心过滤后，BCA比色法检测培养液蛋白浓度为50 mg/L，浓缩后行SDS-PAGE和Western-blot检测，结果在转染endostatin基因的SMMC-7721细胞培养液上清中可以检测到能与endostatin抗体发生特异性抗原抗体反应的条带，M_r 20 000，与人内皮抑素蛋白分子量一致，说明转染endostatin基因的SMMC-7721细胞上清中有目的蛋白的表达(分泌型)，而转染空质粒对照组未检测到目的蛋白(图5).鸡胚绒毛尿囊膜实验显示在给予内皮抑素蛋白的鸡胚绒毛膜血管稀疏，血管密度明显减少，并且随着蛋白量的增加，血管减少程度加强(图6).

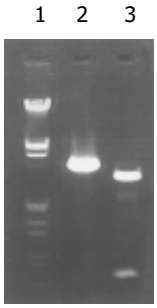


图1 质粒pGEM-sEndo酶切鉴定. 1: λDNA/*Hin*dIII+*Eco*RI Marker; 2: pGEM-sEndo/*Eco*RI; 3: pGEM-sEndo/*Xba*I.

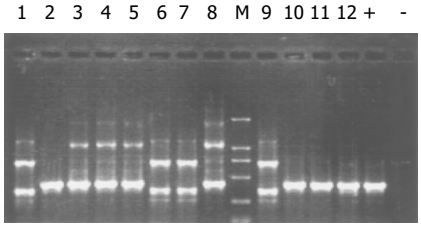


图2 PCR筛选阳性菌落. M: DL2000 DNA marker; 1-12为菌落编号; +: 阳性对照; -: 阴性对照.

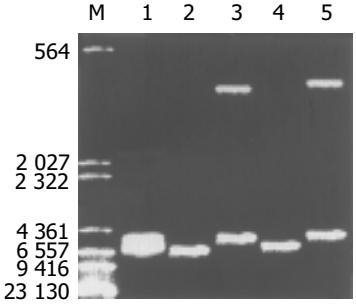


图3 pCD-sEndo的酶切分析. M:λ-*Hin*d Ⅲ; 1: pcDNA3.0; 2: pCD-sEndo; 3: pCD-sEndo/*Xba*I; 4: pCD-sEndo /*Eco*RI; 5: pCD-sEndo经*Xba*I和*Eco*RI双酶切.

3 讨论

研究显示，在乳腺癌[4]、前列腺癌[5]、肺癌[6-8]、胃癌[9-10]、宫颈癌[11]、卵巢癌[12-13]及头颈部鳞状上皮癌[14]等患者中其肿瘤的转移率、预后及存活率和肿瘤的血管密度呈正相关.因此，抑制血管生成可能是治疗肿瘤的有效方法，但是一般抗血管形成药物只能使肿瘤生长减缓，而不能使之完全消除[15]，从肿瘤组织中

TCTAGATAAGATCCGGCGAAGGAGGGCCACCATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAT
TGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACGAATTCGGCCCACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGT
GCTCCACCTGGTTGCGCTCAACAGCCCCCTGTCAGGCGGCATGCGGGGCATCCGCGGGG
CCGACTTCCAGTGCTTCCAGCAGGCGCGGGCCGTGGGGCTGGCGGGCACCTTCCGCGCC
TTCCTGTCCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCATCGTGCGCCGTGCCGACCGCGCAGC
CGTGCCCATCGTCAACCTCAAGGACGAGCTGCTGTTTCCCAGCTGGGAGGCTCTGTTCTC
AGGCTCTGAGGGTCCGCTGAAGCCCGGGGCACGCATCTTCTCCTTTGACGGCAAGGACG
TCCTGAGGCACCCCACCTGGCCCCAGAAGAGCGTGTGGCATGGCTCGGACCCCAACGG
GCGCAGGCTGACCGAGAGCTACTGTGAGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTCGGCCACG
GGCCAGGCCTCCTCGCTGCTGGGGGGCAGGCTCCTGGGGCAGAGTGCCGCGAGCTGCC
ATCACGCCTACATCGTGCTCTGCATTGAGAACAGCTTCATGACTGCCTCCAAGTAGGCTA
GATCCGATCCACCGGATCTAGA

图4 重组质粒测序结果."═══"为人内皮抑素基因序列，"——"为IL_2信号肽序列，"- - -"为*Xba*I位点，"-.-."为*Eco*RI位点.

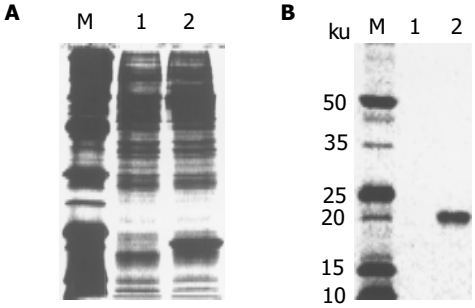


图5 SMMC-7721细胞培养液上清中endostatin蛋白检测分析. A: SDS-PAGE; B: Western-blot; M: 分子质量标准; 1: 对照组; 2: 导入endostatin基因组.

发现的血管形成抑制因子，包括angiostatin[16-17]，endostatin[18]，他们对血管生成抑制作用更强[19-21]. 内皮抑素为胶原蛋白XVIII的C端球形末端部分片段或其类似物[2-3]，在体外和体内已证实能对多种移植的实体肿瘤及其转移物有完全抑制作用[22-25]，Boehm *et al*[26]发现在经过6轮重复治疗后，肿瘤对之仍然敏感，而且未发现毒性和耐药性. 有报道用病毒载体在小鼠身上可明显抑制肿瘤的生长[27-30]，然而病毒载体的毒性问题限制了其基因治疗的推广，用质粒载体可以显著降低毒性. 我们采用分子重组技术，从质粒pGEM-sEndo上切下内皮抑素与人IL_2信号肽序列，定向插入真核表达载体pcDNA3.0，构建人内皮抑素分泌型真核表达质粒pCD-sEndo，通过酶切和测序显示，其中的Endostatin cDNA序列与已知的人Endostatin cDNA序列完全相同，全长552 bp，无任何碱基错配，融合基因全长666 bp，读码框架和插入方向完全正确，保证了表达产物的正确性. 重组质粒具有载体pcDNA 3.0的优点，具有原核和真核细胞的筛选标志，便于阳性细胞的筛选，并且由于携带有人IL_2信号肽序列，因此转染细胞具有外分泌的功能，可以成功分泌内皮抑素蛋白到组织中发挥其生物学活性，插入的片段位于CMV启动子下游，基因的转录是由CMV启动子启动，CMV启动子转录效率较其他的启动子高，这也有助于内皮抑素高效的表达. 我们通过阳离子介导内皮抑素基因转染肝癌细胞后，实验证明在稳定转染endostatin基因的SMMC-7721细胞培养液中Western-blot检测到M_r 20000的endostatin蛋白，表明带有IL-2分泌信号肽的内皮抑素基因转染SMMC-7721细胞后，可以诱导细胞分泌表达内皮抑素蛋白，并且通过鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验证实了其具有抑制血管生成的活性，其活性呈剂量依赖关系，血管内皮抑素只特异性作用于处于增殖状态的新生血管内皮细胞，而不影响静止的血管内皮细胞及其他正常细胞. 因此重组人血管内皮抑素可有效抑制供肿瘤生长的新生血管，而对正

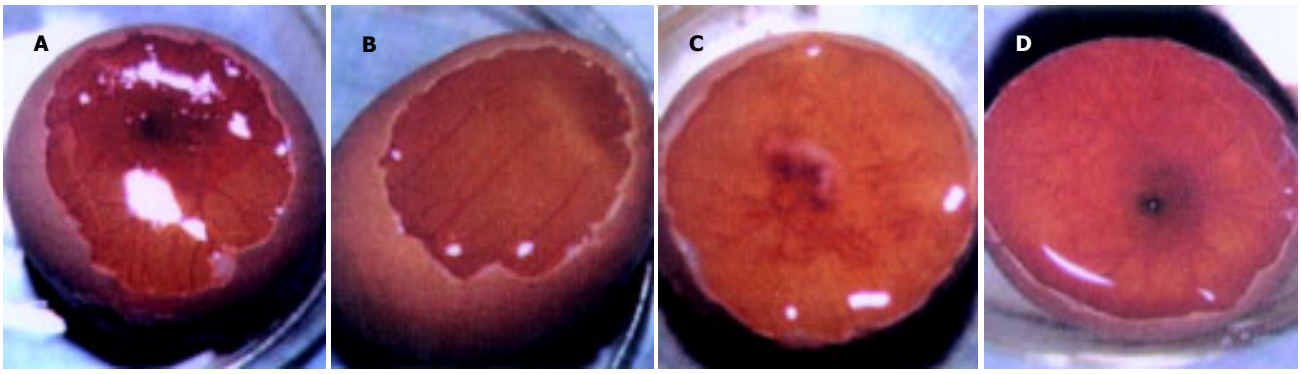


图6 浓缩的细胞上清抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管生成. A: 5 μg; B: 10 μg; C: 20 μg; D: 对照组.

常组织无作用，更因血管内皮抑素并不直接作用于肿瘤细胞，因此不存在形成肿瘤耐药的问题，本研究为内皮抑素基因治疗实验打下了基础.

4 参考文献

1 Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res* 2000;79:1-38

2 Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 1998;17:4249-4256

3 Zatterstrom UK, Felbor U, Fukai N, Olsen BR. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2000;25:97-101

4 Cao Y, Paner GP, Kahn LB, Rajan PB. Noninvasive carcinoma of the breast: angiogenesis and cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:893-896

5 Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L, Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer:relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol* 2000;17:445-451

6 Zou D, Shibuya M, Shinoda K, Hibino S, Matsuda K, Takenaka K, Gemma A, Kudoh S. The difference of angiogenesis in human lung adenocarcinoma cell lines with different metastatic potency. *J Nippon Med Sch* 2004;71:181-189

7 Kim TE, Murren JR. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: a new target for therapy. *Am J Respir Med* 2002;1:325-38

8 Angeletti CA, Lucchi M, Fontanini G, Mussi A, Chella A, Ribechini A, Vignati S, Bevilacqua G. Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (stage IIIA-N2). impact of adjuvant therapies in a subset of patients at high risk of recurrence. *Cancer* 1996;78:409-415

9 Wada N, Otani Y, Kubota T, Kimata M, Minagawa A, Yoshimizu N, Kameyama K, Saikawa Y, Yoshida M, Furukawa T, Fujii M, Kumai K, Okada Y, Kitajima M. Reduced angiogenesis in peritoneal dissemination of gastric cancer through gelatinase inhibition. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:431-435

10 Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1604-1606

11 Terlikowski S, Lenczewski A, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Kulikowski M. Tissue expression of VEGF as a prognostic factor in early cervical squamous cell carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;2:112-113

12 Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, Sukhatme VP, Ramakrishnan S. Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res* 2000;60:2190-2196

13 Guenther U, Herbst H, Bauer M, Isbert C, Buhr HJ, Riecken EO, Schuppan D. Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 2001;85:1540-1545

14 Shemirani B, Crowe DL. Head and neck squamous cell carcinoma lines produce biologically active angiogenic factors. *Oral Oncol* 2000;36:61-66

15 Cao Y, Chen C, Weatherbee JA, Tsang M, Folkman J. Gro-beta, a-C-X-C-chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice. *J Exp Med* 1995;182:2069-2077

16 Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA. Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J* 1999;340(Pt 1):77-84

17 O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS* 1997;79:273-294

18 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285

19 Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, von Recum HA, Yuan J, Kamihara J, Flynn E, D'Amato R, Folkman J, Mulligan RC. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4605-4610

20 Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2811-2816

21 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

22 Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Endostatin gene therapy delivered by Salmonella choleraesuis in murine tumor models. *J Gene Med* 2004;6:1382-1393

23 Kruger EA, Duray PH, Tsokos MG, Venzon DJ, Libutti SK, Dixon SC, Rudek MA, Pluda J, Allegra C, Figg WD. Endostatin inhibits microvessel formation in the ex vivo rat aortic ring angiogenesis assay. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:183-191

24 Blezinger P, Wang J, Gondo M, Quezada A, Mehrens D, French M, Singhal A, Sullivan S, Rolland A, Ralston R, Min W. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the Endostatin gene. *Nat Biotechnol* 1999;17:343-348

25 Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman M, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:11721-11726

26 Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404-407

27 Calvo A, Feldman AL, Libutti SK, Green JE. Adenovirus-mediated endostatin delivery results in inhibition of mammary gland tumor growth in C3 (1)/SV40 T-antigen transgenic mice. *Cancer Res* 2002;62:3934-3938

28 Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4802-4807

29 Heideman DA, van Beusechem VW, Bloemena E, Snijders PJ, Craanen ME, Offerhaus GJ, Derksen PW, de Bruin M, Witlox MA, Molenaar B, Meijer CJ, Gerritsen WR. Suppression of tumor growth, invasion and angiogenesis of human gastric cancer by adenovirus-mediated expression of NK4. *J Gene Med* 2004;6:317-327

30 Feldman AL, Restifo NP, Alexander HR, Bartlett DL, Hwu P, Seth P, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice. *Cancer Res* 2000;60:1503-1506

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1684-1687
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达

丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王 斌

丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌, 青岛大学医学院微生物教研室 山东省青岛市 266021
丁守怡, 女, 1959-10-29 生, 山东青岛人, 汉族, 高级实验师, 主要从事细胞与分子生物学研究, 发表相关论文 10 多篇.
通讯作者: 王斌, 266021, 山东省青岛市登州路 38 号, 青岛大学医学院微生物教研室.
收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

Identification of protein differently expressed between hepatoma cell line and Hepatitis B Virus-transfected hepatoma cell line

Shou-Yi Ding, Dong-Meng Qian, Zhi-Yong Yan, Xu-Xia Song, Wen-Feng Mou, Bin Wang

Shou-Yi Ding, Dong-Meng Qian, Zhi-Yong Yan, Xu-Xia Song, Wen-Feng Mou, Bin Wang, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, China
Correspondence to: Bin Wang, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, China.
Received: 2005-04-15 Accepted: 2005-05-14

Abstract

AIM: To detect the different protein expression between Hepatitis B Virus (HBV)-transfected hepatoma cell line (HepG2.2.15) and its parental cell line (HepG2) *in vitro* using the surfase-enhenced laser desorption/ionization (SELDI) protein chip.

METHODS: HepG2 and HepG2.2.15 cell lines were cultured by routine method and then collected. All the cells were lysed when they were in good conditions, and the protein expression in the lysate was detected by WCX2 chip using surfase-enhenced laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS).

RESULTS: Ninety-one proteins were captured by WCX2 chip, of which nineteen were differently expressed between HepG2.2.15 and HepG2 cells. Among the nineteen proteins, nine were up-regulated and ten were down-regulated in HepG2 cells. After search in SWISS-PROT, the protein with M_r11081 was found accordant to calcium-binding protein S100A10, and the other ones were not confirmed yet.

CONCLUSION: SELDI protein chip platform is simple, sensitive and repeatable in the detection of differently expressed proteins, whose specific biological markers play important roles in screening and identifying the marker proteins of the cells from different types of liver cancer, between hepatoma cell line and HBV-transfected hepatoma cell line.

Key Words: SELDI protein chip; Hepatocellular carcinoma; Protein expression

Ding SY, Qian DM, Yan ZY, Song XX, Mou WF, Wang B. Identification of protein differently expressed between hepatoma cell line and Hepatitis B Virus-transfected hepatoma cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1684-1687

摘要

目的: 运用 SELDI 蛋白质芯片技术检测体外培养的肝癌细胞株(HepG2)与转染乙肝病毒的肝癌细胞株(HepG2.2.15)蛋白质的差异表达，从而为进一步研究肝癌的发病机制奠定基础.

方法: 常规培养上述两种细胞，细胞状态良好时收集细胞,裂解细胞后采用 SELDI-TOF-MS技术用WCX2芯片检测 HepG2、HepG2.2.15 蛋白质组学的差异.

结果: WCX2 芯片共捕获 91 个蛋白，其中 HepG2、HepG 2.2.15 细胞差异蛋白共 19 个，9 个蛋白在 HepG2 细胞中表达量增高，10 个蛋白在 HepG2 细胞中表达量降低.通过在 Swiss 蛋白数据库中搜索，发现 M_r 11 081 蛋白与钙结合蛋白 S100 A10 相符，其他几种蛋白暂时寻找不到.

结论: SELDI蛋白芯片技术检测肝癌细胞株与转染乙肝病毒的肝癌细胞株蛋白质的差异表达方法简便，敏感性高,重复性好,本文发现的这些组织特异性蛋白生物标记对我们从血清或组织标本中筛选和鉴定不同型别肝癌细胞之间的标志蛋白有重要意义.

关键词: SELDI 蛋白质芯片; 肝癌; 蛋白表达

丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌. 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1684-1687
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1684.asp

0 引言

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，其死亡率居第二.且确诊时已属晚期，缺乏有效的治疗，因此，需要探索一种快速、简单、灵敏度高、特异性好的早期诊断技术.任何疾病在出现病理变化之前，细胞内的蛋白质在成分和数量上都会有相应的改变，癌症的发生是一个多基因多阶段多因子的动力学过程.HCC也不例外，其中HBV的感染在HCC发生过程中具有重要意义.目前对肝癌发生机制的研究大都是在基因水平，但是mRNA的水平并不能真正代表所表达的蛋白质水平，因此，要求对生物功能的执行者—蛋白质进行研究.蛋白质组是指一个基因组、一个细胞或组织或一种生物体所表达的全部蛋白质[1].蛋白质组学(proteomics)技术为研究肿瘤标志物与肿瘤进展转移研究提供良好的技术平台，SELDI蛋白质芯片技术是近年来新兴的一种蛋白质组学技术，他具有简单，快捷，灵敏等特点，可以检测M_r500-500 000之间的蛋白或多肽，而且所需样本体积小(0.5-400 μL)[2-3].我们应用细胞裂解液裂解体外培养的两种细胞(HepG2、HepG 2.2.15)，进行了SELDI-TOF-MS分析，建立了肝癌细胞与转染HBV的肝癌细胞的蛋白表达图谱，发现了一系列(信噪比)差异表达的蛋白，信号强度与蛋白浓度相一致，因此能对样本中的单一成分进行定量.

1 材料和方法

1.1 *材料* 肝癌细胞株(HepG2)、转染HBV的肝癌细胞株(HepG 2.2.15)由第四军医大学吴力克主任医师赠送.HPLC水，乙晴，三氟乙酸，SPA(sinapinic acid)，tritonX-100，尿素，HEPES，CHAPS购自美国Sigma公司，蛋白质芯片时间质谱分析仪(PBS Ⅱ C)及WCX2(弱阳离子交换芯片)购自美国Ciphergen Biosystems公司.蛋白质芯片WCX2(弱阳离子交换芯片)芯片表面结合有弱型阴离子羧基,可以被分析物表面的正电荷基团相互作用(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)而捕获蛋白.

1.2 *方法* 细胞总蛋白质的提取.HepG2、HepG 2.2.15细胞采用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基培养，细胞长成单层后，用无菌细胞刮刀刮取细胞，PBS洗3次，细胞计数10^{10}/L，加入裂解液(8 mol/L Urea，40 g/LCHAPS，40 mmol/L Tris-HCl pH7.4) 200 μL，4℃剧烈震荡30 min，14 000 *g*离心30 min.采用日立的Gene Spec V蛋白核酸分析系统测定上清的蛋白浓度，用裂解液调至样品浓度为2 g/L，分装-86℃备用.将WCX2蛋白芯片装入蛋白工作平台，每孔加入200 μL结合/洗脱缓冲液(50 mmol/L NaAc，pH4.0)预处理芯片，室温下200 r/min振荡5 min，弃缓冲液，重复上述操作1次.每孔加入1∶2稀释的样品50 μL剧烈震荡，室温孵育1 h.弃掉样品，每孔用200 μL结合/洗涤缓冲液洗涤2次，每次震荡5 min.弃去孔中液体，每孔加入200 μL HPLC水，立刻甩出.从蛋白工作平台中取出芯片，空气中干燥，每孔加入EAM(SPA中加入乙晴75 μL和10 mL/L三氟乙酸75 μL)0.5 μL，重复1次.干燥后用蛋白质芯片阅读机进行质谱分析.IMAC3蛋白芯片每孔加入50 mmol/L硫酸镍5 μL并在湿盒中孵育15 min，重复操作1次.用流动的去离子水清洗芯片10s以除去过多的镍.每孔加入结合缓冲液(0.5 mol/L NaCl，1 g/L TrionX-100，PBS pH7.0)5 μL，震荡孵育5 min，将蛋白芯片放入蛋白工作平台(Bioprocessor)，每孔加入缓冲液200 μL，震荡孵育5 min.弃去缓冲液，每孔立即加入50 μL 1∶2稀释于缓冲液中的样品(蛋白终浓度1 g/L)，震荡孵育1 h.弃去样品，每孔使用缓冲液200 μL洗涤2次，每次5 min，然后用水进行清洗.从蛋白工作平台中取出蛋白芯片，空气中干燥，每孔加入EAM 0.5 μL，重复1次.干燥后用蛋白质芯片阅读机进行质谱分析.用加有All-in-one标准蛋白的NP-20芯片校正质谱仪，仪器参数设置如下:激光强度220，检测敏感度10，优化M_r范围为2 000-10 000，最高M_r为50 000.

统计学处理 采用Ciphergen proteinchip 3.0版本的分析软件自动采集数据，然后用Biomarker Wizard软件分析 HepG2、HepG 2.2.15细胞的蛋白质谱差异.

2 结果

两种芯片M_r在3 000-25 000范围内，WCX芯片捕获蛋白峰较多，共捕获91个蛋白峰，IMAC3-Ni芯片共检测出61个蛋白峰，且WCX2芯片中蛋白峰的强度较好.因此后续才研究选择WCX2芯片进行.为了保证试验结果的可靠性，我们首先进行细胞计数为10^{10}/L样品蛋白浓度为2 g/L以减少细胞本身蛋白的差异;同时每种细胞收获3次，以排除组间差别;每份样品至少在同种芯片3个以上不同点进行检测，以排除不同芯片点之间的差异.然后用SELDI-TOF-MS对样品孔进行测定，经质谱分析后选择了8个蛋白峰，测变异系数，结果显示其M/Z及强度的CV分别为1%和5%，分析结果表明试验重复性好结果可靠.

2.1 *差异蛋白的比较* WCX2芯片共捕获91个蛋白峰，其中HepG2、HepG 2.2.15细胞差异蛋白峰共19个，9个蛋白峰在肝癌细胞中表达量增高，10个蛋白峰在肝癌细胞中表达量降低(表1).肝癌细胞及转染HBV的肝癌细胞在M_r8 500-10 000和10 000-12 000捕获的蛋白峰见图1-2.

表1 HepG2、HepG 2.2.15细胞差异蛋白峰(M_r)

标志蛋白	表达	标志蛋白	表达
4061	↓	5552	↑
5061	↓	5835	↑
5989	↓	7517	↑
6077	↓	8576	↑
6555	↓	9350	↑
6866	↓	10106	↑
7285	↓	10311	↑
7721	↓	11086	↑
8076	↓	11660	↑
9633	↓		

2.2 *差异蛋白质的鉴定* 将发现的差异蛋白峰在Swiss蛋白数据库中搜索(http://us.expasy.org/tools/tagident.html)，发现M_r 11081蛋白峰与钙结合蛋白S100 A10相符.其他几种蛋白暂时寻找不到.

3 讨论

肿瘤早期就可在蛋白质水平出现细微但重要的组合改变[4]，近来研究表明，肿瘤性疾病从蛋白质组学的角度又可以被认为是一种蛋白质缺陷病，其发生过程中有多种蛋白会发生异常变化.蛋白表达异常不仅包括蛋白表达量的增加或减少，还包括蛋白翻译后加工上的改变，从而导致肿瘤组织表达的蛋白质谱(protein profile)的改变.因此利用蛋白质组学方法检测蛋白质谱的变化可以更加准确地诊断肿瘤及了解肿瘤的发病机制.HBV感染在肝癌发生过程中具有重要的意义，这就需要探索一种新的技术以发现早期肿瘤标志物.SELDI蛋白质芯片技术可检测疾病进展中不同阶段血清中多肽量的变化，翻译后修饰的改变或某些多肽的聚糖结构变化，为HCC肿瘤标志物的进展提供了一个新的方法，他灵敏度高、特异性好、重复性强、操作简单[5]，可同时检测血清中的多种蛋白质已被应用于检测多种生物学样品.我们比较WCX2与IMAC3-Ni两种芯片对同一份细胞分析后发现，WCX2芯片捕获蛋白峰较多，M_r3 000-30 000范围内，共捕获91个蛋白峰，IMAC3-Ni芯片共检测出61个蛋白峰，且WCX2芯片中蛋白峰的强度较好.因此本研究选择WCX2芯片进行样品分析.WCX2芯片捕获的蛋白PI一般大于4.

体外培养的细胞株虽然不能完全反映体内细胞的生长状态和生物学活性，但他具有成分单一，均质性好，实验条件容易控制等优点.尤其在做对比性研究时可避免由组织细胞成分复杂，细胞异质性高等缺点造成的结果不真实和不可靠[6].我们培养了HepG2和HepG2.2.15细胞，裂解细胞蛋白定量后SELDI-TOF-MS分析蛋白表达的差异.共发现了19个差异的蛋白峰.这些组织特异性蛋白生物标记对我们从血清或组织标本中筛选或鉴定标志蛋白有重要意义对肝癌的早期诊断有潜在的应用价值，更主要的是为研究肝细胞癌变机制提供了一个基础，而且这些蛋白有可能为肝癌治疗提供新的靶位，可以进行RNA干扰来阻断其高表达或通过基因导入来促进低表达蛋白的表达.用Swiss蛋白数据库发现M_r11 081蛋白峰可能为钙结合蛋白S100 A10.S100家族与肿瘤的发生发展关系密切，他们参与细胞周期调控，在多种肿瘤中表达异常，并与肿瘤的浸润、转移有关.S100 A10在肿瘤发生中的作用还不确定，他可能与Annexin II(p36)组成复合物，抑制p36磷酸化，参与细胞周期调控[7].在肝癌的发生中S100 A10可能通过p36起作用，可能引起细胞细胞生长失控而致癌.从理论上讲，肝癌在发生、发展过程中其细胞内的蛋白质变化可以反应到血清中，可从体外培养的肝癌细胞株中筛选出部分与癌

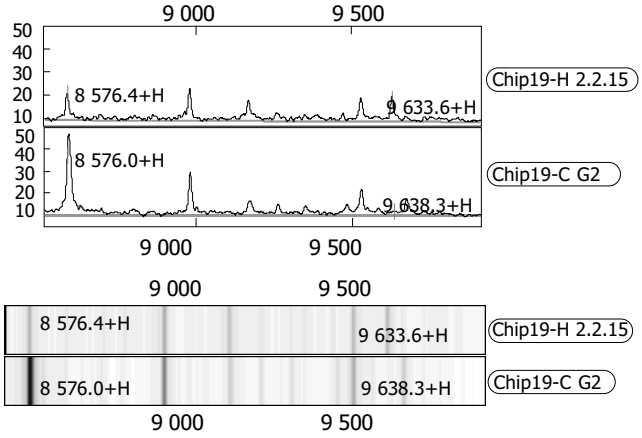


图1 M_r 8 500-10 000区段的蛋白质图谱.8576蛋白在HepPG2中高表达，在Hepp2.2.15中低表达，9634蛋白在HepG2.2.15中高表达，在肝癌细胞 HepG2中低表达.

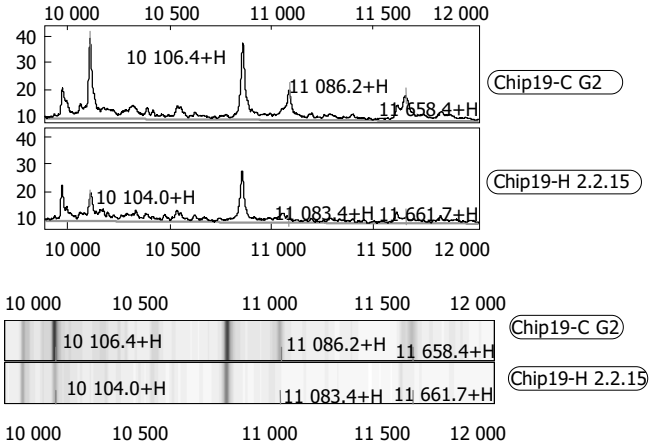


图2 M_r在10 000-121 000区段的蛋白质图谱.10106，11086，11658蛋白在HepG2中高表达，在HepG2.2.15中低表达.

患者血清相一致的标志蛋白，有些改变可能只存在于细胞内而不分泌或代谢到细胞外，这部分蛋白可能是与癌症的发病密切相关的功能蛋白和调节蛋白. 为临床肝癌的诊断提供新的思路，以期使肝癌的血清学诊断成为可能.

4 参考文献

1 Peng J, Gygi SP. Proteomics: The move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001;36:1083–1091

2 Robinson JC, Kerjan P, Mirande M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quatitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J Mol Biol* 2000;304:983-994

3 Stoop AA, Jespers L, Lasters I, Eldering E, Pannekcek H. High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor 1 (PAI-1). *J Mol Biol* 2000;301:1135-1147

4 Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF. Clinical proteomics: personalized molecular medicine. *JAMA* 2001;286:2211-2214

5 Persidsky Y, Gendelman HE. Mononuclear phagocyte immunity and the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* 2003;74:691-701

6 夏梁, 蔡伟丽, 张丽丽, 孙一娜, 肖雪媛, 何大澄. 体外培养的不同亚型肺癌细胞株差异蛋白的初步分析. 现代仪器 2004;1:13-17

7 Johnsson N, Nguyen Van P, Soling HD, Weber K. Functionally distinct serine phosphorylation sites of p36, the cellular substrate of retroviral protein kinase;differential inhibition of reassociation with p11. *EMBO J* 1986;5:3455-3460

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第一届北京国际消化疾病高峰论坛

本刊讯 第一届北京国际消化病高峰论坛定于2005-11-04/06在北京世纪金源大酒店举行，本届论坛由中国医学论坛报社主办，内容包括胃食管反流病、Barrett食管和食管癌、胃癌和幽门螺杆菌、结直肠癌筛查、炎性肠病、慢性胰腺炎和胰腺癌、NASH/脂肪肝和病毒性肝炎等重要专题.

本届论坛很荣幸地邀请到M. Brian Fennerty，J. Thomas LaMont，Meinhard Classen，David A. Johnson，David Lieberman，David J. Bjorkman，Manfred Stolte，Stuart Sherman和Atif Zaman等欧美消化领域的知名专家，以及萧树东、钱家鸣、斯崇文、欧阳钦、郑树、柯美云、王贵奇、周丽雅、罗金燕、贾继东等国内知名专家. 他们将从临床研究和实践的角度总结2005年胃肠病学和肝病学领域的最新进展和发展动态，并将根据自己掌握的关键性的第一手资料，对上述疾病发病机制、诊断和治疗中的热点问题进行精彩演讲. 希望通过参会的国内外高层专家们之间的深入探讨，提高我国消化系统疾病的诊治水平.

为了加强国内外学术交流的深度和效果，本届论坛语言采用中文和英文，并配有同声传译系统. 论坛热忱邀请全国医院消化中心的负责人和学术人带头人、中青年专家参加本届论坛，共同为东西方在消化疾病领域的高层学术交流与合作写下新的篇章.

1 主要议题

本届论坛的主要议题包括：(1)胃食管反流病(GERD):中国和美国的不同经验；(2)Barrett食管和食管癌:东西方的异同；(3)胃癌和幽门螺杆菌:东西方的看法是否相同？(4)慢性胰腺炎和胰腺癌；(5)病毒性肝炎治疗新进展；(6)炎性肠病(IBD):中国的现状；(7)IBD的病理生理及临床治疗2005年新进展；(8)结直肠癌筛查:全球范围是否面临同样的问题？(9)非酒精性脂肪性肝炎(NASH)/脂肪肝枷碌牧餍胁.

2 壁报征文

论坛将为参会者提供以壁报方式展示最新研究成果的机会. 壁报摘要要求在800字以内，需描述研究目的、方法、结果和结论. 评审费为500元，届时将评选优秀壁报5名，获奖者将免注册费. 申请截止日期为9月15日. 10月1日前通知作者壁报摘要录用情况.

3 大会秘书处

大会设有秘书处，联系人为黄向东，张莉，詹宁育，北京市鼓楼西大街41号，中国医学论坛报社，邮编100009，电话：010-64002844，传真：010-64064469，Email: communications@gisummit.com.

本论坛欢迎全国医院消化中心的负责人和学术人带头人、中青年专家参加，详细注册及相关费用信息请咨询大会秘书处.

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1688-1691
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

酵母双杂交技术筛选白细胞 cDNA 文库中新基因 NS2TP 蛋白结合蛋白基因

张黎颖, 成 军, 邓 红, 郭 江, 郭风劲, 王巧侠

张黎颖, 成军, 郭江, 郭风劲, 王巧侠, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
邓红, 西安交通大学第二医院感染科 陕西省西安市 710004
张黎颖, 女, 1978-10-26 生, 陕西省西安市人, 汉族, 2002 年毕业于西安交通大学临床医学系, 获医学学士学位, 2005年毕业于西安交通大学医学系, 获医学硕士学位, 主要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"科技攻关项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 100011, 北京安东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京市地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

Screening of proteins binding to NS2TP from leukocyte cDNA library by yeast two-hybrid technique

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Hong Deng, Jiang Guo, Feng-Jin Guo, Qiao-Xia Wang

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Jiang Guo, Feng-Jin Guo, Qiao-Xia Wang, Institute of Infections Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Hong Deng, Darpartment of Infectious Diseases, the Second Hospital, Xi'an Jiaotong University Xi'an 710004, China
Supported by National Science Foundation of China, No.C03011402, No.C30070689; Returned Scholar Fundation of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038; the Science and Technique Foundation of Chinese PLA during the 9th and 10th Five-Year Period, No. 98D063, No.01MB135; and the Science and Technique Foundation of Chinese PLA for Young Scholars during the 10th Five-Year Plan Period, No. 01Q138
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, 13 Ditan Park, Anwai Street, Dongcheng District, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2005-01-10 Accepted: 2005-05-25

Abstract

AIM: To screen the proteins binding to a transregulated protein of hepatitis C virus (HCV) NS2 protein (NS2TP) by yeast two-hybrid technique, and to investigate the pathogenesis of HCV and the biological functions of NS2TP.

METHODS: NS2TP bait plasmid pGBKT7-NS2TP was constructed by ligating the NS2TP gene into yeast expression plasmid pGBKT7. Then pGBKT7-NS2TP was used to transform yeast cells AH109 (α type). Thereafter, the transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing leukocyte cDNA library plasmid pCAT2 in 2×YPDA medium. The obtained diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and SD/-Trp-Leu-His-Ade containing x-α-gal for selection twice. The plasmids of positive colonies were extracted and analyzed by DNA sequencing and BLAST search in GenBank.

RESULTS: Twenty-five proteins binding to NS2TP were screened, including cytochrome P450 2E1, decorin, p68, β-2-microglobulin, and carboxypeptidase N precursor (CPN2), etc whose functions had been known. Three proteins with unknown function were screened at the same time.

CONCLUSION: These results bring some new clues for studying the biological functions of the novel gene NS2TP and the pathogenesis of HCV.

Key Words: Hepatitis C virus; yeast two-hybrid; NS2TP

Zhang LY, Cheng J, Deng H, Guo J, Guo FJ, Wang QX. Screening of proteins binding to NS2TP from leukocyte cDNA library by yeast two-hybrid technique. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005; 13(14):1688-1691

摘要

目的: 筛选 HCV 非结构蛋白 2(NS2)反式调节蛋白(NS2TP)的结合蛋白，探讨 HCV 的致病机制及新蛋白 NS2TP 的生物学功能.

方法: 应用酵母双杂交系统3, 将PCR 法扩增的NS2TP 基因连接入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒，转化单倍体酵母细胞AH109 并在其内表达，然后与转化了人白细胞文库质粒 pACT2 的单倍体酵母细胞 Y187 进行配合，在营养缺陷型培养基和 X-α- 半乳糖(X-α-gal)上进行双重筛选，提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠杆菌氨苄青霉素 -LB 平板上选择并测序，结果在 GenBank 中进行生物信息学分析.

结果: 筛选出与 NS2TP 结合的蛋白基因 25 个，其中包括细胞色素 p450 2E1、核心蛋白聚糖、p68、β2 微球蛋白、羧肽酶 N2 等已知功能基因及 3 个未知功能序列.

结论: 为阐明新蛋白 NS2TP 的分子生物学功能及 HCV 的致病机制提供了新的思路.

关键词: 病型肝炎病毒; 酵母双杂交; NS2TP 蛋白

张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠. 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因 NS2TP 蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1688-1691
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1688.asp

0 引言

NS2TP是我室利用抑制性消减杂交技术从肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞中筛选出来的新型蛋白基因，其开放读码框架(ORF)长度为456个核苷酸(nt)，编码产物由151个氨基酸残基(aa)组成，我们已经成功的进行了克隆化，并且应用蛋白免疫印记法(Western blotting)验证在酵母细胞AH109中成功表达融合蛋白. HCV感染可引起肝炎、肝硬化、肝癌、及脂肪肝等，严重危害着我国的人群健康，但其致病机制目前还不十分清楚，我们发现了HCV NS2可下调NS2TP在HepG2细胞中的表达[1-2]，为进一步研究NS2TP是否是HCV引起肝病的一条途径，本研究应用酵母双杂交技术筛选白细胞文库中NS2TP蛋白的结合蛋白基因.

1 材料和方法

1.1 材料 AH109酵母菌株(MATa，trp1-901，leu2-3，112，ura3-52，his3-200，gal4$^{\Delta}$，gal80$^{\Delta}$，LYS2:GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3，GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2URA3::MEL1TATA-lac Z MEL1)、预转化的cDNA白细胞文库(Y187)、pGBKT7-BD、pGADT7-AD克隆载体及酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu，SD/-Trp-Leu-His，SD/-Trp-Leu-His-Ade等培养基、X-α-gal购于Clontech公司. 大肠杆菌DH5α为本室保存. Taq DNA 聚合酶、T4 DNA连接酶、*Eco*R Ⅰ和*Pst* Ⅰ购于Takara生物公司. c-Myc mAB本室自制，由购自ATCC的1-9E10.2杂交瘤产生. 辣根过氧化物酶酶标羊抗鼠IgG为中山生物公司产品. 丙烯酰胺、N，N’-亚甲双丙烯酰胺、IPTG及pGEM-T载体购于Promega公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于Sigma公司. HepG2细胞购于中科院上海细胞生物研究所. NS2TP PCR引物:有意链:5’-GAA TTC ATG CCG CGT GGA AGC CGA-3’,反义链:5’-GGA TCCTTA GGC CAA TCC GTT TGC-3’由上海生工公司合成. DNA测序由上海华诺公司承担.

1.2 方法 PCR扩增NS2TP基因与pGEM-T克隆载体连接，转化大肠杆菌DH5α，测序正确后，提取质粒与p GBKT7空载体同时进行*Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ双酶切后将NS2TP连入pGBKT7载体，转化大肠杆菌DH5α，应用Vector NTI Suite 8.0分析质粒pGBKT7-NS2TP，选择内切酶进行酶切鉴定正确后，醋酸锂法转入酵母菌株AH109，铺SD/-Trp-His-Ade /kana(4缺+亮氨酸)培养基，观察2 wk，排除自激活现象，同时铺SD/-Trp/kana(缺色氨酸)培养基，30℃孵育5-7 d，提取酵母蛋白质用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western免疫印迹法验证NS2TP在酵母中的表达. 挑取在SD/-Trp培养基上生长的pGBKT7-HBeAg质粒的酵母AH109单个菌落(2-3 mm)接种于SD/-Trp培养基中，30℃ 250 r/min振摇16-24 h，紫外分光光度计测OD600 = 0.8-1.0时与1 mL的白细胞文库酵母细胞在50 mL 2×YPDA中30℃ 30-50 r/min配合18-24 h，离心用1×YPDA 8 mL重悬细胞，分别取220 μL铺于15 cm的SD/-Trp-Leu-His(3缺)，SD/-Trp-Leu-His-Ade(4缺)培养基各25块上，同时将配合产物按1∶100、1∶1 000、1∶10 000铺于SD/-Trp，SD/-Leu，SD/-Trp-Leu培养基上检验配合效率. 30℃孵育6-18 d. 挑取大于直径3 mm的菌落再次画线于铺有X-α-gal的4缺培养基上检查X-α-gal酶活性，在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. 按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒，转化大肠杆菌DH5α，于含有氨苄青霉素的SOB平板筛选阳性克隆，*Bgl*II酶切鉴定插入200-1 000 bp的序列后进行测序. 结果提交GenBank比对，进行生物信息学分析.

2 结果

NS2TP的PCR扩增结果(图1)，DNA测序鉴定后*Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切克隆入酵母表达载体pGBKT7，应用Vector NTI Suite 8.0分析质粒pGBKT7-NS2TP，

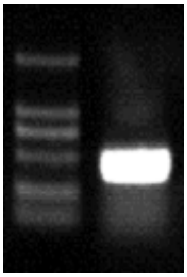


图1 NS2TP RT-PCR.

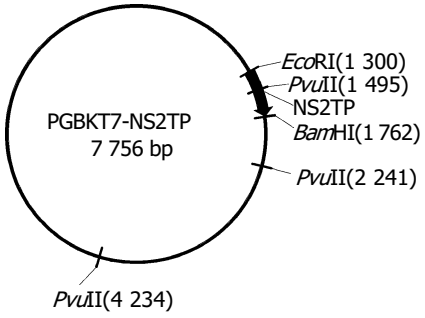


图2 应用Vector NTI Suite 8.0分析质粒pGBKT7-NS2TP，*Pvu*II酶切应得到三个片段:746 bp，1 993 bp，5 017 bp.

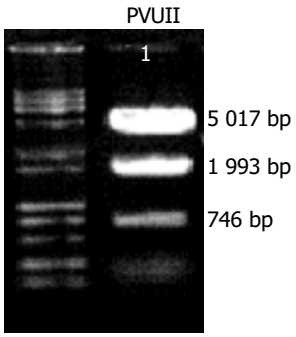


图3 pBGKT7-NS2TP质粒*Pvu*II酶切.

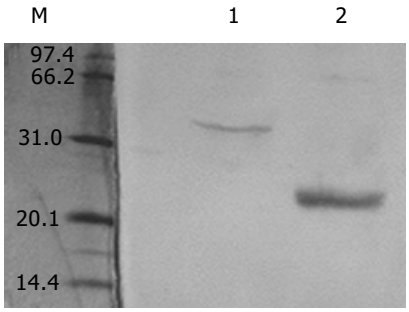


图4 pGBKT7-NS2TP蛋白Western免疫印迹分析. 1: pGBKT7-NS2TP实验组; 2: pGBKT7阳性对照组.

选择*Pvu*II进行酶切鉴定，应得到三个片段，分别为:746 bp，1 993 bp，5 017 bp(图2).酶切鉴定结果见图3.将“诱饵”载体pGBKT7-NS2TP构建后转化到酵母AH109后能够稳定表达NS2TP融合蛋白(图4).阳性对照组含有DNA结合片段Gal41-147氨基酸及c-Myc标签的总分子量为*Mr*20 757，实验组因表达NS2TP融合蛋白为37 518. Western免疫印迹分析结果显示转化pGBKT7质粒组在*Mr* 201 000后有一特异表达带，转化pGBKT7-NS2TP质粒的酵母提取物于*Mr*38 000左右有明显条带. 以1∶1 000稀释的配合产物在SD/-Trp，SD/-Leu，SD/-Trp-Leu培养基生长的克隆数分别为:57，81，7.计算可得Y187的成活性为5.7×10^8cfu/L，为限制部分，二倍体的成活性为7×10^7cfu/L，配合效率为12.3%.4缺/X-α-gal培养基筛选真阳性菌落(图5).部分筛选克隆BglII酶切鉴定结果见图6.挑选42个阳性克隆进行测序，得到25种已知蛋白基因及3种未知功能基因(表1).

3 讨论

酵母双杂交系统3，利用a型和α型酵母配合形成二倍体细胞内诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用的原理，免去了需要共转染文库质粒与诱饵质粒所带来的低效率问题. 而且由于有3个报告基因用来筛选及严格的对照阳性率达到95%以上.本研究组应用抑制性消减杂交技术发现、注册并体外克隆了HCV NS2反式调节新基因NS2TP，为研究NS2TP的生物学功能，我们采用酵母双杂交技术筛选了白细胞文库中NS2TP蛋白结合蛋白的基因，得到细胞色素p450 2E1(CYP2E1)、核心蛋白聚糖(Decorin，DCN)、P68、β2微球蛋白、羧肽酶N2，金属硫蛋白2A，胰岛素样生长因子、纤维蛋白原等，均在细胞因子相互作用网络中具有重要的作用，与生物信息学分析结果一致，下面对部分结合蛋白的功能进行阐述.

CYP2E1属P450(CYP)超家族，是一类重要的氧化代谢酶，他不仅参与催化多种外源性物质，如小分子溶剂、癌前物质和药物，而且参与内源性物质的代谢，如脂肪酸和酮体[1].CYP2E1可被乙醇诱导，同其他细胞色素P450相比，可以产生更多的活性氧，如超氧自由基和H2O2，在酒精性肝病的机制中起到重要作用.除此外，游离脂肪酸(FFA)也是CYP2E1的重要底物之一，可诱导CYP2E1升高，脂质过氧化加剧，导致抗氧化能力减弱，氧化与抗氧化机制失衡的结果是自由基的生成增多，自由基不但氧化细胞膜的脂质，更重要的是氧化细胞膜的蛋白，最终导致肝细胞结构与功能的损害，因此CYP2E1也被认为与非酒精性脂肪肝的预后密切相关[2].戴军*et al*[3]研究发现正常肝组织内，CYP2E1表达仅见于中央静脉周围区，主要表达于肝腺泡III区，肝细胞质和细胞膜可见CYP2E1表达，但在CCL_4模型肝组织中，其表达强度增加，分布的方式亦发生改变，可见于肝腺泡I和II区，与肝细胞脂肪变分布相一致，在假小叶的肝细胞中不见表达，认为CYP2E1表达与肝纤维化发生有关.而NS2TP

图5 蓝色为阳性，白色为阴性4缺/X-α-gal培养基筛选真阳性菌落.

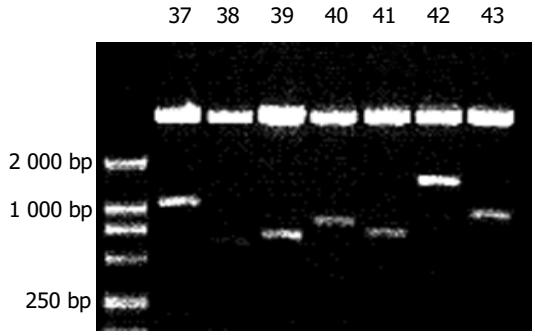


图6 部分筛选克隆*Bgl*II酶切鉴定.

表1 筛选阳性克隆测序后在 GeneBank 上的比对结果

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
1	线粒体基因	4	98
2	β2 微球蛋白	2	100
3	补体 1 因子	1	100
4	金属硫蛋白 2A	2	100
5	contactin 4	1	100
6	胰岛素样生长因子	1	99
7	羧肽酶 N2	1	99
8	细胞色素 p450 2E1	1	99
9	载脂蛋白 H	5	99
10	硒结合蛋白	1	100
11	CD200 细胞表面糖蛋白	1	100
12	硒蛋白	3	98
13	P68	1	97
14	Zn-α-2 糖蛋白	3	99
15	Decorin	1	99
16	丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂	1	100
17	甘露糖结合蛋白	1	100
18	激肽原	1	99
19	乙酰乙酰 C o A 硫解酶	1	100
20	Ga 黏素	1	100
21	纤维蛋白原	1	100
22	真核翻译起始因子 3	1	97
23	甘胺酸胰基转移酶	1	98
24	白蛋白	2	100
25	血管紧张素原	1	97
26	未知功能基因 1-3	3	97-100

可能作为 HCV NS2 与 CYP2E1 作用的中间桥梁，其具体的作用有待于进一步研究.

除 CYP2E1 外，我们还对 DCN 很感兴趣，他属于小分子、间质性、富含亮氨酸蛋白聚糖家族成员，是一种多效性分子，有抑制细胞生长的作用，参与构成调控细胞增殖的负反馈环路. 研究表明，DCN 和细胞膜上细胞胞外液(ECF)受体结合，启动了 MAP 激酶/P21 等的信号转到途径[4]. Kotaka *et al*[5]证明肝癌细胞和正常肝细胞相比 DCN 表达明显下降. 而 HCV NS2 下调 NS2TP 的表达，是否使其对 DCN 抑制细胞生长的协同作用减弱，导致肝炎后肿瘤的发生. P68 是另一个与 NS2TP 结合的重要蛋白，他的首次发现是因为他与 SV40 大 T 抗原有免疫交叉反应[6]，属于 DEAD 盒 RNA 解旋酶超家族，具有高度保守性，定位于细胞分裂末期的新鲜核仁，参与 RNA 的剪切、加工、转录和翻译，具有重要的功能. 研究发现[7]，HCV NS5B 可与内源性 P68 相互作用，NS5B 的过表达可引起 P68 的重新分布，即从核仁到胞质. 在转染 HCV RNA 全长基因的细胞中，采用 siRNA 技术敲除内源性 P68 基因，结果发现以正链RNA为模板形成的负链RNA显著减少，而在NS5B过表达的细胞中，虽保留P68基因仍然可引起负链RNA 显著减少，推测NS5B可与P68结合从而阻断P68与病毒复制酶的作用，引起病毒复制减少. 而在我们的研究中，作为NS2下调的蛋白NS2TP也可与P68结合，究竟有发挥着什么作用，是否是HCV NS2 下调 NS2TP 蛋白，使 P68 释放，从而催化病毒复制酶的活性，使病毒复制得以顺利进行.

总之，NS2TP 可能介导 HCV 病毒和宿主相互作用，是各种导致病毒清除和慢性感染以及肝病发生发展过程中很重要的一个环节，而作为一种新基因，对他的进一步研究将为阐明 HCV 感染及慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的病理机制提出新的思路.

4 参考文献

1 Lieber CS. Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 1997;77:517-544

2 Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P4502E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:544-550

3 戴军, 陆伦根, 曾民德, 李继强, 华静, 茅益民, 范竹萍, 彭延申, 邱德凯. 肝细胞色素 P450 2E1 在实验性肝纤维化组织中的表达. 肝脏 2000;5:16-17

4 Hino N, Higashi T, Nouso K, Nakatsukasa H, Tsuji T. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1996;16:123-129

5 Kotaka M, Chen GG, Lai PB, Lau WY, Chan PK, Leung TW, Li AK. Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001;85:228-234

6 Ford MJ, Anton IA, Lane DP. Nuclear protein with sequence homology to translation initiation factor eIF-4A. *Nature* 1988;332:736-738

7 Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* 2004;78:5288-5298

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1692-1695
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

抗 HBV 多聚酶 TP 区 VH 抗体体外可抑制 HBV 复制

于俊岩, 兰 林, 王宇明, 丁世涛

于俊岩, 兰 林, 王宇明, 丁世涛, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所 重庆市 400038
于俊岩, 男, 1969-7-17 生, 山西屯留县人, 汉族, 1992 年长治医学院毕业, 2001 年山西医科大学传染病学硕士研究生毕业, 2003 年至今在第三军医大学攻读传染病学博士学位, 讲师, 主要从事慢性乙型肝炎发病机理研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30100159
通讯作者: 兰林, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所. llin6624@hotmail.com
电话: 023-68752193
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

Variable fragment of heavy chain antibody against TP region of Hepatitis B Virus polymerase inhibits replication of Hepatitis B Virus *in vitro*

Jun-Yan Yu, Lin Lan, Yu-Ming Wang, Shi-Tao Ding

Jun-Yan Yu, Lin Lan, Yu-Ming Wang, Shi-Tao Ding, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30100159
Correspondence to: Dr. Lin Lan, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. llin6624@hotmail.com
Received: 2005-05-23 Accepted: 2005-06-08

Abstract

AIM: To study a functional variable fragment of heavy chain (VH) antibody against the terminal protein (TP) region of hepatitis B virus (HBV) polymerase (Pol) and its inhibition on the replication of HBV *in vitro*.

METHODS: The TP region of HBV Pol secreted by the HepG2.2.15 cells was used as an antigen, and the antibodies were selected with protein fragment complementation assay (PCA). The VH antibody gene was cloned into expression vector pZeoSV2(+), and then pZeoSV2(+)-VH was transfected into HepG2.2.15 cells. The contents of HBV DNA in the cells were detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR).

RESULTS: Three antibodies against the TP region of HBV were selected. The replication of HBV was markedly inhibited by the anti-TP Pol VH antibodies. The contents of HBV DNA in the pZeoSV2(+)-VH transfected cells (Group C) were significantly higher than those in the non-transfected and pZeoSV2(+) transfected cells (Group A and C) (Supernate: 3.480±0.32 *vs* 5.268±0.07, 5.105±0.78, $P<0.05$; Intracellular: 5.718 ± 0.15 *vs* 7.716 ± 0.74, 7.394 ± 0.97, $P<0.05$).

CONCLUSION: The anti-TP Pol VH antibodies can inhibit the replication of HBV in HepG2.2.15 cells.

Key Words: Hepatitis B Virus; Polymerase; Terminal protein region; Heavy chain antibody; Replication

Yu JY, Lan L, Wang YM, Ding ST. Variable fragment of heavy chain antibody against TP region of Hepatitis B Virus polymerase inhibits replication of Hepatitis B Virus *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1692-1695

摘要

目的: 研究抗 HBV 多聚酶 TP 区 VH 抗体抑制 HepG2.2.15 细胞的 HBV 分泌与复制.

方法: 用 HepG2.2.15 细胞分泌的 HBV 的多聚酶 TP 区作为抗原，用 PCA 方法进行 VH 抗体选择.VH 抗体基因克隆到真核表达载体 pZeoSV2(+)，把载体转化入 HepG2.2.15 细胞而抑制细胞分泌病毒颗粒.荧光定量 PCR 检测各组细胞 HBV DNA 含量.

结果: 在抗体库中共选择出 3 个 TP 区相关抗体. 抗 TP 区 VH 抗体可以抑制 HepG2.2.15 细胞分泌病毒颗粒.加入 VH 抗体的 HepG2.2.15 细胞(C 组)比没加入 VH 抗体的 HepG2.2.15 细胞(A，B 组)分泌病毒颗粒明显减少(上清内:3.480 ± 0.32 *vs* 5.268 ± 0.07, 5.105 ± 0.78, $P<0.05$; 细胞内:5.718 ± 0.15 *vs* 7.716 ± 0.74, 7.394 ± 0.97, $P<0.05$).

结论: 抗 HBV 多聚酶 TP 区 VH 抗体可以抑制 HepG2.2.15 细胞的 HBV 分泌与复制.

关键词: 乙型肝炎病毒; 多聚酶; TP 区; VH 抗体; 复制

于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛. 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1692-1695
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1692.asp

0 引言

乙型肝炎病毒是引起慢性肝病和肝细胞肝癌的主要原因[1]. 治疗慢性乙型肝炎是预防肝细胞肝癌的一项重要措施. 在慢性乙型肝炎的治疗中，重链可变区抗体(VH)是一个人工合成的、有特异高亲和力的抗体. 在

本研究中我们检测了重链可变区抗体抑制HBV复制的效果. 有多种技术可以从抗体库中选择特异性抗体，PCA方法在抗体选择中显示出很多优点. 在PCA方法中，mDHFR基因被分割成两部分:mDHFR[1]和mDHFR[2]，他们分别与抗原和抗体基因相连. 当编码mDHFR的两个载体被共转化进细菌时，如果特异性抗原、抗体相互识别，那么分别与他们相连的mDHFR[1]和mDHFR[2]就会接触而恢复完整的mDHFR酶活性，细菌得以存活.

1 材料和方法

1.1 *材料* pZeoSV2(+)、转染试剂盒Lipofectamine™ 2000均购自Invitrogen，限制性内切酶购自新英格兰公司，BD In-Fusion™ PCR Cloning Kit购自BD Biosciences Clontech，测序由上海生物工程公司完成，HepG2.2.15细胞由第三军医大学西南医院感染病研究所引进并保存，HBV PCR荧光定量检测试剂盒由上海克隆生物高技术有限公司生产. 用PCA(protein fragment complementation assay，PCA)方法选择HBV多聚酶TP区VH抗体[2]，共选择出3个抗体[3]，把带有3个抗体的大肠杆菌菌株BL21(DE3)pLysS分别接种于含有10、100、1 000、10 000 mg/L TMP浓度的M9选择培养基，只有含有VH1的大肠杆菌能在最高浓度的TMP中存活，故认为VH1抗体与抗原的亲和力最高.

1.2 *方法* 把用PCA方法选择出的细菌阳性克隆抽提质粒，进行PCR扩增VH1. P1:5-TACCGAGCTCGGATCCATGCAGGTGCAGCTGCAG-3，P2:5-CTGGACTAGTGGATCCTCATGAAGAGACGGTGAC-3，PCR反应条件:95℃ 5 min，95℃ 30 s，58℃ 45 s，75℃ 45 s循环35次，75℃ 10 min. 用BD In-Fusion™ PCR Cloning Kit把VH抗体基因插入真核表达载体pZeoSV2(+)(酶切位点为BamHI)，即pZeoSV2(+)-VH，并进行测序验证. 制备脂质体转染用DNA:转染用质粒pZeoSV2(+)-VH进行去内毒素处理并测得其浓度为718.83 μg/L. HepG2.2.15细胞的培养HepG2.2.15细胞在含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基中(含青霉素100 kU/L，链霉素100 kU/L)，37℃，体积分数为50 mL/L CO_2的孵箱中用24孔培养板培养. 实验分3组，A组:HepG2.2.15细胞单纯培养;B组:pZeoSV2(+)转染HepG2.2.15细胞;C组:pZeoSV2(+)-VH转染HepG2.2.15细胞. 待细胞生长融合达90%后转染，按试剂盒手册进行操作. 收集细胞培养液，加入PEG8000至终浓度为100 g/L，冰浴放置4 h，12 000 *g*离心30 min，将沉淀溶解于原培养液体积1%的TNE缓冲液中(10 mmol/L Tris-HCl，pH7.5;100 mmol/L NaCl;1 mmol/L EDTA). 加入SDS至终浓度为10 g/L，蛋白酶K至终浓度为1 g/L，50℃孵育2 h. 经酚-氯仿抽提，乙醇沉淀，将DNA溶解于TE缓冲液中(10 mmol/L Tris-HCl，pH8.0;1 mmol/L EDTA)[4]. 再用HBV PCR荧光定量检测试剂盒检测HBV DNA含量:在PCR反应管中加入反应液和样本DNA共26 μL，各反应管放入LightCycler PCR自动荧光检测仪;PCR扩增:50℃反应1 min，94℃保温2 min，再93℃→60℃ 30 s循环40次. 由计算机软件自动分析计算出定量结果，采用对数平均值的方法计算HBV DNA平均拷贝数.

统计学处理 实验数据以mean±SD表示，率的显著性差异分析采用SPSS12.0软件.

2 结果

在抗体库中共选择出3个TP区相关抗体，根据DNA序列和Werner Müller数据库(http://www.dnaplot.de/input/human-v.html)标明了3个抗体. PCR扩增VH1(约404 bp)(图1). 在空白质粒pZeoSV2(+)的基础上，经酶切位点BamHI构建重组质粒，测序分析(图2)表明质粒插入序列VH与设计相符. 各组培养细胞裂解产物作为模版，PCR扩增VH1抗体(图3). 只有C组可扩增出VH1抗体，与阳性对照(重组质粒pZeoSV2(+)-VH)的扩增片段相同. 而B组为阴性结果. HepG2.2.15培养细胞转染质粒pZeoSV2(+)-VH前后的光镜图片(图4A，B). 通过对各组培养细胞内HBV DNA含量的测定，转染空白质粒组即B组对HepG2.2.15细胞无明显抑制HBV颗粒分泌的作用，而转染VH抗体质粒组即C组对HepG2.2.15细胞却有明显抑制HBV颗粒分泌的作用(表1).

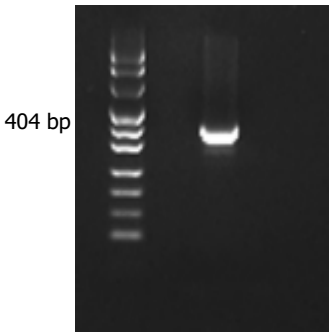


图1 PCR扩增VH1(约404 bp).

表1 HepG2.2.15培养72 h细胞上清内及细胞内HBV DNA含量(拷贝数log值，mean±SD)

分组	*n*	上清内	细胞内
A	6	5.268 ± 0.07	7.716 ± 0.74
B	6	5.105 ± 0.78	7.394 ± 0.97
C	6	3.480 ± 0.32[a]	5.718 ± 0.15[a]

[a]$P<0.05$ *vs* A，B组.

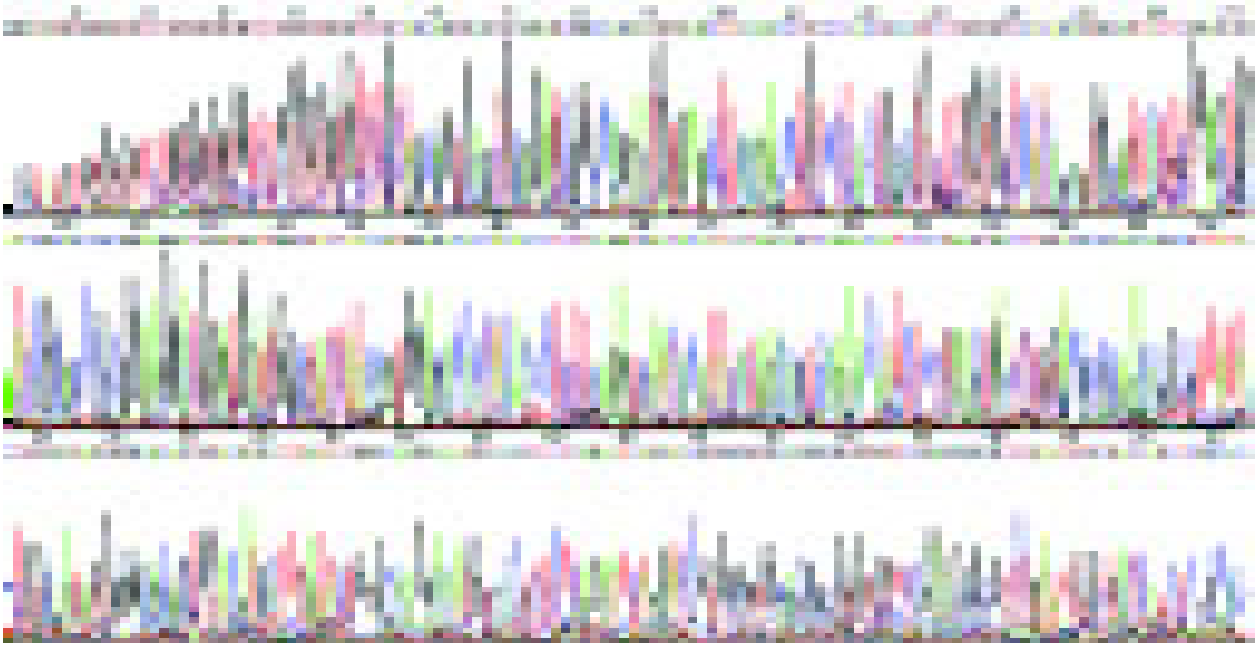


图2 重组质粒pZeoSV2(+)-VH测序结果(59位开始，424位结束).

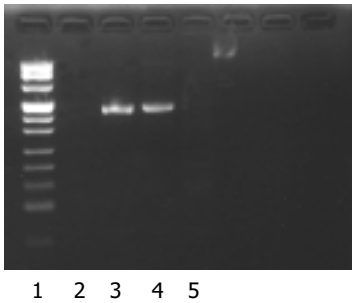


图3 培养细胞裂解产物作为模版，PCR扩增VH1抗体. 1: Marker; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照; 4: C组; 5: B组.

3 讨论

HepG2.2.15细胞是一种整和ayw型HBV全基因组，并且可以表达HBV各产物、分泌HBV颗粒的肝癌细胞株，他模拟了HBV感染和其基因组已整和到宿主细胞基因组中的状态，因此用他进行抗病毒的研究比较接近于疾病的治疗过程. 人们试图通过多种努力来阻止HBV的复制. 现在的焦点之一是集中于能够干预病毒的复制周期而不影响宿主细胞的代谢功能. HBV多聚酶就是一个重要的靶蛋白，他是一个多功能酶[5]，在病毒的复制周期中发挥着关键作用. 末端蛋白(TP)作为HBV多聚酶的组成部分，具有多种功能，主要是由前基因组RNA反转录负链DNA时作为引物;HBV多聚酶虽然在胞质中合成，其全部或其裂解形成的TP区可移行至胞核内，以完成反转录中的功能[6]. 所以抑制或中和TP区功能可以有效地抑制HBV复制. 重链可变区抗体(VH)可在原核细胞或真核细胞内表达，我们的实验已证明他们有很强的中和抗原的作用，从而可以对HepG2.2.15细胞有明显抑制HBV颗粒分泌的作用.

细胞内抗体通常指的是scFv(single chain variable fragments，scFv)，但scFv几乎不能在细胞内发挥作用. 因为scFv在细胞内质网成熟，而细胞内的还原环境使scFv不能形成二硫键，这对抗体的正确折叠至关重要，从而影响scFv的可溶性与稳定性. 而VH抗体不存在这样的缺陷[7]，VH抗体不需要链内二硫键也同样具有活性. 重链可变区抗体(VH)可在原核细胞或真核细胞内表达，已证明他们有很强的中和抗原的

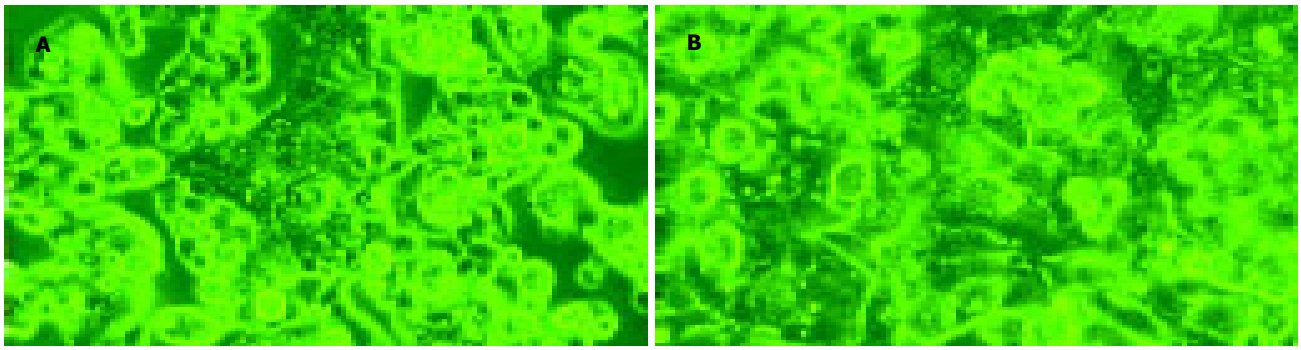


图4 HepG2.2.15细胞光镜图片(×200). A: 转染pZeoSV2(+)-VH前; B:转染pZeoSV2(+)-VH后.

作用[8]，如在抗肿瘤蛋白RAS的3种抗体中:scFv，VH和VL(轻链可变区抗体)，VH的活性是scFv的5倍，而VL实验证明无活性. 还有一点，在选择特异性抗体中，VH抗体库的多样性要比scFv抗体库的多样性小的多.

HBV多聚酶TP区由177个氨基酸组成，据报道有多个抗原决定簇. 在我们的研究中用PCA方法选择出了具有特定功能的3个抗体，至于每一个抗体对应的抗原决定簇还需要进一步的实验验证. 已证明对HBV复制有抑制作用的有干扰素、RNA干扰等，为了进一步证明抗HBV多聚酶TP区VH抗体抑制HBV复制的作用，我们正在对以上生物制剂进行平行对比，以及特异性VH抗体的体外表达，有关实验数据待发表.

4 参考文献

1 Wright TL, Lau JY. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *Lancet* 1993;342:1340-1344

2 Pelletier JN, Arndt KM, Pluckthun A, Michnick SW. An in vivo library-verse-library selection of optimized protein-protein interactions. *Nat Biotechnol* 1999;17:683-690

3 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛. 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制. 世界华人消化杂志 2005;13:1692-1695

4 Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Intracellular inhibition of the replication of hepatitisB virus by hamnerhead ribozymes. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1125-1130

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 Bartenschlager R, Junker-Niepmann M, Schaller H. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol* 1990;64:5324-5332

7 Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Wodven BP, Tomlinson IM. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol* 2003;21:484-490

8 Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. Single chain antigen-binding proteins. *Science* 1988;242:423-426

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自1995-2004年，国内生物医学期刊1191种发表的各类基金资助论文摘要155115条，其中国家基金资助的论文为70167条(45.23%)，其他基金资助的论文为84948条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索，高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助)，期刊搜索(A-Z排序). **论文排序**: 期刊论文数，点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp)

3 论文摘要格式

贺修胜，陈主初，田芳，肖志强，贺智敏，关勇军，李峰，何春梅，袁建辉. 鼻咽癌中染色体3p21区域一个表达下调的EST的鉴定. 癌症 2003年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体3p21区域一个表达下调的EST的鉴定

贺修胜，陈主初，田芳，肖志强，贺智敏，关勇军，李峰，何春梅，袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287，30000188)

背景与目的:研究显示鼻咽癌细胞3p14-25存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体3p21区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(express ed sequence tag，EST)，为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法:充分利用网上的生物信息资源，采用定位查找ESTs，对ESTs进行同源性比较分析、筛选;运用逆转录PCR(reverse transcription-PCR，RT-PCR)方法，检测ESTs在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达;并用Northern blot杂交方法，检测EST在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果:在3p21区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的EST(N31985)，在60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有EST(N31985)表达下调，与正常鼻咽上皮组织相比较，差异有统计学意义(P<0.05). 结论:染色体3p21区域EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调，提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1696-1699
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型

李 迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕

李迪, 谷鸿喜, 哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086
张淑云, 哈尔滨医科大学附属第二医学院科研实验中心
黑龙江省哈尔滨市 150086
程险峰, 黑龙江省医院南岗分院泌尿外科 黑龙江省哈尔滨市 150001
王晓燕, 哈尔滨医科大学附属第二医学院传染科 黑龙江省哈尔滨市 150086
李迪, 女, 1971-01-19 生, 黑龙江省哈尔滨人, 汉族, 2002 年哈尔滨医科大学病原学硕士, 现为哈尔滨医科大学病原学博士生, 主要从事肿瘤相关病毒的研究.
日本健康科学基金资助项目, No. 0109
哈尔滨医科大学博士创新基金项目
通讯作者: 谷鸿喜, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 194 号, 哈尔滨医科大学微生物学教研室. hxgu2432@163.com
电话: 0451-86685122 传真: 0451-86685122
收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-06

Drug-resistant mutation and genotype of hepatitis B virus Heilongjiang Province

Di Li, Shu-Yun Zhang, Hong-Xi Gu, Xian-Feng Cheng, Xiao-Yan Wang

Di Li, Hong-Xi Gu, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Shu-Yun Zhang, Experimental Center, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Xian-Feng Cheng, Urinary Surgery, the Provincial Hospital of Heilongjiang, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Xiao-Yan Wang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by Japan Health Science Foundation, No.0109 and Doctor Foundation of Harbin Medical University
Correspondence to: Hong-Xi Gu, Department of Microbiology, Harbin Medical University, 194 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. hxgu2432@163.com
Received: 2005-04-15 Accepted: 2005-05-06

Abstract

AIM: To determine the relationship between YMDD mutation of hepatitis B virus (HBV) and HBV genotypes during lamivudine treatment.

METHODS: HBV genotypes were determined by nested polymerase chain reaction (PCR) with six pairs of HBV genotype-specific primers (A to F). Then YMDD mutations were detected by real-time fluorescent PCR in serum specimens from 106 hepatitis B patients receiving lamivudine therapy.

RESULTS: Of 106 serum specimens, there were 8 samples belonging to genotypes B (7.6%), 94 genotypes C (88.7%), and 4 genotypes D (3.8%). Sixty-three YMDD mutations were found (59.4%) and the other 43 were YMDD of wild type. The mutant rates of YMDD were 62.5%(5/8) and 58.5%(55/94) in genotypes B and C respectively and no significant difference existed between them (P>0.05). Of 5 genotypes B with YMDD mutations, 1 YIDD (YMDD+YIDD) mutation (20%) and 4 YVDD (YMDD+YVDD) mutations were found. Of genotypes C with YMDD mutations, there were 26 YIDD mutations, (47.3%)17 YVDD mutations (30.9%) and 12 YIDD+YVDD mutations (21.8%). No significant differences were manifested in YMDD mutant types between genotypes B and C (P>0.05).

CONCLUSION: The mutant rate of YMDD is 59.4% after 2-4 years of treatment with lamivudine. The mutant rates and types show no significant differences between genotype B and C of HBV in Heilongjiang Province.

Key Words: Hepatitis B Virus; Genotype; Lamivudine; YMDD mutation; Drug resistance

Li D, Zhang SY, Gu HX, Cheng XF, Wang XY. Drug-resistant mutation and genotype of hepatitis B virus Heilongjiang Province. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1696-1699

摘要

目的: 探讨黑龙江地区乙型肝炎病毒发生 YMDD 基因变异与 HBV 基因型的关系.

方法: 首先HBVA-F6个主要基因型特异性多引物对巢式PCR 法对106例接受拉米夫定抗病毒治疗患者的血清HBV DNA进行基因分型和分析.再采用实时荧光PCR 法对标本进行YMDD 变异检测.

结果: 在106例标本中有8例为B基因型，其阳性率为7.6%;有94例为C基因型，其阳性率为88.7%;4例为D基因型，其阳性率为3.8%.从106例血清标本中检测出63例YMDD发生变异占59.4%，其余43例为野生型YMDD.在8例B基因型的标本中，有5例发生YMDD变异，变异率为62.5%;在94例C基因型的标本中，有55例发生YMDD变异，变异率为58.5%. HBV B，C两基因型间的YMDD变异率无显著性差异(P>0.05). 在5例B基因型YMDD变异的标本中，有1例发生YIDD变异(20%)，其余4例发生YVDD (YMDD+YVDD)变异占80%;在55例C基因型YMDD变异的标本中，有26例发生YIDD(YMDD+YIDD)变异占47.3%，17例发生YVDD(YMDD+YVDD)变异占30.9%，12例发生YIDD+YVDD变异占21.8%. HBV

B，C两基因型间的YMDD不同变异类型发生率无显著性差异(P>0.05).

结论: 在黑龙江地区拉米夫定抗病毒治疗2-4 a，HBV YMDD变异率为59.4%;HBV B，C基因型标本间发生YMDD变异率及基因变异类型均无显著性差异.

关键词: 乙型肝炎; 基因型; 拉米夫定; YMDD基因变异; 耐药

李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕. 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1696-1699
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1696.asp

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus，HBV)引起的乙型肝炎呈世界性分布.全球感染者及病毒携带者达3.5亿.我国是乙型肝炎高发区，感染HBV的人约有1.2亿.拉米夫定是核苷类药物，从病毒学、生化学和组织学等方面改善慢性乙型肝炎患者的病情，能降低患者血清中HBV DNA水平，能改善肝功以及肝纤维化程度，并能获得一定比率的HBeAg血清转换[1].对HBV复制有明显的抑制作用，使乙肝治疗有了新的进展.但患者长期使用后可产生耐药现象，常伴随谷丙转氨酶(ALT)反跳，甚至少数患者可出现病情急性恶化[2].现认为主要原因是由于出现HBV多聚酶(P)基因YMDD基序发生变异所致.产生的HBV变异株可使病毒对拉米夫定的敏感性降低，影响疗效，甚至使拉米夫定的临床应用受到很大限制[3].由于HBV不同分离株之间核苷酸序列有差异，目前根据差异性HBV已被分为A-H 8个基因型，不同的基因型分布有地域性，而且基因型与病毒复制、变异、疾病的预后及治疗药物的选择均有一定的关系[4-8].我们探讨拉米夫定抗病毒治疗中出现的HBV耐药变异与基因型之间的关系.

1 材料和方法

1.1 *材料* 2003-01/2005-01哈尔滨医科大学附属第二院传染科住院及门诊患者血清标本106份.其中慢性肝炎73例，代偿期肝硬化33例.男78例，女28例，平均年龄38.5±15.6岁;均接受拉米夫定治疗，每天口服100 mg，服用24-48 mo，均未接受其他抗病毒治疗.检测YMDD变异的试剂，DNA提取液Ⅰ，Ⅱ由深圳市匹基生物工程股份有限公司生产;Taq DNA合成酶、d NTP购自Promega公司;引物由北京赛百盛公司合成;DNA标准分子质量购自北京天为时代有限公司.HBV基因型引物的设计，参照文献[9].

1.2 *方法* 采用基因型特异性多引物对巢式PCR法对HBVDNA基因分型.第1次PCR反应体系40 μL，以HBV DNA 2 μL为模板.循环参数:95℃ 10 min预变性;94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 1 min，35个循环;72℃延伸7 min.第2次PCR分A，B两组进行，PCR反应体系40 μL，以第1次PCR产物2 μL为模板.循环参数:95℃ 10 min预变性;94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，35个循环;72℃延伸7 min.取待检测血清标本和DNA提取液Ⅰ各100 μL，振荡混匀，13 000 *g*离心10 min，弃上清.加入25 μL DNA Ⅱ提取液，振荡混匀，2 000 r/min离心10 s.100℃干浴10 min，13 000 *g*离心10 min，保留上清备有.用RocheLigh Cycle荧光PCR仪检测YMDD，可单独或同YVDD/YIDD.

统计学处理 采用SPSS 10.0软件，率的比较用χ^2检验.

2 结果

2.1 HBV DNA基因型 在281 bp处出现阳性条带为B基因型，在122 bp处出现阳性条带为C基因型(图1)，119 bp处出现阳性条带为D基因型(图2).在106例标本中有94例为C基因型，8例为B基因型，4例为D基因型.检测结果，HBV C基因型为主占88.7%，其次为B基因型占7.6%，D基因型只占3.8%.

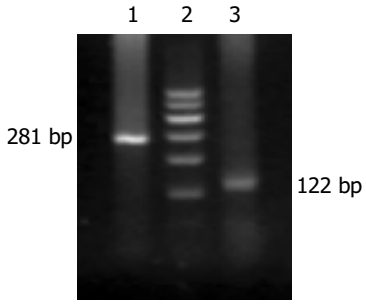


图1 HBV基因B，C型电泳图. 1: HBV基因B型; 2: Marker 600 bp; 3: HBV基因C型.

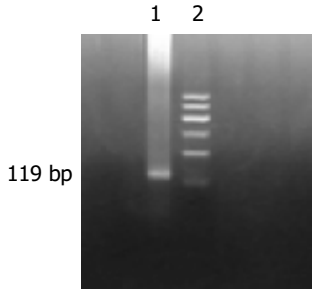


图2 HBV基因D型电泳图. 1 HBV基因D型; 2: Marker 600 bp.

2.2 YMDD变异 在106例标本中有43例为野生型YMDD占40.6%，发生YMDD变异有63例占59.4%.发生YMDD变异的63例，其中发生YIDD变异25例占39.7%，YVDD变异18例占28.6%，YIDD+YVDD变异13例占20.6%，YMDD+YIDD变异4例占6.4%，YMDD+YVDD变异3例占

4.8%.在发生YMDD变异的63例标本中，有5例为B基因型，55例为C基因型，3例为D基因型.HBV B，C基因型YMDD变异率分别为62.5%，58.5%.二者经统计学处理无显著性差异(χ^2 = 0.02，P = 0.9>0.05).D基因型因例数少未进行统计.在5例B基因型变异的标本中，有1例发生YIDD变异占20%，4例发生YVDD(YMDD+YVDD)变异占80%;在55例C基因型变异的标本中，有26例发生YIDD(YMDD+YIDD)变异占47.3%，17例发生YVDD(YMDD+YVDD)变异占30.9%，12例发生YIDD+YVDD变异占21.8%.HBV B，C两基因型间的YMDD基因变异类型(YIDD，YVDD)无显著性差异(χ^2 = 1.6，P = 0.2>0.05).另外，D基因型的标本因例数少未进行统计.

3 讨论

HBVYMDD变异率随着拉米夫定治疗时间延长而增加[10]，治疗1，2，3 a后YMDD变异率分别约为16-32%，47-56%和69-75%.来自亚洲的研究表明，YMDD变异率在拉米夫定治疗1，2，3 a后，分别达到15%，38%和53%[11].本组106例患者接受2-4 a拉米夫定的治疗，HBVYMDD变异率59.4%，与文献报道基本一致.在体外的实验中，发现YIDD变异株的复制能力比YVDD变异株的复制能力强，YIDD变异是YVDD变异的中间产物，并且YIDD变异出现频率高于YVDD[12].本组，YIDD变异出现频率为39.7%，而YVDD变异出现频率为28.6%，与文献报道相一致.

近年来，众多研究者致力于探寻发生耐药变异的预测因素，但未达成共识.如果能明确哪些因素与YMDD变异有关，可减少或延迟YMDD变异的出现，以期提高拉米夫定的疗效.目前许多研究大多集中在YMDD变异出现的时间，变异的类型以及YMDD变异与ALT水平，DNA 载量，HBeAg阳性率的相关性等方面上，但缺少YMDD变异与HBV基因型之间关系研究.病毒的基因型反应了HBV自然感染发生变异的特点，是病毒变异进化的结果.HBV基因型与病毒的感染途径，基因突变，疾病的进程，抗病毒药物的疗效有一定相关性[13].基因型分布有地域性，我国以B，C型为主，还有少量A，D型.南方以B基因型为主，北方地区以C型为主[14-15].感染HBV后的临床经过与不同基因型有关.C基因型与慢性肝病有关，B基因型在急性肝炎中占主要地位[16].对黑龙江地区106例慢性乙肝(73)和肝硬化患者(33)的血清进行分析，结果是C基因型占88.7%，B基因型占7.6%，D基因型只占3.8%，与文献报道一致.国外研究表明[17-19]，慢性乙型肝炎患者接受拉米夫定治疗，YMDD变异累计发生率与HBV基因型(A，B，C型)无相关性，但耐药患者Ba亚型明显多于Bj亚型.在我国贵阳地区对87例接受拉米夫定治疗的患者研究结果显示该地区以B基因型为主，但发生耐药变异率较高的却是C型[20].在本实验中，有5例B基因型，55例C基因型发生YMDD变异;YMDD变异率分别为62.5%，58.5%.在黑龙江地区HBV B，C基因型YMDD变异率无显著性差异(χ^2 = 0.02，P = 0.9>0.05).国外文献报道，D基因型易发生YIDD，A基因型易发生YVDD，这提示YMDD变异类型可能与基因型相关[21].但本实验结果，在黑龙江地区HBV B，C两基因型间的YMDD基因变异类型(YIDD，YVDD)无显著性差异(χ^2 = 1.6，P = 0.2>0.05).因本实验D基因型例数少，只涉及HBV B，C两基因型.

4 参考文献

1 Suzuki Y, Kumada H, Ikeda K, Chayama K, Arase Y, Saitoh S, Tsubota A, Kobayashi M, Koike M, Ogawa N, Tanikawa K. Histological changes in liver biopsies after one year of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 1999;30:743-748

2 Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 6):1267-1280

3 Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan KH, Carrilho FJ, Omata M. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance:A study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 1999;29:939-945

4 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 8):2059-2073

5 Moriyama M, Taira M, Matsumura H, Aoki H, Mikuni M, Kaneko M, Shioda A, Iwaguchi K, Arai S, Ichijima S, Iwasaki H, Tanaka N, Abe K, Arakawa Y. Genotype analysis, using PCR with type-specific primers, of hepatitis B virus isolates from patients coinfected with hepatitis delta virus genotype II from Miyako Island, Japan. *Intervirology* 2003;46:114-120

6 Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003;46:329-338

7 Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, Carey W, Brown RS Jr, Luketic VA, Terrault N, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003;125:444-451

8 Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DK, Hui CK, Wong BC, Chan AO, Lai CL. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003;37:562-567

9 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

10 Atkins M, Hunt CM, Brown N, Gray F, Sanathanan L, Woessner M, Lai CL, Dusheiko G, Dienstag J, Wright T, Barnard J, Bourne E, Condreay L. Clinical significance of YMDD mutat hepatitis B virus (HBV) in a large cohort of lamivudine-treated hepatitis B patients. *Hepatology* 1998;28:319A

11 Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condreay LD, Chien RN;On behalf of the Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001;33:1527-1532

12 Niesters HG, Honkoop P, Haagsma EB, de Man RA, Schalm

SW, Osterhaus AD. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infect Dis* 1998;117:1382-1385
13 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
14 谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 张海红, 阿步贤治. 多引物对巢式PCR法检测HBV基因型的流行病学分析. 世界华人消化杂志 2004;12:1073-1076
15 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;12:332-335
16 杨艳杰, 成军, 陈东风, 吴煜, 黄燕萍, 钟彦伟, 王春花, 刘敏. 乙型肝炎病毒基因分型的临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12:1670-1673
17 Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol* 2003;38:315-321
18 Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Yuan HJ, Sum SM, Hui CK, Chan AO, Wang BC, Lai CL. Hepatitis B virus genotypes B and C do not affect the antiviral response to lamivudine. *Antivir Ther* 2003;8:531-534
19 Suzuki F, Tsubota A, Arase Y, Suzuki Y, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Satoh J, Takagi K, Kumada H. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology* 2003;46:182-189
20 王义光, 朱武军, 杨兴林. 贵阳地区乙型肝炎病毒YMDD变异与基因分型. 中华肝脏病杂志 2005;13:193-195
21 Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, Kletzmayr J, Sterneck M, Fischer L, Schroter M, Laufs R, Feucht HH. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004;39:42-50

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会，依据文献计量学的原理和方法，经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析，并通过学科专家评审，世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊，编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版). 本版核心期刊研究，被列为“2001年国家社会科学基金项目”. 该书定于2004-07由北京大学出版社出版.

该书已于1992，1996，2000年出版过三版，在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、 出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高平价，普遍认为他适应社会需要，为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据，促进了中文期刊编辑和出版质量的提高，已成为具有一定权威性的参考工具书. 为了及时反映中文期刊发展变化的新情况，《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会，开展了新一版核心期刊的研究工作，课题组认真总结了前三版的研究经验，对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究，在此基础上，进一步改进评价方法，使之更加科学合理，力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况. 本版核心期刊定量评价，采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标，选作评价指标统计源的数据库达51种，统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年)，涉及期刊1万2千种. 本版还加大了专家评审力度，1873位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊，分属七大编75个学科类目. 该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成，不仅可以查询学科核心期刊，还可以检索正在出版的学科专业期刊，是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书.

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编，北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编，北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究.(世界胃肠病学杂志2004-05-05)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1700-1704
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

丙型肝炎病毒非结构蛋白 2 反式调节基因 NS2TP 的克隆化

张黎颖, 成 军, 邓 红, 刘 妍, 王 琳

张黎颖, 成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
邓红, 西安交通大学第二医院感染科 陕西省西安市 710004
刘妍, 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 北京市 100039
张黎颖, 女, 1978-10-26 生, 陕西省西安市人, 汉族, 2002 年毕业于西安交通大学临床医学系, 获医学学士学位, 2005年毕业于西安交通大学医学系, 获医学硕士学位, 主要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”科技攻关项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京市地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-11 接受日期: 2005-05-25

Cloning and identification of gene NS2TP transregulated by non-structural protein 2 of hepatitis C virus

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Hong Deng, Yan Liu, Lin Wang

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Hong Deng, Department of Infectious Diseases, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University Xi'an 710004, China
Yan Liu, Lin Wang, Research Center of Gene Therapy, the 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China
Supported by National Science Foundation of China, No.C03011402, No.C30070689; Returned Scholar Fundation of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038; the Science and Technique Foundation of Chinese PLA during the 9th and 10th Five-Year Period, No.98D063, No.01MB135; and the Science and Technique Foundation of Chinese PLA for Young Scholars during the 10th Five-Year Plan Period, No. 01Q138
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing Dongcheng District, 13 Anwai Avenue 100011, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2005-01-11 Accepted: 2005-05-25

Abstract

AIM: To clone and identify the new gene NS2TP transregulated by the non-structural protein 2 of hepatitis C virus.

METHODS: Based on the subtractive cDNA library of genes transregulated by NS2 protein of hepatitis C virus, the coding sequence of the new gene was obtained by bioinformatics methods. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify NS2TP gene.

RESULTS: The coding sequence of new gene was cloned and identified successfully. The coding region of NS2TP gene had a length of 456 nucleotides and the coding product pocessed 151 amino acid residues. After searching in GenBank and SwissProt, the new gene had no significant homology with the genes we have known, and its functions remained unknown.

CONCLUSION: A new target gene, transregulated by HCV NS2 protein, is recognized.

Key Words: Hepatitis C virus; Non-structural protein 2; Transregulation; Clone

Zhang LY, Cheng J, Deng H, Liu Y, Wang L. Cloning and identification of gene NS2TP transregulated by non-structural protein 2 of hepatitis C virus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(13):1700-1704

摘要

目的: 克隆化 HCV 非结构蛋白 2(NS2)蛋白反式调节靶基因(NS2TP).

方法: 依据我们构建的 HCV NS2 反式调节基因差异表达的 cDNA 消减文库筛选结果，利用分子生物学与生物信息学技术获得新基因 NS2TP 的编码序列，设计特异性引物，并对其进行克隆化研究.

结果: NS2TP 基因编码区为 456 核苷酸(nt)，编码产物为 151 氨基酸残基(aa)，经核苷酸序列数据库(GenBank)和蛋白质一级结构序列数据库(SwissProt)同源序列的搜寻，与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性，属于未知功能新基因.

结论: 发现了 HCV NS2 反式调节新的靶基因.

关键词: 丙型肝炎病毒; 非结构蛋白 2; 反式调节; 克隆

张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 2 反式调节基因 NS2TP 的克隆化. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1700-1704
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1700.asp

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的非结构蛋白 2(NS2)除了作为非结构蛋白 3(NS3)丝氨酸蛋白酶的辅助因子，在HCV多蛋白的酶解过程中具有重要作用. 关于NS2蛋白的生物学功能目前还知之甚少[1]. 为了研究NS2蛋白在肝细胞中新的生物学功能，发现并鉴定一系列 NS2 蛋白反式调节的靶基因，其中包括一些未知功能的新基因[2-3]. 我们在成功构建转染HCV NS2表达载体的HepG2细胞差异表达基因 cDNA 消减文库的基础上，克隆未知功

```
  1 atg ccg cgt gga agc cga agc cgc acc tcc cgc
     M   P   R   G   S   R   S   R   T   S   R
 46 gcc agc cgg gcc cct cag atg aga gct gca ccc
     A   S   R   A   P   Q   M   R   A   A   P
 91 gtc gct cag cca cca gca gcg gca ccc cca tct
     V   A   Q   P   P   A   A   A   P   P   S
136 tct gct gct gcg ccc cgg cag cca ggt ctg atg
     S   A   A   A   P   R   Q   P   G   L   M
181 acc act gca gct ggc gtg gct gtg ggc tct gct
     T   T   A   A   G   V   A   V   G   S   A
226 ttg ggt cac gcc att act ggg ggc ttc agt gga
     L   G   H   A   I   T   G   G   F   S   G
271 gag cct gcg agg cct gac atc act tac cag gag
     E   P   A   R   P   D   I   T   Y   Q   E
316 cag ccg gca cag cag cag cag cct tgc ctc tat
     Q   P   A   Q   Q   Q   Q   P   C   L   Y
361 ttt ctg gag tgt gcc cag aac cag ggt gac atc
     F   L   E   C   A   Q   N   Q   G   D   I
406 ggt ttc aat gag gtg ctg aaa cag tgc cga ctt
     G   F   N   E   V   L   K   Q   C   R   L
451 gcc taa 456
     A   *
```

图1 NS2TP核苷酸及蛋白序列.

能基因NS2TP，为今后更加广泛深入地研究新基因的生物学功能打下基础，并为研究HCV NS2的反式调节作用、丙型肝炎发病机制提供了新的思路.

1 材料和方法

1.1 *材料* 肝母细胞瘤细胞系HepG2及感受态大肠杆菌DH5α为本室保存，Taq酶、T4 DNA连接酶、pGEM-T(Promega)，玻璃奶回收试剂盒购自博大公司，DNA序列测定由上海联合基因公司完成.利用抑制性消减杂交技术构建NS2反式调节基因差异表达的cDNA消减文库，挑选30个克隆测序，与GenBank数据库进行初步比较.3个克隆未检索到任何已知同源基因序列，可能代表了某些新基因，将其一未知功能基因命名为NS2TP，发现其开放读码框长456 bp，编码151个氨基酸残基.

1.2 *方法* 应用Vector 8.0版软件将推断的ORF翻译为氨基酸序列，并将氨基酸序列与储存在GenBank中已知的氨基酸的进行比较，并进行功能分析.根据NS2TP的全长编码基因，设计上下游引物.上游引物5’-GAA TTC ATG CCG CGT GGA AGC CGA-3’，下游引物5’-GGA TCC TTA GGC CAA TCC GTT TGC-3’.提取HepG2细胞的总RNA，进行反转录，以反转录产物为模板进行PCR，PCR参数如下:94℃ 5 min预变性，94℃ 30 s变性，62℃ 30 s退火，72℃ 30 s延伸，共35个循环，72℃延伸10 min.将PCR产物在9 g/L琼脂糖凝胶中电泳，切取目的片段，玻璃奶法回收PCR产物，与pGEM-T载体连接，转化DH5α感受态细菌，在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上，37℃培养18 h.挑取阳性菌落，增菌.提取质粒进行限制性酶切分析鉴定，选择经鉴定的菌落送测序.

2 结果

新基因的开放读码框架(ORF)长度为456个核苷酸(nt)，编码产物由151个氨基酸残基(aa)组成(图1).新基因的核苷酸序列在GenBank中登录，GenBank收录号为AY605046.在NIH网站应用rpsBLAST软件以NS2TP基因编码的推断氨基酸序列进行搜索，发现氨基酸序列114-147 aa是一CHCH结构域([coiled coil 1]-[helix 1]-[coiled coil 2]-[helix 2] domain，CHCH domain)(图2)，Marchler-Bauer *et al*[4]发现了这一保守结构域，并与相关成员比较发现三种蛋白亚群具有该结构域，分别是S(Small，小蛋白)，N(N-terminal extended，N末端扩展蛋白)和C(C-terminal extended，C末端扩展蛋白)，结构域中的每一个螺旋的C-X9-C基序含有两个半胱氨酸残基.N末端扩展蛋白包括一些特殊蛋白，例如Cox19蛋白、Mrp10、NDUFA8.Cox19是酿酒酵母和基因，编码11 ku的蛋白，存在于胞质和线粒体中，为细胞色素氧化酶表达所需[5-6].应用internet上motif scan软件，以NS2TP基因编码的氨基酸序列进行搜索，发现该蛋白具有以下基序:2个酪蛋白激酶2(CK2)磷酸化位点(位于氨基酸残基88-91 aa，98-101 aa)，4个N-端酰基化位点(44-49 aa，65-70 aa，82-87 aa，104-109 aa)，1个蛋白激酶C(PKC)磷酸化位点(位于

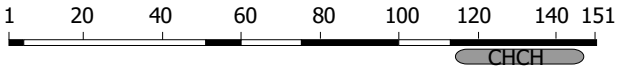
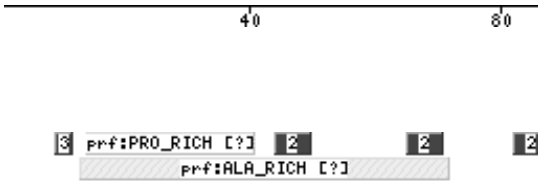


图2 NS2TP蛋白保守结构域的生物信息学分析结果.

Matches map (features from query are above the ruler, matches of the motif scan are below the ruler)



Legends: 1, freq_pat:CK2_PHOSPHO_SI

List of matches

FT	MYHIT	88	91	freq_pat:CK2_I
FT	MYHIT	98	101	freq_pat:CK2_F
FT	MYHIT	44	49	freq_pat:MYRIS
FT	MYHIT	65	70	freq_pat:MYRI
FT	MYHIT	82	87	freq_pat:MYRIS
FT	MYHIT	104	109	freq_pat:MYRIS
FT	MYHIT	9	11	freq_pat:PKC_F
FT	MYHIT	13	71	prf:ALA_RICH
FT	MYHIT	100	128	prf:GLN_RICH
FT	MYHIT	14	40	prf:PRO_RICH
FT	MYHIT	107	147	pfam_fs:CHCH
FT	MYHIT	107	147	pfam_ls:CHCH

图3 NS2TP基序分析.

氨基酸残基9-11 aa)，丙氨酸富集区(位于氨基酸残基13-71 aa)，谷氨酰胺富集区(位于氨基酸残基100-128 aa)，脯氨酸富集区(位于氨基酸残基14-40 aa)，1个CHCH结构域(位于氨基酸残基107-147 aa)(图3).

以HepG2细胞系cDNA文库为模板，PCR反应后经0.9%琼脂糖凝胶电泳，可见长度为456 bp的电泳条带，见图4.PCR产物与T-载体连接，转化大肠杆菌，提取质粒进行酶切鉴定，结果见图5.测序结果完全符合NS2TP的推断序列，见图6，表明我们已顺利得到NS2TP基因编码序列.

3 讨论

丙性肝炎病毒非结构蛋白2(HCV NS2)位于HCV多蛋白前体810-1 026 aa之间，编码216个氨基酸残基.已有研究发现NS2是一种金属/半胱氨酸蛋白酶，NS2-3酶活性的存在成为目前治疗丙型肝炎的一个药物作用靶点[7].Yamaga *et al*[8]研究NS2的膜定位机制发现，NS2本身具有至少2个与其膜定位相关的内部信号序列，分别位于氨基酸839-883 aa和928-960 aa区.他们还预测NS2具有4个跨膜结构，亲水性图谱和NS2的拓扑学分析显示四个跨膜区分别位于氨基酸810-835 aa，843-866 aa，872-919 aa和928-956 aa区，

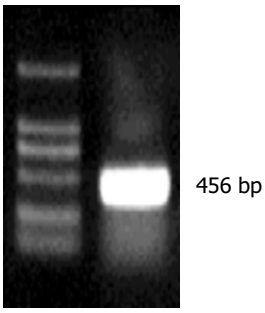


图4 NS2TP RT-PCR结果.

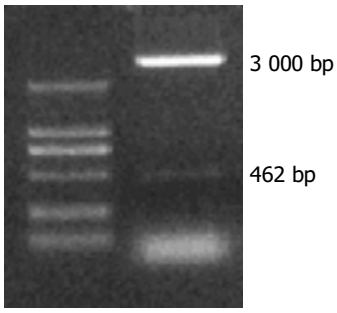


图5 pGEM-T-NS2TP质粒EcoRI/BamHI酶切图.

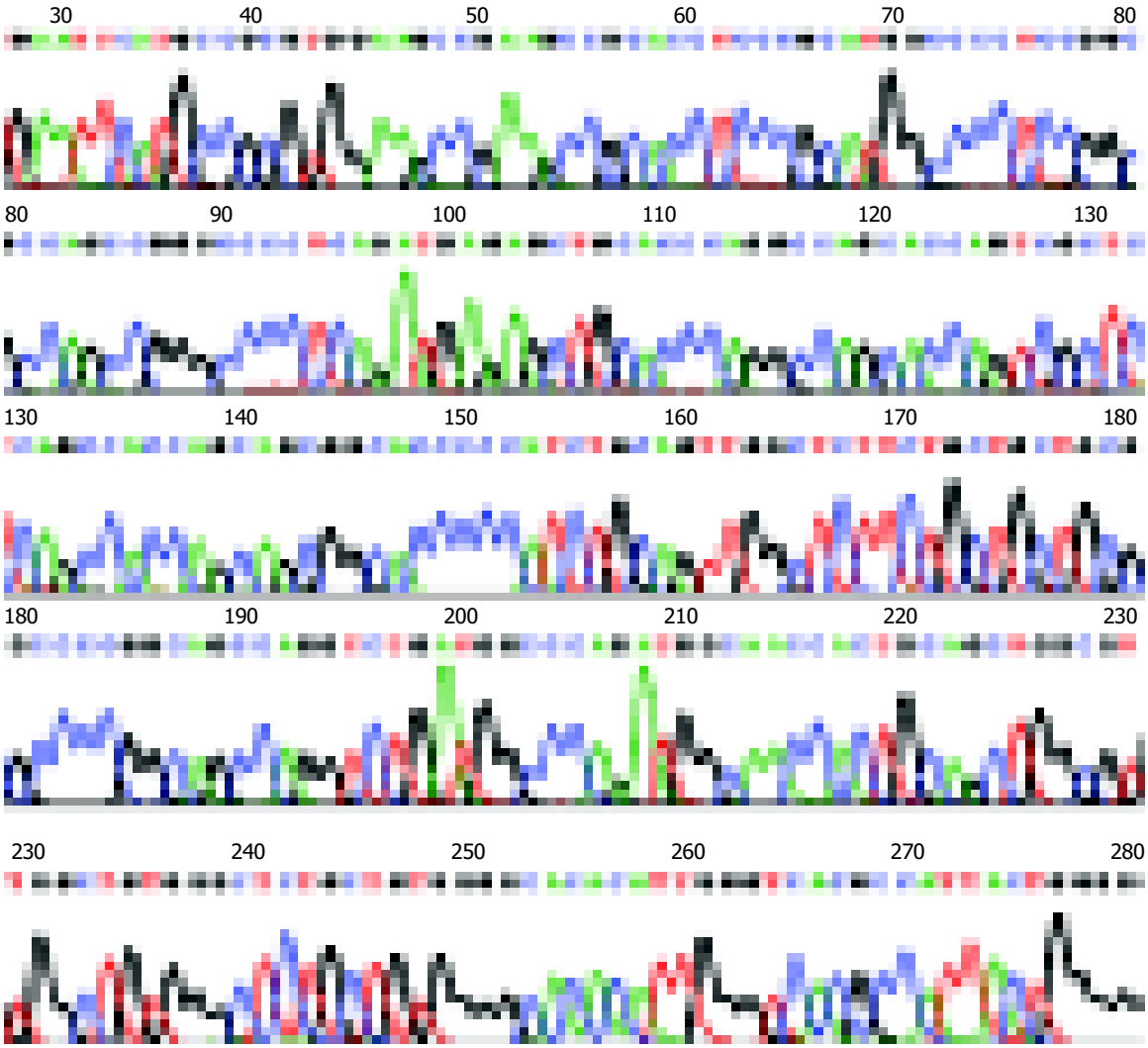


图6 部分pGEM-T-NS2TP测序结果.

其氨基末端和羧基末端均定位在内质网腔内，但NS2的功能还有待于进一步研究[9]. 抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization，SSH)是20世纪90年代后期建立的一种基因克隆的新技术，可以快速有效地检测到差异表达的基因，而且其可能检测到的结果具有无限可能性，与高通量筛选的技术-基因芯片技术相比，发现新基因是其独特的优势[10-12]. 本实验室采用SSH技术成功筛选了多条新基因[13-15]. 确定一个新基因的编码序列，研究该基因的表达与调控，编码蛋白的结构与功能，确定新基因的生物学和医学意义，是医学分子生物学研究领域中一项具有挑战性的工作[16]. 本项研究发现了NS2TP基因，这是一种未知功能的新基因，对于这一新基因结构与功能的研究虽然还是空白，但是从生物信息学分析结果来看，NS2TP基因编码产物具有CHCH结构域，根据其同源结构蛋白的亚细胞定位和功能研究，推测NS2TP基因编码产物存在于胞质和线粒体中，与细胞色素氧化酶功能相关.

NS2TP基因开放读码框架(ORF)长度为456个核苷酸(nt)，编码产物由151个氨基酸残基(aa)组成，GenBank 收录号为AY605046. 应用motif scan分析发现，NS2TP可能具有以下基序:2个酪蛋白激酶2(CK2)磷酸化位点(位于氨基酸残基88-91，98-101)，4个N端酰基化位点(44-49，65-70，82-87，104-109)，1个蛋白激酶C(PKC)磷酸化位点(位于氨基酸残基9-11)，丙氨酸富集区(位于氨基酸残基13-71)，谷氨酰胺富集区(位于氨基酸残基100-128)，脯氨酸富集区(位于氨基酸残基14-40)，1个CHCH结构域(位于氨基酸残基107-147). CK2是1969年Pinna *et al*[17-24]发现的酪蛋白激酶，到目前CK2的内源性底物已发现307个，这些蛋白质底物具有非常重要的生物学作用，其中60余个是转录因子，40余个与基因转录和表达有关的核蛋白，10多个翻译因子和80多个在细胞信号转导中发挥不同功能的蛋白质(这些蛋白质大多数组成了细胞的信号转导网络). NS2TP作为CK2的潜在底物，可能具有类似的生物学功能，需要进一步研究. 酰基化和磷酸化是蛋白质合成后的修饰方式，不同氨基酸富集区可能会决定蛋白质结构和功能的不同. 这些结果均可对研究

NS2TP新基因的结构的功能有一定的指导意义.

生物信息学技术伴随计算机网络的发展而产生，其强大的功能使其已经成为生命科学研究的重要手段[25-30]. 我们成功克隆HCV NS2下调靶基因NS2TP，并利用生物信息学分析技术对其进行了初步分析，为新基因的研究奠定基础，同时也为研究HCV NS2的生物学功能，阐明HCV的致病机制提供了新的方向.

4 参考文献

1 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

2 张黎颖, 成军, 邓红. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS2反式调节基因. 中西医结合肝病杂志 2005;15:(待发表)

3 刘妍, 成军, 王建军. 应用基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白反式调节基因. 解放军医学杂志 2003;28:55

4 Marchler-Bauer A, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Madej T, Marchler GH, Mazumder R, Nikolskaya AN, Panchenko AR, Rao BS, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Vasudevan S, Wang Y, Yamashita RA, Yin JJ, Bryant SH. "CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments". *Nucleic Acids Res* 2003;31:383-387

5 Nobrega MP, Bandeira SC, Beers J, Tzagoloff A. Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 2002;277:40206-40211

6 Tay SK, Nesti C, Mancuso M, Schon EA, Shanske S, Bonilla E, Davidson MM, Dimauro S. Studies of COX16, COX19, and PET191 in human cytochrome-c oxidase deficiency. *Arch Neurol* 2004;61:1935-1937

7 Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 1993;67:3835

8 Yamaga AK, Ou JH. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem* 2002;277:33228-33234

9 张黎颖, 成军, 邓红. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS2的研究进展. 胃肠病和肝病学杂志 2005;15:(待发表)

10 Rebrikov DV, Desai SM, Siebert PD, Lukyanov SA. Suppression subtractive hybridization. *Methods Mol Biol* 2004;258:107-134

11 Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999;303:349-380

12 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization:a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6025-6030

13 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因6的反式激活基因的筛选. 世界华人消化杂志 2004;12:54-57

14 张黎颖, 成军, 邓红, 王春花, 刘妍. 乙型肝炎病毒DNA聚合酶逆转录酶蛋白反式调节基因1的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2004;13:466-470

15 杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因2基因组DNA结构分析及其不同剪切体的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2004;12:801-804

16 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

17 Pinna LA, Clari G, Moret V. Isolation and enzymatic phosphorylation of rat liver cytosol phosphoproteins. *FEBS Lett* 1969;5:77

18 Arrigoni G, Marin O, Pagano MA, Settimo L, Paolin B, Meggio F, Pinna LA. Phosphorylation of calmodulin fragments by protein kinase CK2. Mechanistic aspects and structural consequences. *Biochemistry* 2004;43:12788-12798

19 Loizou JI, El-Khamisy SF, Zlatanou A, Moore DJ, Chan DW, Qin J, Sarno S, Meggio F, Pinna LA, Caldecott KW. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell* 2004;117:17-28

20 Pinna LA. The raison d'etre of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2. *Acc Chem Res* 2003;36:378-384

21 Meggio F, Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase. CK2? *FASEB J* 2003;17:349-368

22 Pinna LA. Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 20):3873-3878

23 Sarno S, Ghisellini P, Pinna LA. Unique activation mechanism of protein kinase CK2. The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme. *J Biol Chem* 2002;277:22509-22514

24 Meggio F, Negro A, Sarno S, Ruzzene M, Bertoli A, Sorgato MC, Pinna LA. Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. *Biochem J* 2000;352(Pt 1):191-196

25 Valencia A, Bateman A. Increasing the impact of bioinformatics. *Bioinformatics* 2005;21:1

26 Li X, Zhang Y. Bioinformatics Data Distribution and Integration via Web Services and XML. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2003;1:299-303

27 Friedhoff P. Mapping protein-protein interactions by bioinformatics and cross-linking. *Anal Bioanal Chem* 2005;381:78-80

28 Pazos F, Guijas D, Valencia A, De Lorenzo V. MetaRouter: bioinformatics for bioremediation. *Nucleic Acids Res* 2005;33:D588-592

29 Cattley S. A review of bioinformatics degrees in Australia. *Brief Bioinform* 2004;5:350-354

30 Cooper MS, Sommers-Herivel G, Poage CT, McCarthy MB, Crawford BD, Phillips C. The Zebrafish DVD Exchange Project: a bioinformatics initiative. *Methods Cell Biol* 2004;77:439-457

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1705-1708
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•基础研究 BASIC RESEARCH•

胞苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用

路 平, 王永来, 金 锋, 陈 波, 姚 凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚

路平, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001
王永来, 中国医科大学附属第二医院妇产科 辽宁省沈阳市 110004
赵实诚, 美国纽约史隆－凯特林肿瘤研究所 纽约 10021
路平, 男, 1964-02-13 生, 安徽省萧县人, 汉族, 1998 年中国医科大学博士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤的诊治研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30471678
通讯作者: 路平, 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科. lupinglllll@yahoo.com
电话: 024-23256666-6227 传真: 024-23265477
收稿日期: 2005-06-23 接受日期: 2005-06-30

Protection of cytidine deaminase gene gainst toxicity of high-dose chemotherapy in mice

Ping Lu, Yong-Lai Wang, Fen Jin, Buo Chen, Fan Yao, Shu-Bao Wang, Jun-Qing Chen, Hui-Mian Xu, Shi-Cheng Zhao

Ping Lu, Fen Jin, Buo Chen, Fan Yao, Shu-Bao Wang, Jun-Qing Chen, Hui-Mian Xu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Yong-Lai Wang, Department of Gynecology, the Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Shi-Cheng Zhao, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York 10021, U.S.A
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471678
Correspondence to: Dr.Ping Lu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing Beijie, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. Lupinglllll@yahoo.com
Received: 2005-06-23 Accepted: 2005-06-30

Abstract

AIM: To observe the tolerance to high-dose cytarabine (Ara-C) in mice after the cytidine deaminase (CD) gene is transfected into mouse bone marrow cells, and to explore the feasibility of chemotherapy combined with the tolerance of myelosuppression.

METHODS: Human cytidine deaminase gene was transfected into mouse bone marrow cells by retroviral vector. Then the colony-forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM) was observed in the cells of marrow donor and acceptor mice treated with Ara-C. DNA was extracted from the cells and the drug-resistant genes were detected by polymerase chain reaction (PCR). The blood cell count, weight and survival rate of the mice treated with Ara-C were analyzed.

RESULTS: Drug-resistant colonies appeared both in the bone marrow cells of donor and acceptor mice treated with Ara-C, and the CFU-GMs were 52% and 54% respectively, which were significantly higher than those of the controls (χ^2 = 124.62, 126.26; both P<0.01). The survival rate was significantly higher in CD-transfected mice as compared with that in the controls (χ^2 = 7.42, P<0.01), and the blood cell count and body weight decreased less and recovered sooner. CD gene was expressed in the bone marrow cells of transfected mice.

CONCLUSION: Drug-resistant gene can not only integrate and express in mouse bone marrow cells, but also promote the tolerance to high-dose Ara-C.

Key Words: Cytidine deaminase; Gene therapy; Cytarabine

Lu P, Wang YL, Jin F, Chen B, Yao F, Wang SB, Chen JQ, Xu HM, Zhao SC. Protection of cytidine deaminase gene gainst toxicity of high-dose chemotherapy in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005; 13(14):1705-1708

摘要

目的: 将人胞苷脱氨基酶基因(CD)导入小鼠骨髓细胞后，观察小鼠对大剂量阿糖胞苷(Ara-C)的耐受性，探讨骨髓耐受联合化疗的可行性.

方法: 以反转录病毒为载体，将人胞苷脱氨基酶基因(CD)通过共培养转染入小鼠骨髓干细胞，观察共培养后的骨髓细胞及受体小鼠骨髓移植后经药物处理后的骨髓细胞耐 Ara-C CFU-GM 生成情况;从转基因小鼠骨髓细胞提取DNA，用PCR检测转基因小鼠骨髓细胞耐药基因的表达;观察转基因小鼠经大剂量Ara-C化疗后血象、体质量及生存率的变化.

结果: 骨髓移植前共培养后供体的骨髓细胞和骨髓移植后受体含有耐药基因(SFG-CD)的骨髓细胞均有耐药克隆的形成(52%，54%;与对照组相比χ^2分别为 124.62，126.26，P均<0.01)，并明显增加了对 Ara-C 的耐受性;与对照组比较含耐药基因组动物经大剂量化疗后，生存率明显提高(χ^2 = 7.42，P<0.01)，血象、体质量下降幅度较小而恢复较快;转基因小鼠骨髓细胞经 PCR 检测，显示有 CD 基因条带.

结论: 耐药基因可以进入小鼠骨髓细胞并且获得共表达，提高了造血细胞对 Aar-C 的耐受性.

关键词: 胞苷脱氨基酶基因; 基因疗法; 阿糖胞苷

路平,王永来,金锋,陈波,姚凡,王舒宝,陈峻青,徐惠绵,赵实诚.胞苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用.世界华人消化杂志 2005;13(14):1705-1708
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1705.asp

0 引言

骨髓抑制限制了化疗药物的应用，使化疗药物难以达到治愈或抑制肿瘤生长的剂量，是影响化疗疗效的关键问题之一.如何提高骨髓等正常细胞对化疗药物的耐受性，减少化疗的毒副作用，已成为肿瘤化疗研究的焦点[1-2].我们将胞苷脱氨酶基酶基因(cytidine deaminase，CD)导入小鼠骨髓细胞中，观察小鼠对大剂量阿糖胞苷(cytosine arabinoside，Ara-C)的耐受性，结果如下.

1 材料和方法

1.1 材料 含耐药基因的反转录病毒载体SFG-CD(含人突变的胞嘧啶脱氨酶mCD)，转染入病毒产生细胞(amphotropic packaging cell，GP-Am12，简称Am12)，构成AM12-SFG-CD，简称为SFG-CD.以上载体及细胞系由赵实诚教授提供.动物为BALB/c雄性小鼠8-10周龄，中国医科大学实验动物部提供，许可证号:SCXK(辽)2003-0009.IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)培养液，美国Gibco公司产品;含小鼠造血增殖因子条件培养液培养液(WEHI)，美国Gibco公司产品.

1.2 方法

1.2.1 小鼠处理 小鼠行5-FU尾静脉注射(150 mg/kg)，该药可杀伤成熟粒细胞而不影响造血祖细胞，注射4 d后取其股骨、胫骨的骨髓细胞(2-5)×10^7，制成单细胞悬液.计数骨髓有核细胞总数，使骨髓有核细胞和转基因之病毒产生细胞按1∶1的比例，置于含200 mL/L小牛血清和10 g/L谷氨酰胺，100 g/L WEHI中，分两组(SFG-CD，Am12)在37℃ 50 mL/L CO_2条件下共培养48 h.含耐药基因病毒产生细胞系在共培养前2 h照射1.5 Gy.共培养后收集骨髓细胞，制成细胞悬液(在PBS平衡液中作为骨髓移植及CFU-GM培养用).受体小鼠在骨髓移植前均经8 Gy致死量照射，以完全破坏其自身造血功能，观察被输入的造血细胞在体内增殖及血液的耐药情况.12只小鼠根据体质量随机分为两组:A组转染SFG-CD;B组阴性对照组，被输入的骨髓细胞仅与Am12共培养不含耐药基因.每只小鼠根据其组别，在致死量照射后12 h尾静脉注射2×10^6骨髓细胞.骨髓移植后4 wk每只小鼠ip Ara-C(30 mg/kg)连续4 d.期中及注射后(25，30，35，40及45 d)观察血象、体质量及生存率的变化.

1.3 耐药CFU-GM分析 检测共培养后的骨髓细胞行体外实验，受体小鼠骨髓移植和药物处理45 d后取骨髓细胞行体内实验.培养分为两组:A组加Ara-C，终浓度为500 nmol/L;B组为对照组，不加药物.每组共6 mL IMDM培养液含骨髓细胞3×10^6，平分为3个平皿进行培养，含10 g/L甲基纤维素，100 mL/L胎牛血清，150 g/L WEHI培养液，10 g/L碳酸氢钠，10 g/L丙酮酸钠，10 g/L必需与非必需氨基酸，5 g/L多种维生素及100 kU/L青链霉素等，胎牛血清在加入混合培养液前经用1 mg/L胸苷酸磷酶37℃ 1 h处理.培养皿置含50 mL/L CO_2 37℃培养箱7-10 d后计数集落，进行结果分析.

1.4 耐药基因检测 取经基因转染及药物处理后小鼠骨髓细胞，按饱合氯化钠法提取DNA.50 μL的PCR反应体系终浓度为0.125 mmol/L dNTPs.两种引物0.5 μmol/L，0.05 MU/L Taq DNA聚合酶，模板DNA 150 ng.PCR扩增条件是:94℃变性10 min，94℃变性1 min，58℃退火1 min，72℃延伸2 min，共40循环之后72℃延伸10 min.PCR产物在0.8 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳，照像分析.检测该试验耐药基因CD的引物序列(扩增产物为465 bp):上游5'-ACGGGATCCATGGCCCAGAAGCGTCCTG-3'，下游5'-CCGCTCGAGTCACTGAGTCTTCTGCAG-3'.

统计学处理 生存分析应用Log Rank检验(SPSS10.0统计软件)，计数资料行χ^2检验，计量资料经t检验.$P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 小鼠骨髓对Ara-C的耐受性 小鼠注射Ara-C后，转染耐药基因的动物与对照相比，动物存活率明显提高、体质量、白细胞和血小板恢复较快.转染耐药基因后CD组小鼠在大剂量Ara-C处理后45 d存活率达67%(4/6)，对照组无存活，经Log Rank检验χ^2 = 7.42，$P<0.01$.小鼠注射Ara-C后，体质量、白细胞(WBC)和血小板(PLT)均开始下降，CD组小鼠血象、体质量下降幅度较小而恢复较快，45 d体质量、白细胞和血小板均恢复正常(图1A-C).

2.2 转染基因在小鼠骨髓细胞中的表达 骨髓移植前供体的骨髓细胞和骨髓移植后受体的骨髓细胞含有耐药基因组均有耐药克隆的形成(表1).骨髓移植前对照组

表1 小鼠骨髓细胞骨髓移植前后耐药克隆形成(CFU-GM)

分组	总克隆数		耐Ara-C克隆	
	移植前	移植后	移植前(体外)	移植后(体内)
Am12	278	230	25(9%)[b]	16(7%)[d]
SFG-CD	306	276	159(52%)[b]	149(54%)[d]

χ^2 = 124.62，[b]$P<0.01$ *vs* SFG-CD组;χ^2 = 126.26，[d]$P<0.01$ *vs* SFG-CD组.

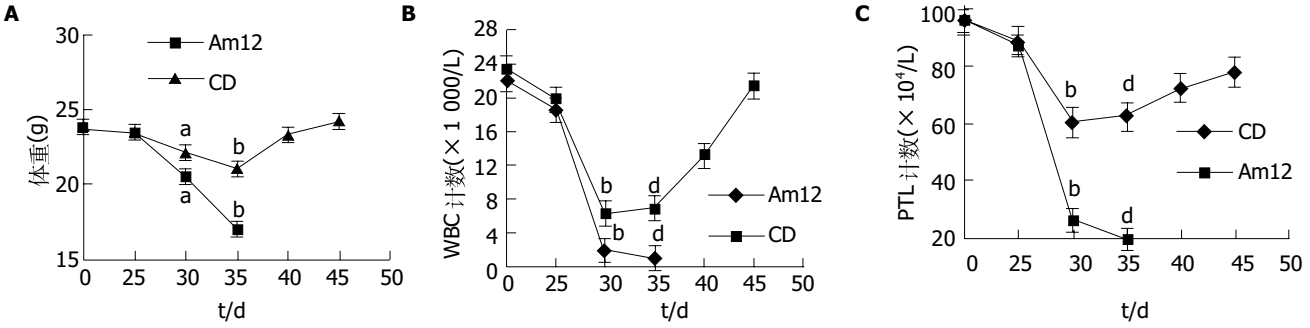


图1 各组动物药物处理后体质量、WBC及PLT的变化. A: 体重, $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.001$ *vs* Am12 组; B: WBC 计数, $^{b}P<0.01$, $^{d}P<0.001$ *vs* Am12 组; C: PLT 计数, $^{b}P<0.001$, $^{d}P<0.001$ *vs* Am12 组.

注射终浓度为500 nmol/L的Ara-C后，对药物的耐药克隆分别为52%和9%，骨髓移植后耐药克隆分别为54%和7%. 转基因小鼠骨髓细胞提取的DNA，经PCR检测，显示有CD基因条带，说明动物耐药基因转染已得到分子生物学表达(图2).

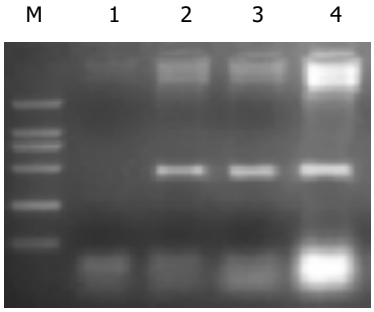


图2 小鼠骨髓细胞 DNA PCR 产物琼脂糖电泳结果. M: Marker DL2000; 1: 对照组; 2，3，4: 转染耐药基因 CD 组显示 465 bp 条带.

3 讨论

逆转录病毒(retrovirus，RV)是目前基因治疗应用较多的载体. RV 是单链RNA病毒，主要特点是[3-4]: (1)临床研究具有相对的安全性，未发生严重的不良结果; (2)外源基因能稳定地整合入靶细胞内; (3)可携带7-8 kb的外源基因片段; (4)只转染分裂期细胞; (5)转染靶细胞范围广; (6)转移效率较高. 其不足之处是: (1)插入外源基因较小，难以满足较大基因的转移; (2)只适于转染分裂期细胞; (3)病毒滴度是限制临床应用的一个主要方面. 决定基因治疗疗效的关键为: 目的基因的导入，并在靶细胞表达，及其表达的可调控性.

阿糖胞苷(Ara-C)是临床治疗乳腺癌、白血病、淋巴瘤等多种恶性肿瘤的常用化疗药物. 但在治疗过程中其大剂量应用产生的骨髓抑制等毒副作用较严重，限制了其疗效. 胞苷脱氨酶(CD)是阿糖胞苷(Ara-C)类化疗药细胞内代谢的水解酶[5]. Ara-C通过核苷载体进入细胞后经脱氧胞苷激酶(DCK)磷酸化生成Ara-CMP，再两步磷酸化生成活性产物 Ara-CTP，同时经 CD 迅速脱氨为相对无活性产物阿糖尿苷(Ara-U)，Ara-CMP经5’核苷酸酶(5’NU)去磷酸化[6]. 目前研究认为，Ara-C耐药机制主要与转运摄取过程障碍和胞内活化分解酶异常相关，如DCK活性降低或缺乏，CD和5’NU活性增加. CD主要功能是在DNA嘧啶核苷代谢中催化生理性胞苷和脱氧胞苷水解脱氨生成尿苷和脱氧尿苷，同时也催化抗肿瘤药物中核苷类似物脱氨生成无活性的代谢产物，如催化 Ara-C 生成无活性的 Ara-U[7].

我们已报道用逆转录病毒载体将CD基因转导小鼠骨髓细胞，在体外实验观察到 CD 基因可以进入小鼠骨髓细胞并且获得共表达，提高了造血细胞对 Aar-C 的耐药性[8]. 为进一步研究CD耐药基因治疗体内实验的可行性，了解导入基因在小鼠体内的表达，对骨髓细胞的保护作用资料等，本实验以反转录病毒为载体，将人 CD 通过共培养转染入小鼠骨髓干细胞，观察到受体小鼠骨髓细胞均有耐药克隆的形成，并明显增加了对Ara-C的耐受; 与对照组比较含耐药基因组动物经大剂量化疗后，生存率明显提高($P<0.01$)，血象逐渐恢复正常; 转基因小鼠骨髓细胞经PCR检测，显示有CD基因条带; 耐药基因转染后小鼠骨髓对Ara-C的耐受明显增加. 因此，我们认为逆转录病毒CD基因转导对小鼠骨髓有化疗保护作用，本实验为临床超剂量化疗以求最大限度杀伤肿瘤细胞提供了一个较好的动物模型，可能为提高肿瘤的化疗疗效提供帮助.

4 参考文献

1 Takebe N, Zhao SC, Ural AU, Johnson MR, Banerjee D, Diasio RB, Bertino JR. Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2001;8:966-973

2 Belur LR, Boelk-Galvan D, Diers MD, McIvor RS, Zimmerman CL. Methotrexate accumulates to similar levels in animals transplanted with normal versus drug-resistant transgenic marrow. *Cancer Res* 2001;61:1522-1526

3 Takebe N, Xu LC, MacKenzie KL, Bertino JR, Moore MA. Methotrexate selection of long-term culture initiating cells following transduction of CD34 (+) cells with a retrovirus containing a mutated human dihydrofolate reductase gene. *Cancer Gene Ther* 2002;9:308-320

4 Capiaux GM, Budak-Alpdogan T, Takebe N, Mayer-Kuckuk

P, Banerjee D, Maley F, Bertino JR. Retroviral transduction of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase fusion gene into murine marrow cells confers resistance to both methotrexate and 5-fluorouracil. *Hum Gene Ther* 2003;14:435-446
5 Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Beausejour CM, Momparler RL, Momparler LF, Galipeau J. Human cytidine deaminase as an ex vivo drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells. *Gene Ther* 2002;9:452-462
6 Gourdeau H, Bibeau L, Ouellet F, Custeau D, Bernier L, Bowlin T. Comparative study of a novel nucleoside analogue (Troxatyl, troxacitabine, BCH-4556) and AraC against leukemic human tumor xenografts expressing high or low cytidine deaminase activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:236-240
7 Beausejour CM, Eliopoulos N, Momparler L, Le NL, Momparler RL. Selection of drug-resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene. *Cancer Gene Ther* 2001;8:669–676
8 路平, 鲁阳, 金锋, 陈波, 王舒宝, 徐惠绵, 陈峻青, 赵实诚. 转染胞苷脱氨基酶基因对小鼠骨髓细胞大剂量化疗的保护作用. 中国临床康复 2005;9:70-71

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传，于2003-04-15开通. WJG包括: 1995-2005年1-48期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2005年第1-24期及特刊.

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索，高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者). 高影响力论文排序: 点击次数，下载次数，引用次数. 高影响力论文即特别受同行关注，影响范围广，被点击次数、下载次数、引用次数多的论文. 一篇论文如果能进入高影响力论文行列，其研究成果一般多有创新性，学术水平较高，学术价值较大，因而影响力大. 投稿须知包括: 投稿细则，述评，研究原著，焦点论坛，文献综述，研究快报，临床经验，病例报告等要求及书写格式.

2 网址

WJG (http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp)

世界华人消化杂志(http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp)

3 论文摘要格式

岳茂兴，邹德威，闵庆旺，牛恩喜，杨善芝，张坚，刘志国，崔少杰，方伟武，周雪峰，高铁山，化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年5月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴，邹德威，闵庆旺，牛恩喜，杨善芝，张坚，刘志国，崔少杰，方伟武，周雪峰，高铁山，化楠.

100101，北京市，中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会.方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会，8次在直升机上的医疗救护演练经验，2次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会，多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料，对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案.结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因，创新地把一个高质量的ICU全天候前移至草原上、沙漠里，载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车，可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理，抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应，立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用，他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点，在草原及沙漠地区都可着落实施救护.结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护，能保障航天员安全，圆满完成载人航天任务.

论文目次

目次网页包括: 岳茂兴，邹德威，闵庆旺，牛恩喜，杨善芝，张坚，刘志国，崔少杰，方伟武，周雪峰，高铁山，化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014 . 功能目次包括: 点击率: 71，下载率: 9，引用率: 0 ，摘要，相关文章，被引用次数，HTML，PDF.

4 全文

全文网页包括: 投稿，摘要，PDF，被引用，点击率: 72，下载率: 9 ，相关文章，相关评论，图片及参考文献外链接.

5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号，刊名，题目，作者，E-mail，收稿，送审，审回，退稿，接受，审稿费，出版费，彩色图制作费，黑白图制作费，英文摘要加工费，英文全文加工费，加急费，其他，发票编号，送修，修回，重修，编辑，入库，卷号，期号，起止页. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1709-1712
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

小鼠实验性胃溃疡病理变化评定标准的量化

王晓洁, 杨立红, 梁建光

王晓洁, 杨立红, 梁建光, 烟台师范学院生物科学与技术系
山东省烟台市 264025
王晓洁, 女, 1962-10-23生, 山东省青岛市人, 汉族, 1985年青岛医学院学士, 2005年中国海洋大学博士, 副教授, 主要从事动物病害及药理学的研究.
烟台师范学院科学研究项目, No. 280111
通讯作者: 王晓洁, 264025, 山东省烟台市红旗路180号, 烟台师范学院生物科学与技术系. xiaojiewang@etang.com
电话: 0535-6681053 传真: 0535-6672269
收稿日期: 2005-01-31 接受日期: 2005-03-16

Pathological quantification of experimental gastric ulcer in mice

Xiao-Jie Wang, Li-Hong Yang, Jian-Guang Liang

Xiao-Jie Wang, Li-Hong Yang, Jian-Guang Liang, Department of Bioscience and Technology, Yantai Normal University, Yantai 264025, Shandong Province, China
Supported by the Foundation of Yantai Normal University Science, No. 280111
Correspondence to: Dr. Xiao-Jie Wang, Department of Bioscience and Technology, Yantai Normal University, 180 Hongqi Road, Yantai 264025, Shandong Province China. xiaojiewang@etang.com
Received: 2005-01-31 Accepted: 2005-03-16

Abstract

AIM: To develop a method of quantifying the pathological changes gastric ulcer in the experimental mice.

METHODS: The experimental mice were fed with alcohol to establish the model of gastric ulcer. The area of the ulcer was quantified by weight and picture integration. Then the ratio of ulcer area to total stomach area (ulcer area ratio, UAR) was calculated to assess the degrees of the ulcers on the stomach wall. Furthermore, the methods of weighing, picture integration, marking, and grading were compared.

RESULTS: The mark indexes and the UAR by weight and picture integration were significantly different between different grading groups (Grade 4 *vs* Grade 2 *vs* Grade 1: 84.0±27.8 *vs* 19.6±8.1 *vs* 4.0±1.0, $P<0.05$; 40.74±0.26% *vs* 4.22±0.01% *vs* 1.03±0.01%, $P<0.05$; 31.57±0.16% *vs* 4.36±0.02% *vs* 2.43±0.02%, $P<0.05$) respectively, but the petechiae have no significant difference ($P>0.05$). Except in one mouse, the differences of UAR between by weight and picture integration in other five mice were 0.69, 4.89, 7.41, 1.26 and 2.76 respectively, which showed UAR had no marked difference between the two methods. In comparison of model I with model II, there were no obvious differences in the mark indexes, grading indexes and the numbers of petechiae while the UARs between by weight and picture integration were significantly different (6.14±0.08% *vs* 27.64±0.31%, $P<0.05$; 6.56±0.07% *vs* 21.22±0.21%, $P<0.05$).

CONCLUSION: The degrees of the gastric ulcer can be accessed by weight, picture integration, marking and grading. Weighing is better for measuring the ulcer over the fourth grade while picture integration can be used in all the degrees. The sensitivity and accuracy of picture integration and weighing are higher than those of traditional marking and grading.

Key Words: Gastric ulcer model; Picture integration; Weight; Ulcer area ratio

Wang XJ, Yang LH, Liang JG. Pathological quantification of experimental gastric ulcer in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1709-1712

摘要

目的: 利用实验性小鼠胃溃疡模型，研究胃溃疡病理变化评定标准量化的方法.

方法: 本实验应用小鼠酒精性胃溃疡模型，采用图像积分法以及称质量法，使胃溃疡面积的测量达到量化，可精确计算出胃溃疡面积与胃总面积比值(简称溃疡面积比)，并对此比值进行统计分析，依此为标准对胃溃疡病理变化程度进行评定，并对图像积分法、称质量法、记分法及分级法进行比较分析

结果: 图像积分法、称质量法与记分法计量溃疡结果显示: 每个分级组的记分指数，图像积分法、称质量法的溃疡面积比，各组间均有显著性差异(4级 *vs* 2级 *vs* 1级: 84.0±27.8 *vs* 19.6±8.1 *vs* 4.0±1.0, $P<0.05$; 40.74±0.26% *vs* 4.22±0.01% *vs* 1.03±0.01%, $P<0.05$; 31.57±0.16% *vs* 4.36±0.02% *vs* 2.43±0.02%, $P<0.05$). 10倍镜下出血点数，无显著性差异; 4级溃疡结果统计显示，每只小鼠用称质量法与图像积分法算出的溃疡面积比之差分别是 38.02、0.69、4.89、7.41、1.26、2.76，除一只小鼠之外，其他的差值均较小，说明二者测量、计算结果基本相同;造模Ⅰ组与造模Ⅱ组造模结果比较显示: 记分指数、分级数、10倍镜下出血点记数，均无显著差异.图像积分法与称质量法测算的溃疡面积比，均有显著差异(6.14±0.08% *vs* 27.64±0.31%, $P<0.05$; 6.56±0.07% *vs* 21.22±0.21%, $P<0.05$).

结论: 图像积分法、称质量法、记分法及分级法均可作为溃疡结果评定的指标.称质量法更适宜于4级以上连成片的出血面的测算,其结果较为准确,而图像积分法则对任何分级组都能准确的计量.图像积分法、称质量法灵敏度和精确度优于传统的分级法、记分法.

关键词: 胃溃疡模型; 图像积分法; 称质量法; 溃疡面积比

王晓洁, 杨立红, 梁建光. 小鼠实验性胃溃疡病理变化评定标准的量化. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1709-1712
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1709.asp

0 引言

胃溃疡模型是临床及基础动物药理、病理等实验经常用到的模型，造模的方法多种多样，根据实验的要求，主要有急性与慢性胃溃疡模型.其结果都造成胃黏膜不同程度的溃疡出血灶，对肉眼不能观察到的出血点，可在显微镜下或放大镜下记数.而肉眼可见的胃溃疡出血灶，一般都采用两类统计方法，记分法或是分级法[1-19]，但这两种方法只是对溃疡面积进行粗略统计，无法将溃疡面积精确量化，无法计算溃疡面积比.我们应用小鼠酒精性胃溃疡模型，利用数码相机，电脑及电子天平等，采用新的测算方法:图像积分法与称质量法，计算出溃疡面积比，并与传统记分法及分级法进行比较.

1 材料和方法

1.1 材料 昆明小鼠，雌雄各半，体质量:20-25 g，由本系动物房提供.将小鼠分别随机分为造模Ⅰ组、造模Ⅱ组及空白对照组，每组8只.实验前禁食禁水12 h，分别灌服自来水0.5 mL，3 h后再灌服自来水0.5 mL，造模Ⅰ组:30 min后，灌服500 mL/L乙醇0.02 mL/g;造模Ⅱ组:120 min后，每只鼠灌服500 mL/L乙醇0.02 mL/g;空白对照组:120 min后灌服蒸馏水0.02 mL/g.

1.2 方法 60 min后勒颈处死小鼠，结扎胃十二直肠端，从食管端用注射器注入37 g/L甲醛溶液0.5 mL，然后结扎，固定10 min，取胃，沿胃大弯剪开，将胃壁展平，10倍镜下记数出血点.然后，用Fine Pix6900 200M(苏州富士数码图像设备制造有限公司)数码相机将胃壁拍下，拍摄距离为10 cm.图像积分法:用photoshop6.0软件处理图片，分辨率为72像素/英寸，每张图片设置为20 cm×15 cm(实物等比图片为4 cm×3 cm)，RGB格式，加网格线(视图--显示--网格)，然后对溃疡所占的格数进行积分.占一格者或大于等于1/2格记为1分，小于1/2格者记为0.5分，总计后作为积分.同样对胃总面积进行积分(为精确期间，因胃溃疡出血部位主要分布在胃窦部[20]，故只对胃窦部面积积分代表胃壁总面积积分)，将溃疡面积的积分与胃总面积的积分的比值代表溃疡面积比.称质量法:用photoshop6.0软件处理图片，分辨率为300像素/cm，每张图片设置为9 cm×7 cm.应用HP color laserjet 4 600 ps彩色打印机，A4纸打印出来，同上一样，将胃窦部剪下称质量，代表胃壁总面积的质量，然后，将所有溃疡部位剪下称质量，即得溃疡面积的质量.同时剪下一块1 cm^2标准面积A4纸称质量，再按下列公式算出溃疡面积:溃疡面积(cm^2) = 溃疡出血部位面积A4纸的质量(mg)/标准面积1 cm^2的A4纸的质量(mg).同样，用此公式可计算胃总面积，进而计算出溃疡面积比.记分法[1]:部充血发红为1分，点状出血或糜烂各为1分，线状糜烂1个为3分，总计后作为指数，进行统计分析.分级法[1]:凡溃疡面积小，数目<4个者列为1级，4-8个小溃疡为2级，9-16个小溃疡或其中兼有数个较大者为3级，大面积融合的溃疡或>16个小溃疡或溃疡即将穿孔者为4级.

统计学处理 Excel软件，数据用mean ± SD表示，各组间两两 t 检验，$P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

酒精性胃溃疡模型，胃黏膜出血较严重，有10倍镜下才能观察到的呈针尖状的出血点，有肉眼可见的点状或线状出血灶，更多是连成片的出血面(图1).点状、线状出血灶及连成片的出血面，其组织损伤达黏膜下层.

2.1 造模组溃疡结果比较 图像积分法、称质量法与记分法计量溃疡结果在不同的分级组之间均有差异，而10倍镜下针尖状的出血点数则没有差异，如果溃疡出血是肉眼可见的，最好采用图像积分法、称质量法、记分法或分级法(表1).

2.2 造模组4级溃疡结果的比较 图像积分法，记分指数为111的两只小鼠，溃疡面积比相差20.77，记分指数为90的两只小鼠，溃疡面积比相差33.78.称质量法则记分指数为111的两只小鼠，溃疡面积比相差51.38，记分指数为90的两只小鼠，溃疡面积比相差35.91.这是由于4级溃疡出血较严重，出血灶多连成片状，用记分法主要是对点状或线状出血灶记分，当出血灶连成片状时，则不好掌握，因而出现统计结果不准确.所以，溃疡出血较严重时，用图像积分法及称质量法较好.另外图像积分法，图片大小设置为20 cm×15 cm，比实物等比图片的放大了25倍，RGB格式，分辨率为72像素/英寸，加均匀的网格线，在此放大倍数下非常清晰的记数溃疡所占的格数，比肉眼下直接记分精确的多，更能准确的表示

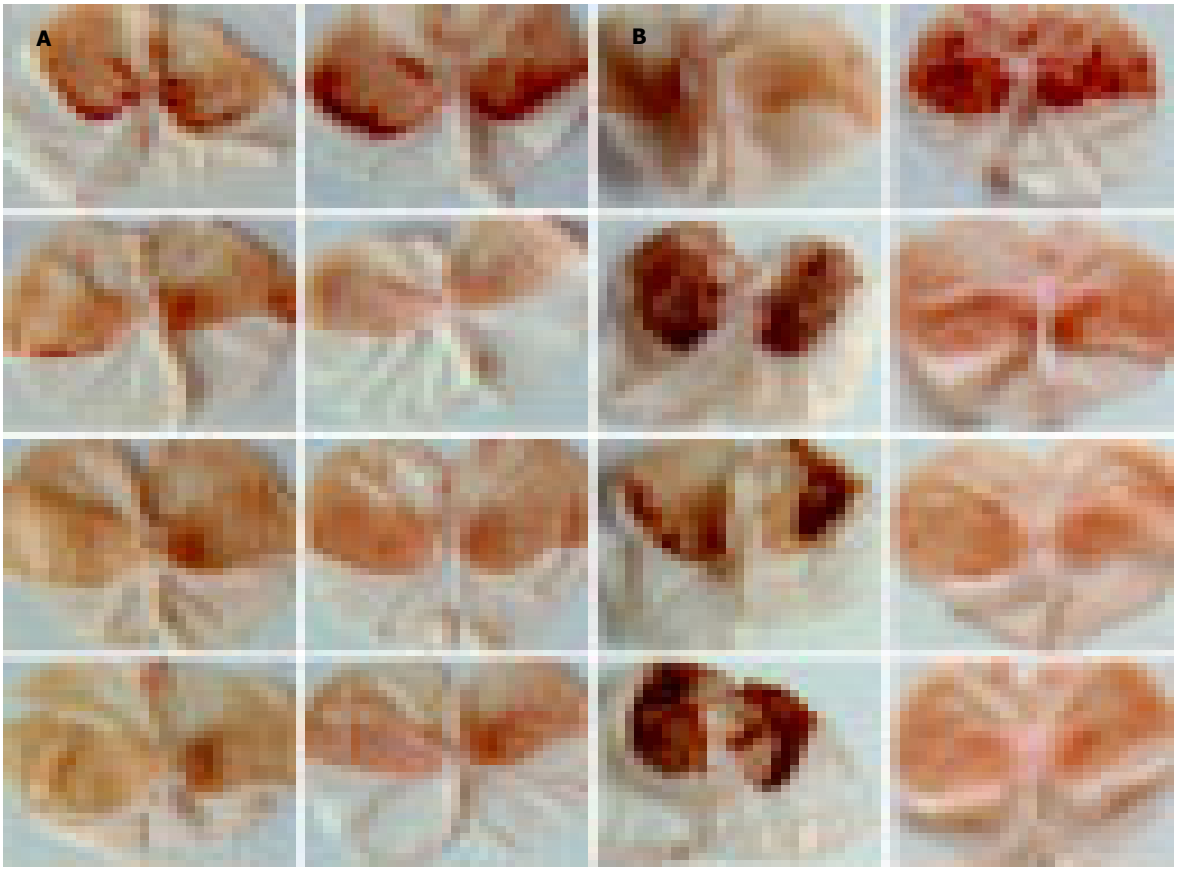


图1 造模组胃黏膜光镜下观察结果(× 10). A: Ⅰ组; B: Ⅱ组.

溃疡出血情况，因而图像积分法对各个分级的溃疡面积计算都适宜，并且准确、达到测算结果的量化. 每只小鼠用称质量法与图像积分法算出的溃疡面积比之差分别是(1)38.02，(2)0.69，(3)4.89，(4)7.41，(5)1.26，(6)2.76，由此可见，除一只小鼠之外，其他的差值均较小，说明二者测量、计算结果基本相同，并且，称质量法测算的溃疡面积比略大于图像积分法，这是由于溃疡部位水肿，高出周边部，在照片上溃疡部位周围有阴影，在剪溃疡部位时，可能将阴影部一同剪下称质量，而造成误差. 同是按分级法测算所得的溃疡4级的6只小鼠，用称质量法或图像积分法算出的溃疡面积比各只之间相差较大，称质量法最大的相差69.91，图像积分法最大的相差40.85，由此可见，分级法对溃疡病理变化程度的评定，只能做一大体的评定标准；而称质量法与图像积分法则能对其精确的测算与评定，用此两种方法为评定标准，可使实验结果更精确，可靠.

2.3 酒精性胃溃疡模型比较 造模Ⅰ组与造模Ⅱ组比较，记分指数、分级数、10倍镜下出血点记数，均无显著差异. 图像积分法、称质量法的溃疡面积比，有显著差异. 由此可见，(1)图像积分法与称质量法是溃疡病理变化程度评定指标中较为灵敏的一个指标，精确度高，(2)造模Ⅱ组比造模Ⅰ组造模效果好(表2).

3 讨论

本实验结果：造模Ⅱ组造模效果明显比造模Ⅰ组好. 造模Ⅰ组灌服的自来水30 min后，还没有排空，当灌服500 mL/L乙醇造模时，稀释了造摸用酒精浓度，造成造模效果差，因而，具体应用时选造模Ⅱ组的方法较好. 通过两种轻重不同的造模方式，造成

表1 造模组溃疡结果比较(mean ± SD)

分级	n	10倍镜下出血点数	记分指数	图像积分法溃疡面积比(%)	称质量法溃疡面积比(%)
4	6	146.2 ± 64.9	84.0 ± 27.8	31.57 ± 0.16	40.74 ± 0.26
2	5	197.8 ± 63.7	19.6 ± 8.1	4.360 ± 0.02	4.22 ± 0.01
1	5	85.2 ± 50.4	4.0 ± 1.0	2.430 ± 0.02	1.03 ± 0.01

每分级组的记分指数，各组间两两t检验，$P<0.05$，有显著性差异. 同样，图像积分法、称质量法的溃疡面积比，$P<0.05$，有显著性差异. 10倍镜下出血点数，$P>0.05$，无显著性差异.

表2 酒精胃溃疡模型比较(mean ± SD，n = 8)

组别	记分指数	分级数	10倍镜下出血点记数	图像积分法溃疡面积比(%)	称质量法溃疡面积比(%)
造模Ⅰ组	25.4 ± 30.0	2.12 ± 1.36	121.4 ± 62.2	6.56 ± 0.07	6.14 ± 0.08
造模Ⅱ组	52.4 ± 46.4	2.88 ± 1.25	165.1 ± 73.6	21.22 ± 0.21	27.64 ± 0.31
空白对照组	0	0	6.4 ± 5.4	0	0

造模Ⅰ组与造模Ⅱ组两两 t 检验，图像积分法、称质量法的溃疡面积比，P<0.05，有显著性差异.记分指数、分级数、10倍镜下出血点记数，P>0.05，无显著差异.

不同分级的溃疡模型，利于本实验不同级别溃疡结果的计量比较. 从实验结果看，图像积分法、称质量法与记分法计量溃疡结果在不同的分级级别之间均有差异，10倍镜下针尖状的出血点数则没有差异，因而，笔者认为图像积分法、称质量法、记分法及分级法均可作为溃疡结果评定的指标，而10倍镜下针尖状的出血点数不是一个很好的指标. 4级溃疡结果统计以及造模Ⅰ组与造模Ⅱ组造模结果比较显示，图像积分法、称质量法灵敏度和精确度优于分级法、记分法. 图像积分法与称质量法是统计溃疡面积／胃总面积的比值，可以消除胃面积大小不均造成的误差. 对溃疡出血较轻、分级在2级以下用记分法较好，因2级以下溃疡出血主要为点状或线状出血灶. 4级以上更多是连成片的出血面，则以称质量法较为准确、方便，图像积分法则对任何分级组都能准确的计量.

图像积分法与称质量法计量溃疡面积，使溃疡面积的测量达到量化，利用溃疡面积比对溃疡的程度进行统计分析，使统计结果更精确，量化. 并且，这两种方法简单方便，图像积分法是利用大众性的photoshop软件处理图像，一般实验室能达到此方法所需的条件及技术要求;称质量法则是将每张图片设置为9 cm×7 cm，A4纸打印出来(或5寸彩照)，将溃疡部剪下称质量即可，方法简单易行，基层实验室均能达到此要求. 因此两种方法实用性强、实用面广. 另外，此方法还可用于肠溃疡等面积计量，也可以对临床内窥镜检测溃疡结果进行统计学分析.

4 参考文献

1 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991:1331-1333

2 Liu XM, Zakaria MN, Islam MW, Radhakrishnan R, Ismail A, Chen HB, Chan K, Al-Attas A. Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of *Calligonum comosum* in rats. *Fitoterapia* 2001; 72:487-491

3 Guaraldo L, Sertie JA, Bacchi EM. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Dailla rugosa* Poiret in the rat. *J Ethnopharmacol* 2001;76:191–195

4 Yesilada E, Takaishi Y, Fujita T, Sezik E. Anti-ulcerogenic effects of *Spartium junceum* flowers on in vivo test models in rats. *J Ethnopharmacol* 2000;70:219–226

5 Tan PV, Dimo T, Dongo E. Effects of methanol, cyclohexane and methylene chlorideextracts of *Bidens pilosa* on various gastric ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol* 2000;73:415–421

6 Xing J, Yang B, Dong Y, Wang B, Wang J, Kallio HP. Effects of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed and pulp oils on experimental models of gastric ulcer in rats. *Fitoterapia* 2002;73:644-650

7 Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-batran S, Arbid MS. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and gastric effects of Ginkgo biloba in the rat. *Pharmacol Res* 2004;49:133–142

8 Grover JK, Adiga G, Vats V, Rathi SS. Extracts of *Benincasa hispida* prevent development of experimental ulcers. *J Ethnopharmacol* 2001;78:159-164

9 Rodriguez JA, Astudillo L, Schmeda-Hirschmann G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. *Pharmacol Res* 2003;48:291-294

10 Jiang P, Chang L, Pan CS, Qi YF, Tang CS. Protective role of metallothionein in stress-induced gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:2739-2743

11 Wang L, Hu CP, Deng PY, Shen SS, Zhu HQ, Ding JS, Tan GS, Li YJ. The protective effects of rutaecarpine on gastric mucosa injury in rats. *Planta Med* 2005;71:416-419

12 Zhang JF, Zhang YM, Yan CD, Zhou XP. Neuroregulative mechanism of hypothalamic paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci* 2002;71:1501-1510

13 Zhou XP, Zhang JF, Yan CD, Zhang YM. Effects of electrical stimulation of lateral hypothalamic area on gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Shengli Xuebao* 2002;54:435-440

14 Zhang JF, Zhang YM, Yan CD, Zhou XP, Qi YJ. Protective effects of paraventricular nucleus stimulation and vasopressin on gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Shengli Xuebao* 2002;54:133-138

15 Villegas I, Alarcon de la Lastra C, La Casa C, Motilva V, Martin MJ. Effects of food intake and oxidative stress on intestinal lesions caused by meloxicam and piroxicam in rats. *Eur J Pharmacol* 2001;414:79-86

16 Sartori NT, Canepelle D, de Sousa PT Jr, Martins DT. Gastroprotective effect from Calophyllum brasiliense Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *J Ethnopharmacol* 1999;67:149-156

17 Chiu PJ, Gerhart C, Brown AD, Barnett A. Effects of a gastric antisecretory-cytoprotectant 2-methyl-8-(phenylmethoxy) imidazo[1, 2-a]pyridine-3-acetonitrile (Sch 28 080) on cysteamine, reserpine and stress ulcers in rats. *Arzneimittelforschung* 1984;34:783-786

18 Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Davis JP, Field SO, Hanchar AJ. Mild irritants prevent gastric necrosis through “adaptive cytoprotection” mediated by prostaglandins. *Am J Physiol* 1983;245:113-121

19 Paiva LA, Rao VS, Gramosa NV, Silveira ER. Gastroprotective effect of Copaifera langsdorffii oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol* 1998;62:73-78

20 Uchida M, Takayama M, Kato Y, Tsuchiya S, Horie S, Watanabe K. A novel method to produce extensive gastric antral ulcer in rats: pharmacological factors involved in the etiology of antral ulceration. *J Physiol Paris* 1999;93:437-442

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1713-1716
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•基础研究 BASIC RESEARCH•

三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系 PC–3 的体外作用

刘静冰, 秦叔逵, 李 进

刘静冰, 秦叔逵, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心 江苏省南京市 210002
李进, 上海复旦大学医学院附属肿瘤医院 上海市 200032
刘静冰, 女, 1975–04–06生, 江苏省睢宁县人, 汉族, 2001级南京中医药大学中西医结合肿瘤内科硕士.
南京军区医学科研“十·五”计划课题, No. 02MA014
通讯作者: 秦叔逵, 210002, 江苏省南京市杨公井34标34号, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心肿瘤内科. qinsk@csco.org.cn
电话: 025–84453932 传真: 025–84453906
收稿日期: 2005–02–14 接受日期: 2005–03–22

Effect of arsenic trioxide on pancreatic carcinoma cell line PC-3 *in vitro*

Jing-Bing Liu, Shu-Kui Qin, Jin Li

Jing-Bing Liu, Shu-Kui Qin, Oncology Center of Chinese PLA 81st Hospital, Nangjing 210002, Jiangsu Province, China
Jin Li, the Affiliated Tumor Hospital, Medical College, Shanghai Fudan University, Shanghai, 200032, China
Supported by Nanjing Military Region, No. 02MA014
Correspondence to: Shu-Kui Qin, Cancer Center of PLA 81st Hospital, No.34, 34 Biao, Yanggongjing Street, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. qinsk@hotmail.com
Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-22

Abstract

AIM: To explore the biological effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on human pancreatic carcinoma cell line PC-3 and its mechanism.

METHODS: MTT assay was used to observe the inhibitory actions of As_2O_3 on PC-3 cells at various concentrations. The apoptotic rate and growth cycle of the cells were detected by flow cytometry. The changes of the cells' ultrastructures were observed under electron microscope. The expression of apoptosis-related gene protein (Fas, Fas-L, Bcl-2, Bax) was detected by immunohistochemical staining.

RESULTS: As_2O_3 inhibited the proliferation of PC-3 cells in a concentration- and time-dependent manner. Marked apoptosis peak was observed and the cells were mainly blocked in S phase (14.86-63.66%). PC-3 cells showed obvious feature of apoptosis under electron microscope, such as intact cell membrane, pyknosis of chromatin, nuclear fragmentation and apoptotic body formation. Bcl-2 protein was weakly expressed (+++) in controls, but strongly expressed (+) in As_2O_3-treated cells. Fas-L protein were weakly (+) and negatively (-) expressed in controls respectively, but strongly expressed (+++) in As_2O_3-treated cells.

CONCLUSION: As_2O_3 can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human pancreatic carcinoma cell PC-3 and the mechanism is probably related to its effect on the regulation of Fas, Fas-L and Bcl-2 expression.

Key Words: Arsenic trioxide; Pancreatic carcinoma; MTT assay; Flow cytometry; Immunohistochemistry

Liu JB, Qin SK, Li J. Effect of arsenic trioxide on pancreatic carcinoma cell line PC-3 *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1713-1716

摘要

目的: 探讨三氧化二砷(亚砷酸, As_2O_3)注射液对人类胰腺癌细胞的生物学效应及其作用机制.

方法: 采用MTT法观察不同浓度的As_2O_3对人类胰腺癌细胞株PC–3细胞生长的抑制作用;以流式细胞术观察细胞的凋亡率及生长周期的变化;以透射电镜观察其超微结构的变化;以免疫组织化学的方法, 观察凋亡相关基因蛋白(Fas, Fas–L, Bcl–2和Bax)表达的变化.

结果: 不同剂量(1、2和4 mg/L)的As_2O_3均可抑制PC–3细胞的增殖, 且抑制率具有浓度和时间依赖性;流式细胞仪检测显示明显的凋亡峰出现, 并使细胞周期主要被阻滞在S期(14.86–63.66%);电镜观察显示了药物作用后的癌细胞具有明显的凋亡特征性改变:细胞膜完整、染色质固缩、核碎裂、凋亡小体形成等;免疫组化研究表明As_2O_3注射液对PC–3细胞表达的凋亡相关基因具有一定调节作用, 即可下调Bcl–2(+++~+)的表达, 上调Fas(+~+++)、Fas–L(–~+++)的表达.

结论: As_2O_3注射液对人类胰腺癌细胞株PC–3具有较强的直接抑制作用, 可以诱导癌细胞凋亡, 这可能与其能够调节癌细胞的Fas, Fas–L和Bcl–2等基因蛋白的表达密切相关.

关键词: 三氧化二砷; 胰腺癌; MTT 法; 流式细胞术; 免疫组化

刘静冰, 秦叔逵, 李进. 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC–3的体外作用. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1713–1716
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1713.asp

0 引言

胰腺癌(pancreatic carcinoma)[1-4]是胰腺的外分泌性腺癌，为临床常见的消化系统恶性肿瘤，其发病率占全部恶性肿瘤的1-2%，并呈逐渐增加的趋势;因本病的预后极差，死亡率几乎与发病率接近，而被称之为癌症的王中之王.吉西他滨(Gemcitabine，GEM，双氟胞苷，健择)[5-8]在减轻患者疼痛和改善生活质量方面具有一定的作用，可使中位生存期从3.5 mo延长至4.5 mo，虽然其客观有效率仅11%，与5-Fu相比并没有明显提高，对于多数患者疗效仍然不能令人满意，而且价格昂贵.三氧化二砷(arsenic trioxide，As_2O_3，亚砷酸)注射液治疗APL疗效突出，在原发性肝癌[9-15]的研究和临床应用上亦取得可喜的成果，显示出良好的前景,但As_2O_3与胰腺癌[16-20]的研究仍处于初期阶段，仅见个别文献.我们以人类胰腺癌细胞株PC-3作为模型，研究As_2O_3注射液对胰腺癌细胞的生物学效应及其作用机制，希望为胰腺癌的临床治疗提供一种新的有效药物.

1 材料和方法

1.1 *材料* 人类胰腺癌细胞株PC-3，引种自北京协和医科大学协和医院病理科.将细胞接种于无菌培养瓶中，加入适量RPMI1640培养液(含150 mL/L的小牛血清、青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L)，于37℃、50 mL/L CO_2及饱和湿度的培养箱中培养.细胞呈单纯贴壁生长，每3-5 d传代1次.亚砷酸(As_2O_3)注射液:哈尔滨伊达药业有限公司上市药品.

1.2 *方法* 将对数生长期的细胞按1×10^9/L接种于培养瓶中，待细胞完全贴壁后(约4-5 h)，给药组加入不同浓度的药物，阴性对照组加入等体积的培养液，培养至预定时间，用倒置显微镜观察细胞生长状况和形态学改变.取2×10^7/L的活细胞接种于96孔培养板中，待细胞贴壁后，加入不同浓度的药物培养至预定时间，每孔加入5 g/L的MTT 20 μL，继续培养3 h，弃上清，每孔加入二甲亚枫(DMSO)100 μL，波长570 nm处测出用药后24、48、72 h各孔吸光度值(A).并计算细胞生长抑制率(%) = (1-加药孔平均A值/对照孔平均A值)×100%.取1.0×10^6的活细胞接种于培养瓶中，待细胞贴壁后分别加入终浓度为2 mg/L的As_2O_3溶液，置培养箱中培养至预定时间.消化，离心，固定，加入5 g/L的碘化丙啶(Propidium Iodide)1 mL进行染色，过滤后，存放在4℃冰箱内20 min后上流式细胞仪检测.使用软件CELL Quest进行分析.取1.0×10^6活细胞接种于培养瓶中，待细胞贴壁后，加入终浓度为2 mg/L的As_2O_3溶液，培养至预定时间后刮取细胞，2 000 r/min离心15 min后以40 g/L戊二醛固定、脱水、渗透、包埋、超薄切片，铀-铅双染色，透射电镜下观察，摄片.收集与As_2O_3(终浓度为2 mg/L)孵育48 h的PC-3细胞，固定，晾干.按免疫组化试剂盒所示方法(SP法)进行操作.阳性判断:以胞质和/或胞膜呈棕黄色为阳性细胞，油镜下观察200个细胞，计算阳性细胞百分率.以阳性率<5%为(-);5-25%为(+);26-50%为(++);>50%则为(+++).

统计学处理 采用*SPSS*-11软件进行相关资料处理.统计变量以mean±SD表示，$P<0.05$表示差异具有显著性.

2 结果

2.1 *PC-3细胞的形态学变化* 倒置显微镜下观察，As_2O_3注射液可明显抑制PC-3细胞的生长.随着与As_2O_3共同孵育时间的延长，PC-3细胞的增殖逐渐受到抑制，细胞形态逐渐变圆，脱壁.细胞间接触松散，胞质中颗粒增多，细胞周围出现碎片，部分细胞死亡后漂浮在培养液中,而未用药对照组细胞呈上皮型，贴壁生长，细胞轮廓清楚，细胞间接触紧密，胞质中无异常颗粒出现，增殖旺盛(图1).

2.2 *PC-3细胞生长的影响* MTT法的原理是噻唑蓝在活细胞内线粒体脱氢酶的催化下还原为深蓝色的甲臜，而死细胞无此作用，因此可以根据甲臜生成量的多

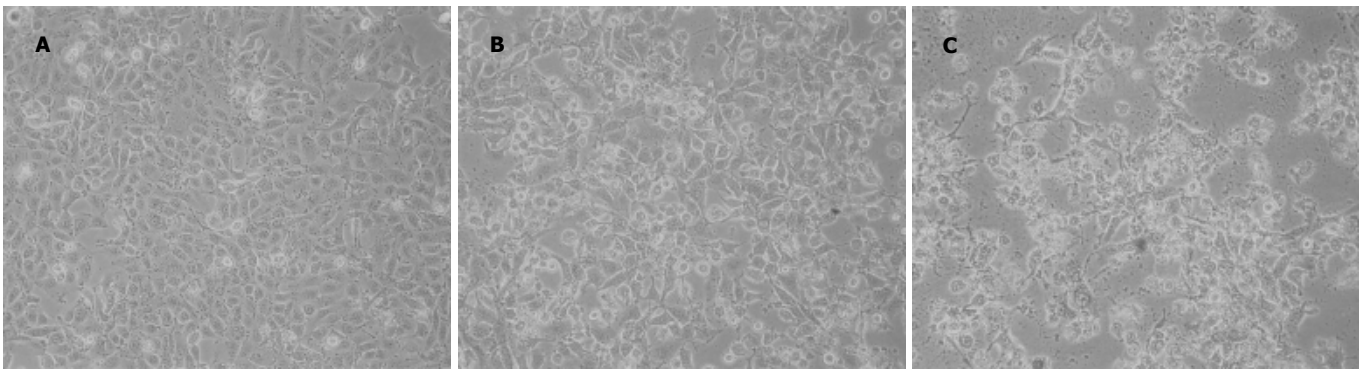


图1 PC-3细胞的形态学变化. A: 未用药对照组; B: 2 mg/L AS_2O_2作用24 h; C: 2 mg/L AS_2O_3作用48 h .

少，来判断活细胞的数量，以此观察药物对某种细胞生长的影响. As_2O_3 对 PC-3 细胞具有明显的抑制作用;经统计学处理,相同浓度、不同时间的各组间比较均有显著差异($^aP<0.05$，表 1);而相同时间、不同浓度除48 h As_2O_3 2 mg/L组和4 mg/L组无显著差异外，其余各组也有显著性差异($^bP<0.05$);由此表明 As_2O_3的抑制作用与药物浓度和作用时间呈现一定的依赖关系，即剂量越大、药物作用时间越长则对 PC-3 细胞的抑制率越高(图 2).

表1 As_2O_3 作用后 PC-3 细胞生长的抑制率(%)

As_2O_3 浓度(mg/L)	24 h	48 h	72 h
1	23.1 ± 1.8	40.1 ± 2.8	50.6 ± 3.9
2	34.1 ± 4.3	50.6 ± 5.2	59.7 ± 2.0
4	43.9 ± 3.7	56.1 ± 1.5	67.1 ± 2.4

2.3 流式细胞术(FCM)分析 2 mg/L As_2O_3注射液分别作用 12、24、48 及 72 h 后的胰腺癌 PC-3 细胞，经流式细胞仪检测，结果显示对照组细胞的凋亡率为 0.21%;As_2O_3作用组细胞的凋亡率随作用时间的延长而增加，且随用药时间的延长，S 期细胞比例呈上升趋势，而 G_0/G_1 期呈下降趋势;但在药物作用 72 h 后，凋亡细胞的比例反而明显减少，细胞周期的分布基本等同于对照组细胞(表 2).

2.4 PC-3 细胞的超微结构变化 透射电镜下观察，未加药的对照组 PC-3 细胞形态不规则，大小不一，胞核较大，核仁明显，常染色体丰富，异染色体紧贴在核膜周边形成一薄层，细胞膜表面有少量微绒毛，细胞间出现连接结构，细胞器丰富，可见粗面内质网、发达的高尔基体、游离核糖体、小而圆的线粒体以及溶酶体. 而 As_2O_3 注射液作用后，PC-3 细胞则发生了超微结构的明显改变，表现为细胞连接和特化的质膜结构消失，核仁增大，细胞内出现染色体，随着药物作用时间的延长，进一步发展，细胞表面形成数目不等，大小不一的细胞突起，使细胞外形呈星状;核膜扭曲内摺，并发生断裂，使核碎裂为大小不等的颗粒或碎块而分散于细胞中，胞质内质网扩张，线粒体形态基本不变，初期细胞膜保持完整，继而细胞膜内陷，至 As_2O_3 注射液作用 48 h 时，细胞被分割成外有膜包绕的细胞质团块，其中含有核染色质碎块及细胞器成分，即典型的凋亡小体(图 3).

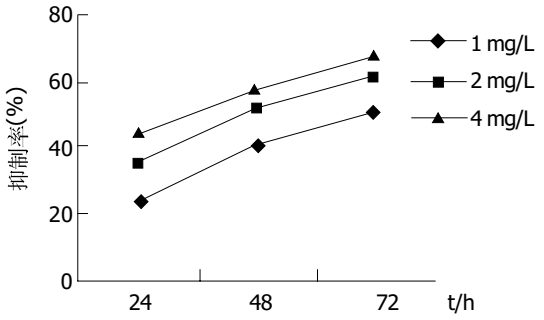


图 2 AS_2O_3 对 PC-3 细胞生长的抑制率.

2.5 PC-3 细胞凋亡相关基因蛋白的表达 未加药的对照组 PC-3 细胞，Bax 表达强(+++)，Bcl-2 表达强(+++)，Fas 表达弱(+)，Fas-L 表达阴性(-);经 As_2O_3 作用 48 h 后，Bax 仍表达较强(+++)，Bcl-2 表达弱(+)，Fas 表达增强(+++)，Fas-L 表达增强(+++).

表2 As_2O_3 对 PC-3 细胞凋亡及细胞周期的影响(%)

T/h	凋亡	G_0/G_1	S	G_2/M
0	0.2	60.9	14.9	24.2
12	3.8	39.5	23.9	36.6
24	21.9	38.6	37.1	24.3
48	27.4	31.8	63.7	4.6
72	2.1	87.2	0	12.8

3 讨论

三氧化二砷(arsenic trioxide，As_2O_3，亚砷酸)是传统中药砒霜的主要成分. 韩云太 *et al* 采取静脉注射 As_2O_3 注射液治疗急性早幼粒细胞白血病(AML-M_3 型，简称APL)，获得突出效果，该药主要是通过诱导白血病细胞分化和凋亡而发挥抗肿瘤作用[21-24]. 经

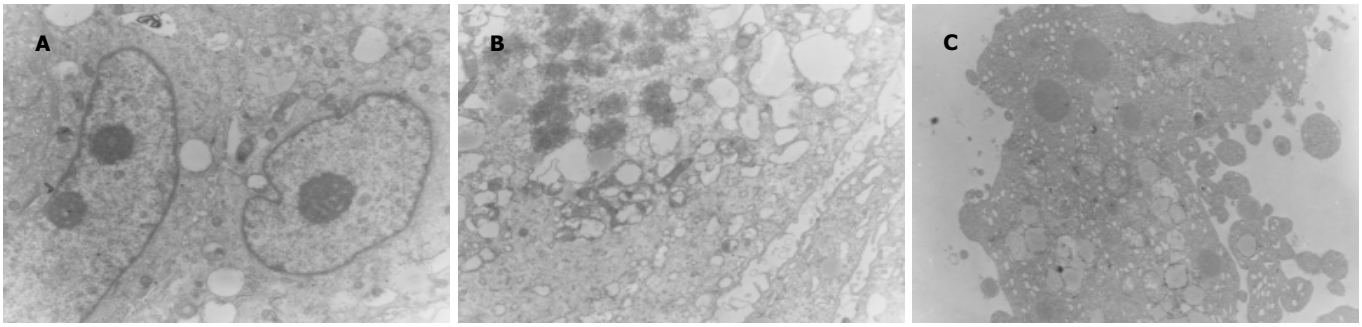


图 3 PC-3 细胞的超微结构变化. A: 未加药组; B: AS_2O_3 作用 24 h; C: AS_2O_3 作用 48 h.

As_2O_3作用后，通过对胰腺癌细胞生长活力和诱导凋亡情况的动态观察，我们发现药物作用于细胞后1-3 d内，细胞抑制率一直随时间的延长而持续上升，而细胞的凋亡率却在48 h达到较高水平后开始下降，这提示我们As_2O_3引起的人胰腺癌细胞死亡是非典型死亡，即凋亡与坏死现象共存，As_2O_3在诱导人胰腺癌细胞凋亡的同时也发挥了一定的细胞毒作用;另一原因可能是在凋亡后期发生继发性细胞膜改变而成为继发性坏死.通过流氏细胞术发现，As_2O_3可将细胞周期阻滞于S期，从而阻抑细胞有丝分裂.透射电镜观察到As_2O_3作用24 h后，较多细胞处于分裂期，核膜消失，出现染色体.As_2O_3对细胞周期的影响，可能是其诱导凋亡的机制之一.

Bcl-2家族[25-26]在细胞凋亡的调控中起着重要的作用，Bcl-2具有抑制细胞凋亡，延长细胞生命的功能.在诸多凋亡相关基因中尤显重要，被看做是细胞凋亡调控的最后共同通路之一.Bax[27-29]是Bcl-2家族的另一成员，与Bcl-2作用相反，具有促进细胞凋亡的作用.Fas基因[30-32]也称APO-1或CD95，是存在于人细胞表面介导凋亡的蛋白质分子，属于TNF受体和NGF受体家族的成员，通过与其配体(Fas-L)交联，即可诱导典型的细胞凋亡.As_2O_3诱导的人胰腺癌PC-3细胞凋亡存在以上基因主动参与的激活过程.本研究为临床上应用As_2O_3注射液治疗胰腺癌提供了科学客观的实验依据.

4 参考文献

1 Verma M. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat* 2005;4:295-301

2 Saif MW, Sviglin H, Carpenter M. Impact of ethnicity on outcome in pancreatic carcinoma. *JOP* 2005;6:246-254

3 Hahn SA, Bartsch DK. Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2004;33:919-934

4 Hahn SA, Bartsch DK. Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Clin Lab Med* 2005;25:117-133

5 张明娟, 黄珏东, 孙宇光, 庞效芬. 单药吉西他滨治疗老年晚期胰腺癌的临床观察. 中国肿瘤临床与康复 2005;12:71-72

6 王晓稼. 抗肿瘤新药吉西他滨临床研究进展. 肿瘤学杂志 2005;11:69-71

7 吕平, 王春友, 熊炯炘, 刘芳, 周峰, 陈立波, 润晓勤, 赵刚, 王帆. 吉西他滨对进展期胰腺癌的治疗作用. 中华肝胆外科杂志 2004;10:238-241

8 崔朝勃, 麦灿荣, 李龙芸. 吉西他滨治疗胰腺癌. 中国新药杂志 1999;8:516-519

9 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. 世界华人消化杂志 2000;8:532-535

10 苏颖, 陈增, 邹长棪, 林可婧, 林华妹. 三氧化二砷对人肝癌细胞作用的研究. 肿瘤防治杂志 2003;10:1069-1071

11 任纬纬, 李弘, 张洹. 三氧化二砷对肝癌细胞生长抑制作用差异性探讨. 中国病理生理杂志 2004;7:1179-1182

12 华海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英. 三氧化二砷对人肝癌细胞黏附和侵袭影响的实验研究. 中国中西医结合杂志 2004;24:922-925

13 Liu LX, Zhu AL, Chen W, Guo HX, Wang XQ, Liu ZH, Zhang TD, Jiang HC, Wu M. The effect and mechanism of arsenic trioxide on hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Waike Zazhi* 2005;43:33-36

14 秦叔逵. 三氧化二砷治疗原发性肝胆癌的研究进展. 肿瘤学杂志 2001;7:115-117

15 项颖, 黄凤鸣. 三氧化二砷注射液治疗中晚期原发性肝癌16例报告. 临床肿瘤学杂志 2003;8:36-37

16 高勇, 贾绍昌, 王杰军, 许青, 郭静. 三氧化二砷诱导人胰腺癌细胞凋亡的实验研究. 第二军医大学学报 2001;22:43-46

17 张兴荣, 蔡洪培, 陈岳祥, 谢渭芬, 沈建伟. 氧化砷诱导胰腺癌细胞凋亡的实验研究. 胰腺病学 2002;2:38-40

18 陈其奎, 袁世珍, 黄志清. 三氧化二砷诱导胰腺癌细胞周期阻滞与凋亡作用. 中华医学杂志 1998;78:578-579

19 张兴荣, 蔡洪培, 邓志华, 沈建伟. 细胞内Ca^{2+}变化在砷剂诱导胰腺癌细胞株凋亡中的作用. 第二军医大学学报 2001;22:422-424

20 Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. *Cancer Invest* 2004;22:389-400

21 马军. 三氧化二砷在白血病治疗中的临床应用. 中国处方药 2004;10:17-20

22 杜可军, 陈景元. 三氧化二砷与肿瘤的细胞凋亡. 微量元素与健康研究 2001;18:67-69

23 卢香兰, 王萍萍, 刘云鹏, 李霞. 三氧化二砷对人白血病细胞株NB4和K562及MOLt4的增殖、周期及凋亡的影响. 肿瘤防治杂志 2004;11:586-588

24 麦玉洁, 邱录贵. 三氧化二砷治疗恶性血液系统疾病的机制. 国外医学·生理、病理科学及临床分册 2004;24:166-169

25 Sharma J, Srinivasan R, Majumdar S, Mir S, Radotra BD, Wig JD. Bcl-XL protein levels determine apoptotic index in pancreatic carcinoma. *Pancreas* 2005;30:337-342

26 Brazdil J, Lukas Z, Hermanova M, Pazourkova M, Ruzicka M, Habanec B, Kren L, Dite P. Apoptosis and expression of bcl-2 protein in invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cesk Patol* 2003;39:168-173

27 吴晓康, 吴育连, 郑樟栋, 吴荣进, 楼善贤, 王丽霞. 胰腺癌细胞凋亡与*bcl-2, bax*基因的表达. 中国普通外科杂志 2002;11:171-173

28 Manoj K, Liu ZR, Tian R, Qin RY. Mechanisms of inhibition of growth of human pancreatic carcinoma implanted in nude mice by somatostatin receptor subtype 2. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2004;84:760-765

29 张元, 夏曙霞, 钱家勤. *Bax*基因表达在胰腺癌组织细胞凋亡中的作用. 肝胆外科杂志 2002;10:344-346

30 Pernick NL, Sarkar FH, Tabaczka P, Kotcher G, Frank J, Adsay NV. Fas and Fas ligand expression in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2002;25:136-141

31 Radfar S, Davrinche C, Hollande E. Serial in vivo loss and in vitro gain of Fas expression and function in human cancerous pancreatic duct cells. *Int J Cancer* 2005;115:214-223

32 Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, Farraye FA, Joo HG, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape. *Cancer* 2002;94:2552-2560

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1717-1720
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•基础研究 BASIC RESEARCH•

消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应

王昌成

王昌成, 淮安市第二人民医院消化科 江苏省淮安市 223002
王昌成, 男, 1964 – 03 – 06生, 江苏省泗阳县人, 汉族, 1991年上海第二医科大学消化内科硕士, 主任医师, 主要从事消化系疾病的基础和临床研究.
通讯作者: 王昌成, 223002, 江苏省淮安市第二人民医院消化科.
wangchangcheng8001@163.com
收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-15

Effects of indomethacin and aspirin on gastric acid secretion in C57BL/6 and Balb/c mice

Chang-Cheng Wang

Chang-Cheng Wang, Department of Gastroenterology, Huaian Second People's Hospital, Huaian 223002, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Dr. Chang-Cheng Wang, Department of Gastroenterology, Huaian Second People's Hospital, Huaian 223002, Jiangsu Province, China. wangchangcheng8001@163.com
Received: 2005-04-26 Accepted: 2005-05-15

Abstract

AIM: To investigate the effects of indomethacin and aspirin on the gastric acid secretion and gastric lesions in C57BL/6 and Balb/c mice.

METHODS: The total acid volume (mL), acidity ([H^+] mmol/L) and total 3-hour acid output (μmol/h) were determined after intraperitoneal administration of indomethacin and aspirin in the two different strains of mice by pylorus ligation technique and the gastric lesions were evaluated by Lanza score. Histamine-stimulated [^{14}C]-aminopyrine accumulation was used to determine the changes of gastric acid secretion in the two strains of mice *in vitro*.

RESULTS: In baseline, total acid volume and total 3-hour acid output were significantly different between C57BL/6 and Balb/c mice (0.82±0.06 *vs* 2.32±0.18, P <0.0 001; P = 0.3 772.9±0.4 *vs* 9.7±1.6, P = 0.0 005), while the acidity was not (P = 0.377). In C57BL/6 mice, after administration of indomethacin, the total acid volume and total 3-hour acid output were 2.08±0.16 and 2.9±0.4 respectively, which were significantly higher than those in baseline (both P<0.0 001), while the acidity wasn't (P = 0.11); After administration of aspirin, the total acid volume, acidity and total 3-hour acid output were 1.5±0.3, 16.1±1.4 and 8.7 ± 2.7 respectively, which were all markedly increased as compared with those in baseline (P = 0.03, 0.009, 0.03). In Balb/c mice, after administration of indomethacin, the total acid volume and acidity were 3.4 ± 0.3 and 5.8 ± 1.0 respectively, which were obviously higher than those in baseline (P = 0.007, 0.01), while the total 3-hour acid output wasn't (P = 0.16); After administration of aspirin, the total acid volume, acidity and total 3-hour acid output were all not significantly different from those in baseline (P = 0.15, 0.15, 0.7). After administration of indomethacin, the Lanza scores in C57BL/6 and Balb/c mice were 12.6±0.9 and 16.4±1.1 respectively (P = 0.03), and after administration of aspirin, those were 10.4 ± 1.0 and 11.0 ± 1.1 respectively (P = 0.91). Disintegrations per second (DPS) of gastric glandular cells were significantly lower in C57BL/6 mice than that in Balb/c ones when different concentrations of histamine were used (10^{-5} mol/L: 30.8 ± 8.5 *vs* 120.8 ± 23.0, P = 0.006; 10^{-4} mol/L: 45.1±7.1 *vs* 236.1±48.7, P = 0.005; 10^{-3} mol/L: 37.9 ± 5.3 *vs* 199.4 ± 35.2, P = 0.002).

CONCLUSION: The gastric acid secretion is significantly different between C57BL/6 and Balb/c mice. Different effects of indomethacin and aspirin on gastric acid secretion exist between the two strains of mice.

Key Words: Indomethacin; Aspirin; C57BL/6; Balb/c; Gastric acid

Wang CC. Effects of indomethacin and aspirin on gastric acid secretion in C57BL/6 and Balb/c mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1717-1720

摘要

目的: 观察非甾体类抗炎药消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的影响及胃黏膜损害的效应.

方法: 应用幽门结扎术，测定消炎痛(40 mg/kg)和阿斯匹林 (250 mg/kg) *i.p*后C57BL/6和Balb/c小鼠总胃酸分泌量(mL)，胃酸度([H^+]mmol/L)以及3 h总酸度(μmol/h)并应用Lanza score评分观察药物对胃黏膜的损害程度.同时应用[^{14}C]－氨基比林蓄积试验观察2种小鼠离体胃对组胺刺激的效应.

结果: 在基础状态下，C57BL/6和Balb/c小鼠的总胃酸分泌量和总酸度显著不同(0.82 ± 0.06 *vs* 2.32 ± 0.18; P<0.0 001; 2.9 ± 0.4 *vs* 9.7 ± 1.6, P = 0.0 005)，而胃酸度没有显著差别(P = 0.377).在C57BL/6小鼠，腹腔内应用消炎痛后总胃酸分泌量和总酸度与基础水平

相比差别显著(2.08 ± 0.16 *vs* 0.82 ± 0.06, P<0.0 001; 9.4 ± 1.1 *vs* 2.9 ± 0.4, P<0.0 001)，而胃酸度也没有显著差别(P = 0.11);腹腔内应用阿斯匹林后总胃酸分泌量，胃酸度以及总酸度分别为 1.5 ± 0.3、16.1 ± 1.4 和 8.7 ± 2.7，与基础水平相比均有显著差异(P = 0.03, 0.009, 0.03);在 Balb/c 小鼠，腹腔内应用消炎痛后总胃酸分泌量，胃酸度以及总酸度分别为 3.4 ± 0.3、5.8 ± 1.0 和 6.5 ± 1.2，前二者与基础水平相比有显著差异(P = 0.007, 0.01); 腹腔内应用阿斯匹林后总胃酸分泌量，胃酸度以及总酸度与基础水平相比均没有显著差异(P = 0.15, 0.15, 0.7).应用消炎痛后，C57BL/6 和 Balb/c 小鼠 Lanza score 分别为 12.6 ± 0.9 和 16.4 ± 1.1 (P = 0.03); 应用阿斯匹林后, C57BL/6 和 Balb/c 小鼠 Lanza score 为 10.4 ± 1.0 和 11.0 ± 1.1 (P = 0.91).应用 [^{14}C]- 氨基比林蓄积试验观察 2 种小鼠离体胃对组胺刺激的效应，发现 C57BL/6 小鼠对不同浓度组胺刺激的效应显著低于 Balb/c 小鼠(10^{-5} mol/L: 30.8 ± 8.5 *vs* 120.8 ± 23.0, P = 0.006; 10^{-4} mol/L: 45.1 ± 7.1 *vs* 236.1 ± 48.7, P = 0.005; 10^{-3} mol/L: 37.9 ± 5.3 *vs* 199.4 ± 35.2, P = 0.002)

结论: C57BL/6和Balb/c小鼠的胃酸分泌生理功能存在显著差异.消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠的胃酸分泌功能和胃黏膜损害产生不同的效应.

关键词: 消炎痛; 阿斯匹林; C57BL/6; Balb/c; 胃酸

王昌成. 消炎痛和阿斯匹林对 C57BL/6 和 Balb/c 小鼠胃酸分泌的效应. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1717-1720
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1717.asp

0 引言

胃酸分泌是由涉及到内分泌，神经分泌和旁分泌机制的中枢和外周通路调控的.非甾体类抗炎药是临床上应用最广泛的药物之一，可抑制胃黏膜中前列腺素的合成使胃酸分泌增加,因此常常导致胃黏膜的损害.我们应用幽门结扎术，通过腹腔内应用消炎痛和阿斯匹林，观察他们对C57BL/6和Balb/c小鼠离体胃酸分泌功能的影响.同时应用[^{14}C]-氨基比林蓄积试验观察小鼠离体胃对组胺刺激后胃酸分泌的生理学效应.

1 材料和方法

1.1 材料 雄性C57BL/6(31-50g，52wk)和Balb/c(22-31 g，52 wk)小鼠在加拿大McMaster大学动物实验中心喂养，温度21-23℃，湿度 40-50%.所有动物实验前禁食24 h，自由饮水.实验中动物的应用经过McMaster大学动物研究伦理委员会批准.

1.2 方法 动物于禁食24 h后，按照Shay *et al*[1]方法，在轻度麻醉下打开腹腔，找到幽门并在其远端结扎，迅速关闭腹腔.然后腹腔内给予消炎痛40 mg/kg或阿斯匹林250 mg/kg，3 h后结扎食管下端，收集胃内容物离心后记录胃液量，同时用0.1 mol/L NaOH 滴定50 μL 样本至pH 7.0(Extech pH,Canada)测定胃酸度([H^+]mmol/L)以及3 h总酸量(μmol/h).打开胃腔，按照Lanza *et al*[2]评分观察胃黏膜损害程度:(0没有可见的糜烂;1＋1个出血或糜烂;2＋2-10出血或糜烂;3＋11-25出血或糜烂;4＋>25出血或糜烂或一个任何大小的侵入性溃疡).按照Berglindh[3]的方法准备胃腺体，动物被杀死后，迅速取出胃并沿胃小弯打开，放在37℃ pH 7.3含纯氧的PBS中，用钝刀轻轻刮取小鼠胃黏膜，用含纯氧的PBS洗涤2次(1 400 r/min，5 min)，将刮取的胃黏膜置于含有2 g/L葡萄糖，1 g/L小牛血清白蛋白(BSA，Sigma A-7888，USA)，0.25 g/L Ⅱ-s型大豆胰酶抑制剂(Sigma T-9128)和0.23 g/L Ⅳ型胶原酶(Sigma C-5138)的PBS(应用前充入950 mL/L O_2和50 mL/L CO_2气体至少15 min)溶液中.然后置小鼠胃黏膜于100 mL含有消化酶的PBS中37℃ 30 min(同时用磁棒约100 r/min均匀搅动).酶消化结束后，用尼龙网(孔径500 μm，Small Parts Inc，USA)过滤残渣以及未消化的胃黏膜，然后用不含消化酶的PBS中洗涤3次(2 000 r/min，5 min)，最后将胃腺体标本置于含有2 g/L葡萄糖，2 g/L小牛血清白蛋白，1.2 mmol/L $MgSO_4$和1 mmol/L $CaCl_2$的15 mL 纯氧PBS中准备使用.应用[^{14}C]-弱碱氨基比林蓄积试验测定胃酸，将0.5 mL胃腺体加入含有25 μL不同浓度组胺(10^{-5} mol/L，10^{-4} mol/L，10^{-3} mol/L)和20 μL(相当于0.25 μCi)氨基比林(Amersham Pharmacia Biotech，Canada;specific activity 4255GBq /mol)试管中孵育60 min并予以旋转，应用25 μL蒸馏水为空白对照.孵育结束后，用含有2 g/L葡萄糖，2 g/L小牛血清白蛋白，1.2 mmol/L $MgSO_4$和1 mmol/L $CaCl_2$的PBS洗涤3次(2 600 r/min，5 min)，然后样本被转至闪烁计数管中同时加入1 mL组织溶解剂(NCS-2，Amersham)过夜.第2 d样本中加入10 μL冰醋酸和4 mL闪烁液(ACS，Amersham)后置于Bechman LS 5801(USA)闪烁计数器中测定胃酸含量,结果用胃腺体细胞每秒钟衰变数(DPS)表示.

统计学处理 按每100 g体重计算，用均数±标准误表示，各组之间总胃酸分泌量(mL)，胃酸度([H^+] mmol/L)，测3 h酸度(μmol/h)以及DPS用GraphPad InStat 3统计软件进行非配对t检验(双尾法);Lanza score评分用Mann-Whitney U检验.P<0.05认为具有统计学差异.

2 结果

2.1 胃酸分泌 在基础状态下，C57BL/6(n = 10)和

Balb/c(n = 9)小鼠的总胃酸分泌量(mL)，胃酸度([H^+]mmol/L)和酸度(μmol/h)分别为 0.82 ± 0.06 *vs* 2.32 ± 0.18(t = 8.174，P<0.0001)，10.4 ± 1.3 *vs* 12.3 ± 1.7(t = 0.907，P = 0.377)和 2.9 ± 0.4 *vs* 9.7 ± 1.6(t = 4.275，P = 0.0 005).

在 C57BL/6 小鼠，腹腔内应用(n = 7)消炎痛后总胃酸分泌量(mL)，胃酸度([H^+]mmol/L)和酸度(μmol/h)分别为 2.08 ± 0.16 *vs* 0.82 ± 0.06(t = 8.281，P<0.0 001)，13.4 ± 1.0 *vs* 10.4 ± 1.3(t = 1.689，P = 0.11)和 9.4 ± 1.1 *vs* 2.9 ± 0.4(t = 6.222，P<0.0 001);腹腔内应用(n = 8)阿斯匹林后总胃酸分泌量(mL)，胃酸度([H^+]mmol/L)以及酸度(μmol/h)分别为 1.52 ± 0.32 *vs* 0.82 ± 0.06(t = 2.348，P = 0.03)，16.1 ± 1.4 *vs* 10.4 ± 1.3(t = 2.993，P = 0.009)和 8.7 ± 2.7 *vs* 2.9 ± 0.4(t = 2.366，P = 0.03). 在 Balb/c 小鼠，腹腔内应用(n = 7)消炎痛后总胃酸分泌量(mL)，胃酸度([H^+]mmol/L)和酸度(μmol/h)分别为 3.4 ± 0.31 *vs* 2.32 ± 0.18(t = 3.173，P = 0.007)，5.8 ± 1.0 *vs* 12.3 ± 1.7(t = 3.005，P = 0.01)和 6.5 ± 1.2 *vs* 9.7 ± 1.6(t = 1.493，P = 0.16);腹腔内应用(n = 7)阿斯匹林后总胃酸分泌量(mL)，胃酸度([H^+]mmol/L)和酸度(μmol/h)分别为 3.1 ± 0.5 *vs* 2.32 ± 0.18(t = 1.514，P = 0.15)，9.1 ± 0.8 *vs* 12.3 ± 1.7(t = 1.506，P = 0.15)和 8.9 ± 1.1 *vs* 9.7 ± 1.6(t = 0.389，P = 0.7).

2.2 小鼠胃 Lanza score 评分 应用消炎痛后，C57BL/6(n = 7)和 Balb/c(n = 7)小鼠 Lanza score 分别为 12.6 ± 0.9 *vs* 16.4 ± 1.1(P = 0.03);应用阿斯匹林后，C57BL/6(n = 8)和 Balb/c(n = 7)小鼠 Lanza score 分别为 10.4 ± 1.0 *vs* 11.0 ± 1.1(P = 0.91).

2.3 小鼠对组胺刺激的效应 C57BL/6(n = 15)小鼠对组胺刺激的效应显著低于 Balb/c 小鼠(n = 14)[组胺浓度 10^{-5} mol/L，10^{-4} mol/L 和 10^{-3} mol/L 时胃腺体细胞每秒钟衰变数(DPS)分别为 30.8 ± 8.5 *vs* 120.8 ± 23.0(t = 3.674，P = 0.006)，45.1 ± 7.1 *vs* 236.1 ± 48.7(t = 3.88，P = 0.005)和 37.9 ± 5.3 *vs* 199.4 ± 35.2(t = 4.542，P = 0.002);空白对照组 C57BL/6 和 Balb/c 的 DPM 分别为 17.1 ± 6.2 和 20.3 ± 4.1(t = 0.423，P = 0.68).

3 讨论

酸分泌在许多食管，胃和十二指肠疾病的发病机制中起至关重要的作用. 在动物模型和人类如非甾体类抗炎药诱发的糜烂和溃疡中，胃黏膜的分泌状态可能与他们不同的形态学变化密切相关. 非甾体类抗炎药如消炎痛和阿斯匹林等常可引起胃黏膜的损害，他是导致消化道溃疡和出血的主要原因之一. 氨基比林蓄积试验是一种研究人类酸分泌[4]和动物壁细胞或胃腺体[3]的可靠方法. 应用 *H. felis* 感染的 Balb/c 小鼠发现局部酸产生对胃内 *Helicobacter* 种类的分布至关重要[5-6]. 在这些小鼠，*H. felis* 主要局限于幽门和贲门，仅在伴随药物性酸抑制的时候才侵犯胃体部. 与此相反，*H. felis* 感染的 C57BL/6 小鼠则趋向于定植在分泌胃酸的胃体黏膜，导致壁细胞数量的减少和随之发生的胃萎缩[7-9]. 这种小鼠对 *H pylori* 感染反应的种系特异性差异主要由于参与主导免疫反应类型的不同，Balb/c 小鼠主要与 TH2 有关，而 C57BL/6 主要与 TH1 有关[10-11]. Kuroda *et al*[12]研究表明，用 LPS 刺激后，Balb/c 小鼠腹膜和脾脏中巨噬细胞产生的 PEG_2 显著高于 C57BL/6 小鼠，同时 Balb/c 和 C57BL/6 小鼠巨噬细胞中 COX-2 蛋白的表达明显不同. 他们认为，Balb/c 小鼠巨噬细胞产生大量 PGE_2 是由微粒体 PEG 合成酶和磷脂酶 A_2 而不是由 COX-2 调控的，与 Th1 细胞受抑制有关. 本研究表明，在基础状态下，Balb/c 小鼠的胃酸量和 3 h 总酸量显著高于 C57BL/6 小鼠，胃酸度稍高于 C57BL/6 小鼠;同时应用[^{14}C]-氨基比林蓄积试验观察两种离体小鼠胃对组胺刺激的效应，发现 C57BL/6 小鼠对组胺刺激的效应显著低于 Balb/c 小鼠，这些结果表明在基础状态下两种小鼠的胃酸分泌功能存在显著差异. 在 C57BL/6 小鼠，应用消炎痛和阿斯匹林后胃酸产生显著增多;在 Balb/c 小鼠，应用消炎痛后胃酸产生显著增加，但应用阿斯匹林后除了胃酸容量稍有增加外，胃酸度和 3 h 总酸度却有减少，提示两种不同基因特性的小鼠对非甾体抗炎药呈现不同的胃酸分泌效应. Kuroda *et al*[12]研究发现，Balb/c 小鼠巨噬细胞产生的 PEG_2 显著高于 C57BL/6 小鼠，而 PEG_2 可抑制胃酸的分泌. Takeuchi *et al*[13]应用消炎痛等药物对 SD 大鼠进行研究，发现口服 30 mg/kg 消炎痛在 8 h 内可引起明显的胃黏膜损害，而同样剂量的选择性 COX-1 抑制剂(SC-560)和 COX-2 抑制剂(rofecoxib)却不引起明显的胃黏膜损害;在给予消炎痛和 SC-560 后 2 h 内胃黏膜 PEG_2 含量较正常下降 20%，而 rofecoxib 却未产生任何影响;在幽门结扎术前 1 h 给予口服消炎痛 30 mg/kg 没有发现对大鼠的胃酸分泌产生效应[对照组和消炎痛组的容量(mL)和酸度(μmol/h)分别为 7.1 ± 0.8 *vs* 6.7 ± 1.1 和 178.8 ± 12.4 *vs* 162.4 ± 8.4]. 同时我们应用 Lanza score 法对消炎痛和阿斯匹林引起的胃黏膜损害进行评价，发现应用消炎痛后，C57BL/6 小鼠的 Lanza score 显著低于 Balb/c 小鼠(P = 0.03);但应用阿斯匹林后，C57BL/6 和 Balb/c 小鼠的 Lanza score 却

没有显著统计学差异.我们认为这主要与基础状态下Balb/c小鼠胃酸分泌显著高于C57BL/6小鼠有关.消炎痛和阿斯匹林同属于非选择性非甾体类抗炎药物，其COX-1/COX-2比率有所不同，这可能是导致他们对不同种系特异性小鼠产生不同效应的原因之一，其确切机制有待于进一步的研究.

我们的研究结果表明，C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌功能存在显著差异.消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠的胃酸分泌功能和胃黏膜损害产生不同的影响效应.

致谢:感谢加拿大McMaster大学Ireneusz T Padol和Richard H.Hunt教授.

4 参考文献

1 Shay H, Sun DC, Gruenstein M. A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. *Gastroenterology* 1954;26:906-913
2 Lanza FL, Aspinall RL, Swabb EA, Davis RE, Rack MF, Rubin A. Double-blind, placebo-controlled endoscopic comparison of the mucosal protective effects of misoprostol versus cimitidine on tolmetin-induced mucosal injury to the stomach and duodenum. *Gastroenterology* 1988;95:289-294
3 Berglindh T. Gastric glands and cells: preparation and in vitro methods. *Methods Enzymol* 1990;192:93-107
4 Mardh S, Norberg L, Ljungstrom M, Wollert S, Nyren O, Gustavsson S. A method for in vitro studies on acid formation in human parietal cells. Stimulation by histamine, pentagastrin and carbachol. *Acta Physiol Scand* 1985;123:349-354
5 Danon SJ, O'Rourke JL, Moss ND, Lee A. The importance of local acid production in the distribution of *Helicobacter felis* in the mouse stomach. *Gastroenterology* 1995;108:1386-1395
6 Lee A, Dixon MF, Danon SJ, Kuipers E, Megraud F, Larsson H, Mellgard B. Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:461-465
7 Dial EJ, Hall LR, Romero JJ, Lechago J, Fox JG, Lichtenberger LM. Altered gastrin regulation in mice infected with *Helicobacter felis*. *Dig Dis Sci* 2000;45:1308-1314
8 Fox JG, Li X, Cahill RJ, Andrutis K, Rustgi AK, Odze R, Wang TC. Hypertrophic gastropathy in *Helicobacter felis*-infected wild-type C57BL/6 mice and p53 hemizygous transgenic mice. *Gastroenterology* 1996;110:155-166
9 Sakagami T, Dixon M, O'Rourke J, Howlett R, Alderuccio F, Vella J, Shimoyama T, Lee A. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut* 1996;39:639-648
10 van Doorn NE, Namavar F, Sparrius M, Stoof J, van Rees EP, van Doorn LJ, Vandenbroucke-Grauls CM. *Helicobacter* pylori-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infect Immun* 1999;67:3040-3046
11 Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promotea delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol* 1996;156:4729-4738
12 Kuroda E, Yamashita U. Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E_2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant Balb/c mice. *J Immunol* 2003;170:757-764
13 Takeuchi K, Tanaka A, Hayashi Y, Kubo Y. Functional mechanism underlying COX-2 expression following administration of indomethacin in rat stomachs: importance of gastric hypermotility. *Dig Dis Sci* 2004;49:180-187

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005年第四次全国幽门螺杆菌学术会议征文通知

本刊讯 由中华医学会消化病学分会主办，湖南省医学会、湖南省医学会消化病学专业委员会承办的第四次全国幽门螺杆菌学术会议定于2005-10中旬在湖南省长沙市召开，现将征文通知公布如下：

1 内容

文章内容包括：幽门螺杆菌流行病学及其他传播途径、幽门螺杆菌的致病机理及其分子机制、幽门螺杆菌相关性疾病的研究、幽门螺杆菌与胃肠道外疾病、幽门螺杆菌与胃癌的研究进展、幽门螺杆菌诊治进展、幽门螺杆菌耐药研究进展.

2 论文寄送地址

湖南省长沙市湘雅路87号，中南大学湘雅医院消化科 袁伟健教授 收；邮编：410008.电话：0731-4327106，4327282.请在信封上注明“全国幽门螺杆菌会议征文”.

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1721-1724
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•基础研究 BASIC RESEARCH•

^{103}pd 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响

何贵金, 吴 荣, 高沁怡, 许书河, 高 红, 姜维国, 蒋 涛, 戴显伟, 马 凯

何贵金, 戴显伟, 马凯, 中国医科大学第二临床学院普外科 辽宁省沈阳市 110004
吴荣, 中国医科大学第二临床学院放疗中心 辽宁省沈阳市 110004
高沁怡, 中国医科大学第一临床学院同位素室 辽宁省沈阳市 110001
许书河, 中国原子能研究院同位素研究室 北京市 100050
高红, 蒋涛, 中国医科大学第二临床学院儿外实验室 辽宁省沈阳市 110004
姜维国, 中国医科大学第二临床学院病理科 辽宁省沈阳市 110004
何贵金, 男, 1962-6-29 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 1988 年中国医科大学本科毕业, 2003 年博士研究生毕业, 普外科副教授, 主要从事肝胆疾病内放射治疗研究.
通讯作者: 何贵金, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大学第二临床学院普外科.
收稿日期: 2005-03-14 接受日期: 2005-04-01

Effect of ^{103}pd radioactive stent on apoptosis of smooth muscle cells in bile duct and expression of caspase-3, Fas and *bcl*-2 gene in dogs

Gui-Jin He, Rong Wu, Qin-Yi Gao, Shu-He Xu, Hong Gao, Wei-Guo Jiang, Tao Jiang, Xian-Wei Dai, Kai Ma

Gui-Jin He, Xian-Wei Dai, Kai Ma, Department of General Surgery, the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, China
Rong Wu, Center of Radiation Therapy, the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, China
Qin-Yi Gao, Department of Nuclear Medicine, the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, China
Shu-He Xu, Department of Isotope Research, China Institute of Atomic Energy, Beijing 100050, China
Hong Gao, Tao Jiang, Department of Surgical Experiment, the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, China
Wei-Guo Jiang, Department of Pathology, the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, China
Correspondence to: Gui-Jin He, Department of General Surgery, the Second Clinical College of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, China.
Received: 2005-03-14 Accepted: 2005-04-01

Abstract

AIM: To investigate the expression of caspase-3, Fas and *bcl*-2 gene in γ-radiation-induced smooth muscle cells of bile duct.

METHODS: Twelve dogs were randomly divided into ^{103}pd radioactive stent group (PRS, n = 6) and the control group (NC, n = 6). Stenosis models of biliary duct after injury were established. ^{103}pd radioactive and normal stent were transplanted into the dogs of PRS and NC groups respectively. The γ-radiation-induced apoptosis of the smooth muscle cells and the expression of Fas, *bcl*-2 gene were detected by TUNEL and immunohistochemistry respectively. The expression of caspase-3 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The caspase-3 and Fas gene were highly expressed (0.44 ± 0.09, 83.33% respectively) in dogs of PRS group, and significant apoptosis of muscle cells (87.90 ± 7.96) was observed. There was no marked stenosis in extrahepatic duct. However, caspase-3 and Fas were lowly expressed (0.16±0.02, 50.00% respectively) in dogs of NC group, and no significant apoptosis of muscle cells (5.60 ± 0.51) was observed. Significant difference existed between dogs of PRS and NC group in caspase-3, Fas and *bcl*-2 expression and the apoptosis of muscle cells (P<0.05). Marked stenosis appeared in extrahepatic duct. The expression of *bcl*-2 gene was significantly decreased in dogs of PRS group as compared with than of NC group (16.66% *vs* 83.33%, P<0.05).

CONCLUSION: ^{103}pd radioactive stent can increase the expression of caspase-3 and Fas gene and promote the apoptosis of smooth muscle cells of bile duct. The level of *bcl*-2 expression is associated with the sensitivity of muscle cells to γ-radiation. ^{103}pd radioactive stent can facilitate the apoptosis of muscle cells by reducing *bcl*-2 expression, so as to prevent the stenosis of extrahepatic duct.

Key Words: ^{103}pd radioactive stent; γ-radiation; Caspase-3; Fas; *Bcl*-2; Apoptosis

He GJ, Wu R, Gao QY, Xu SH, Gao H, Jiang WG, Jiang T, Dai XW, Ma K. Effect of ^{103}pd radioactive stent on apoptosis of smooth muscle cells in bile duct and expression of caspase-3, Fas and *bcl*-2 gene in dogs. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(14):1721-1724

摘要

目的: 探讨γ射线对胱冬肽酶-3（caspase-3），Fas 和 *bcl*-2基因在犬胆管壁增殖平滑肌细胞凋亡中的活性影响及意义.

方法: 犬 12 只随机分 2 组，每组 6 只;建立胆管损伤后狭窄模型，在犬胆管内分别植入 ^{103}pd(^{103} 钯)放射性支架和普通胆管支架，采用 HE，TUNEL，RT-PCR，免疫组化检测增殖内膜中胆管平滑肌细胞增殖、凋亡及相关 caspase-3，*bcl*-2 和 Fas 基因表达，在 JEM-1200EX 电镜下观察凋亡细胞超微结构变化，并用计

算机图像检测系统检2组胆管腔面积.

结果: ^{103}pd支架组犬胆管组织中caspase-3和Fas基因表达较普通支架组明显（0.44 ± 0.09 *vs* 0.16 ± 0.02, 83.33% *vs* 50.00%, $P<0.05$），出现明显增殖平滑肌细胞凋亡（87.90 ± 7.96 *vs* 5.60 ± 0.51, $P<0.05$），肝外胆管无明显狭窄;而普通支架caspase-3和Fas基因低表达，胆管未出现增殖平滑肌细胞明显凋亡，而肝外胆管有明显狭窄.^{103}pd支架组犬胆管组织中*bcl*-2基因表达较普通支架组弱（16.66% *vs* 83.33%, $P<0.05$），且*bcl*-2基因低表达组犬胆管出现明显增殖平滑肌细胞凋亡，而且犬肝外胆管无明显狭窄;*bcl*-2基因高表达组犬胆管未出现增殖平滑肌细胞明显凋亡，而肝外胆管有明显狭窄.

结论: ^{103}pd放射性支架可以激活caspase-3和Fas基因，促进犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡; *bcl*-2基因表达水平与细胞对辐射的敏感性有关，^{103}pd放射性支架通过降低*bcl*-2基因表达，促进犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡，从而抑制犬肝外胆管狭窄.

关键词: ^{103}pd支架; γ射线; Caspase-3; Fas;*bcl*-2; 凋亡

何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯. ^{103}pd诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1721-1724
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1721.asp

0 引言

Caspase是近年来发现的哺乳动物细胞凋亡相关蛋白酶，其中最引人属目的是Caspase-3，他是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶[1]，参与γ-射线诱导人白血病细胞株HL-60细胞凋亡[2]. 绝大多数的细胞凋亡依赖于caspase基因的激活.特异性地阻断caspase-3的活性可抑制细胞凋亡的产生[3];Fas表达升高后出现明显的细胞凋亡[4]，辐射可以导致或诱发Fas介导的细胞凋亡. *bcl*-2为重要的抗凋亡因子，Bcl-2蛋白通过调节线粒体功能而制约着凋亡的发生. 我们在体内探讨γ射线促进caspase-3基因和Fas基因表达和抑制*bcl*-2基因表达引起犬胆管壁增殖平滑肌细胞凋亡[5]预防胆管再狭窄.

1 材料和方法

1.1 材料 健康本地杂种犬12只，雌、雄不限，体重15-20 kg由中国医科大学附属第二医院动物实验室提供，随机分成2组，每组6只，先用0.1-0.15 ml/kg 846麻醉药，im麻醉后，采用上腹纵行切口逐层进入腹腔，寻找到幽门，在其下2-3 cm处切开十二指肠壁，找到胆总管末端开口，插入球囊导管，于犬胆总管内，通过压力泵向球囊内注入生理盐水，维持压力5 cm水柱，造成犬胆管黏膜撕裂，损伤胆总管后抽出囊内液体，使压力为零. 重复上述损伤2次，然后退出球囊导管，用11F释放器将普通镍钛记忆合金支架从胆总管末端开口处释放到胆总管内. ^{103}pd支架植入犬胆管同普通支架组. ^{103}pd支架是用上述镍钛记忆合金支架将^{103}pd由加速器将质子打入^{103}Rh并释放1个中子生成[^{103}Rh(p，h)^{103}pd]，但需经化学方法提纯^{103}pd含量. ^{103}pd的能量在21-23Kev，释放低能量γ射线，半衰期为17d，衰变后转为稳定态的^{103}Rh. ^{103}pd支架由中国原子能研究院同位素研究所提供，采用化学电镀方法将上述^{103}pd电镀于支架上，通过电镀液含^{103}pd的浓度及电镀时间控制支架表面^{103}pd的量以达到金属支架释放低能量γ射线所需浓度. 共10个^{103}pd支架，^{103}pd的放射性活度为3.4 mci. 两组动物术后继续喂养，预防感染治疗3 d，术后30 d同时处死两组动物，取出一部分胆管并用40 g/L甲醛溶液固定石蜡包埋，制备成HE切片，通过计算机图像分析软件测定以下指标:两组动物总胆管腔面积，胆管内膜厚度，残余胆管腔面积，狭窄程度[(1-残余管腔面积)/总管腔面积之比]，胆管腔周长.

1.2 方法 凋亡细胞原位标记实验(TUNEL)应用Insite Cell Death Detection kit POD(罗氏公司)，细胞核中有棕黄色浓染的为阳性细胞，高倍镜下记数单位视野TUNEL阳性细胞数，3次记数求平均值. 取犬胆管新鲜标本25 g/L戊二醛固定，4℃保存30 min，用10 g/L锇酸固定2 h，0.1 mol/L PBS漂洗，然后用梯度浓度乙醇(30-50-70-80-90-100%)脱水，Epon812包埋剂浸泡包埋，按电镜常规法制备70 nm超薄切片，醋酸铀、柠檬酸铅染色，封片，JEM-1200Ex电镜下观察凋亡细胞超微结构变化.

1.2.1 mRNA分离和caspase克隆及序列测定 分别用总RNA提取试剂盒TRIzol Rengent(GIBCO公司)和mRNA提取试剂盒Poly Attract(Promega公司)按说明分离纯化mRNA. mRNA转录成cDNA，以其为模板，用简并引物半巢式-PCR扩增. 引物序列: 上游: 5′-CAAAATGGATTATCCTGAAATGGG-3′;下游:5′-CCAGGAATAGTAACCAGGTGC-3′;扩增片段:510 bp. 序列分析按试剂盒(70770 Sequenase Version 2,0 DNA Sequencing Kit，Amersham 公司)说明书进行. RT-PCR产物的半定量分析用ΦX 174-HincII和ΦX 174/HaeIII为分子质量标准，取PCR产物10 μL在20 g/L的琼脂糖凝胶电泳，EB染色，紫外灯下观察电泳结果，照相并存入计算机凝胶分析系统，以GAPDH吸光度值标化caspase-3的吸光度值，得到caspase-3的相对含量.

1.2.2 Fas免疫组化 试剂盒购自武汉博士德生物公司. DAB显色，用兔抗Fas基因抗原的抗体，Fas免疫组

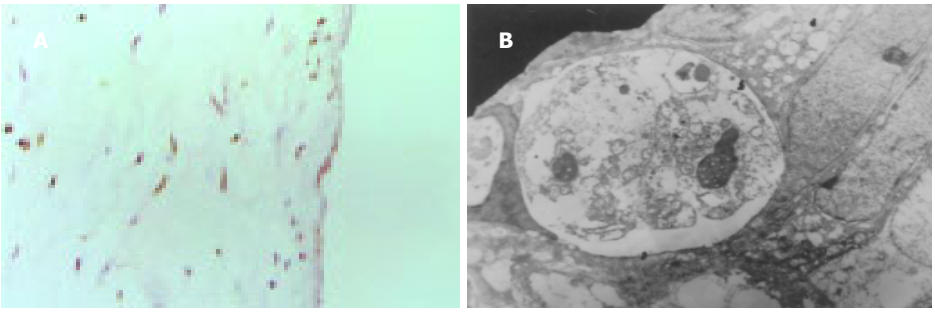


图1 术后 30 d ^{103}pd 支架组犬胆管组织平滑肌细胞凋亡. A: 核呈棕褐色染色(× 400); B: 凋亡小体被细胞吞噬.

化染色后细胞质呈棕褐色的为阳性细胞，细胞质无棕褐色染色的为阴性细胞. 阳性细胞记数分3级:低倍镜(10×)1 cm^2 视野阳性细胞数小于1/3为(+)，1/3-2/3为(++)，大于2/3为(+++).

1.2.3 *bcl*-2 免疫组化 试剂盒购自武汉博士德生物公司. DAB 显色，用兔抗 *bcl*-2 基因抗原的抗体，*bcl*-2 免疫组化染色后细胞质呈棕褐色的为阳性细胞，细胞质无棕褐色染色的为阴性细胞. 阳性细胞记数分 3 级:低倍镜(10 ×)1 cm^2 视野阳性细胞数小于 1/3 为(+)，1/3-2/3 为(++)，大于 2/3 为(+++).

统计学处理 所有数据均用平均数±标准差表示，定性指标用 χ^2 检验，caspase-3 采用计算机 SAS 软件系统进行 t 检验.

2 结果

2.1 胆管壁平滑肌细胞凋亡和超微结构 ^{103}pd 支架组平滑肌细胞凋亡数(87.9 ± 7.96)较普通支架组(5.6 ± 0.51)明显增多(图1A)，二者有显著差异(P<0.05). 普通支架组犬胆管组织平滑肌细胞核大，核均匀细致，胞质内有丰富粗面内质网和线粒体. ^{103}pd支架组凋亡的平滑肌细胞可见细胞凋亡的特征性形态学变化:细胞核缩小，染色质凝集，细胞表面形成许多球形突起(起泡)，突起内见被包裹的胞质与细胞器、核的碎片或整个浓缩的细胞核，部分突起与细胞脱离，形成凋亡小体(apoptotic bodies)，凋亡小体自细胞一端开始出现，小体内细胞器结构仍完整，细胞崩解成多个有膜包绕的圆形凋亡小体，有的细胞凋亡小体被邻近的细胞吞噬(图1B).

2.2 caspase-3 mRNA的表达 普通支架组(0.16±0.02)犬胆管组织中caspase-3 mRNA表达的量明显低于^{103}pd支架组(0.44 ± 0.09)(P<0.05)，而^{103}pd 支架组犬胆管组织中 caspase-3 mRNA 表达的量较高(图2).

2.3 Fas和*bcl*-2的表达 普通支架组犬胆管组织中Fas基因表达的明显低于^{103}pd 支架组，二者有显著差异(P<0.05)，而^{103}pd 支架组犬胆管组织中 Fas 基因有较高的表达. 普通支架组犬胆管组织中*bcl*-2基因表达的明显高于^{103}pd 支架组，二者有显著差异(P<0.05)，而^{103}pd支架组犬胆管组织中*bcl*-2基因有少量的表达(表1).

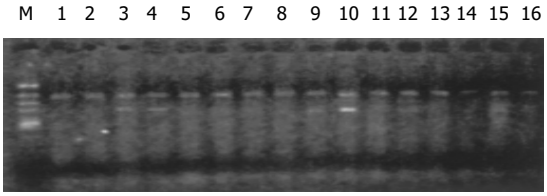


图2 术后 30 d ^{103}pd 支架组和普通支架组犬胆管组织 caspase-3 mRNA 表达，3，4，9，10，12，15 为103pd 支架组;1，2，5，6，7，8，11，13，14，16 为普通支架组，Marker 为Φ X 174-Hinc Ⅱ.

表1 Fas 和 *bcl*-2 在犬胆管组织中表达(n = 6)

分组	表达(+++)	表达(++)	表达(+)	表达(-)	阳性细胞表达率%
Fas ^{103}pd支架组	2(2/6)	3(3/6)	0(0/6)	1(1/6)	83.33
Fas普通支架组	0(0/6)	1(1/6)	2(2/6)	3(3/6)	50
bcl-2 ^{103}pd支架组	0(0/6)	0(0/6)	1(1/6)	5(5/6)	16.66
bcl-2普通支架组	1(1/6)	3(3/6)	1(1/6)	1(1/6)	83.33

2.4 胆管组织形态分析 球囊扩张30 d后，同普通支架组比较，^{103}pd 支架组胆管最大内膜厚度显著减少(78.33%，P<0.01). 普通支架组和^{103}pd支架组胆管最大狭窄面积百分比分别为(56.54 ± 22.32)%和(23.47 ± 15.65)%，两组具有极显著性差异(P<0.01). ^{103}pd 支架组胆管腔周长及胆管腔面积均比对照组明显增加(88.24% P<0.01，91.52% P<0.01)(表2).

表2 胆管内放射对球囊扩张术后 30d 胆管形态学和胆管狭窄的影响(n = 6，mean±SD)

分组	最大内膜厚度(mm)	胆管狭窄程度(%)	胆管腔周长(mm)	胆管腔面积(mm^2)
普通支架	1.86 ± 0.14	54.73 ± 21.64	6.94 ± 1.37	3.48 ± 1.75
^{103}pd 支架	0.78 ± 0.12	17.61 ± 14.52	9.66 ± 1.58	5.31 ± 1.94

3 讨论

caspase 家族成员在细胞凋亡执行阶段发挥重要功能，其家族成员都是以酶原的形式存在的，经过水解激活形成异二聚体催化域而产生活性，可对多种

蛋白底物进行降解，在凋亡信号传递过程中起关键作用，是凋亡的执行者[6]. caspase-3通过降解ADP-核糖多聚合成酶(PARP)导致核内核酸内切酶的激活，从而使核小体间的DNA链水解断裂，产生凋亡特有的DNA节段化，特异性地阻断caspase-3活性可抑制凋亡的发生[7]. 本结果表明，^{103}pd支架组犬胆管组织caspase-3表达较普通支架组明显，且其表达水平的变化与犬胆管壁平滑肌细胞凋亡的检测结果相一致，提示在^{103}pd支架组，辐射引起caspase-3基因活性增加，从而引起犬胆管损伤后增殖平滑肌细胞凋亡的发生. caspase家族成员以休眠状态酶原的形式存在于正常细胞中，当接受到死亡信号时被激活，根据已发现的caspase家族蛋白保守氨基酸序列我们应用两条简并引物，提取^{103}pd支架组犬胆管组织凋亡的平滑肌细胞mRNA，反转录PCR，经简并引物半巢式-PCR，排除阴性对照出现的扩增产物，可扩增出参与该凋亡过程的所有caspase cDNA. 我们从^{103}pd支架组犬胆管组织凋亡的平滑肌细胞中扩增出一段caspase-3 cDNA，充分说明caspase-3参与了^{103}pd支架辐射诱导犬胆管壁平滑肌细胞的凋亡. 我们也发现，^{103}pd支架组犬胆管组织平滑肌细胞中caspase-3表达明显，而且^{103}pd支架组平滑肌细胞凋亡数较普通支架组明显增多，说明^{103}pd支架组伴有较明显的平滑肌细胞凋亡的发生；相反普通支架组犬的胆管组织平滑肌细胞中caspase-3表达不明显，平滑肌细胞凋亡数较^{103}pd支架组明显少，说明普通支架组平滑肌细胞凋亡的发生也不明显，提示，辐射通过使caspase-3激活，引起平滑肌细胞凋亡.

Fas系统与细胞凋亡存在明确关系. 射线照射诱发小鼠胸腺细胞及脾脏T，B细胞凋亡过程中，Fas表达明显升高的小鼠细胞凋亡率也明显升高，而且首先是Fas表达升高，而后出现明显的细胞凋亡，表明了辐射导致或诱发Fas介导的细胞凋亡[8]. 实验显示，^{103}pd支架组犬胆管壁平滑肌细胞Fas表达比普通支架组明显，且平滑肌细胞出现明显的凋亡，表明辐射后犬胆管平滑肌细胞发生了Fas介导的凋亡. *bcl*-2基因在细胞凋亡调节过程中起重要作用，他是一种凋亡抑制基因，可以抑制多种因素包括辐射诱导的凋亡，故也称为存活，在正常情况下，以*bcl*-2异源二聚体形式存在，当*bcl*-2增加时，*bcl*-2同源二聚体升高，细胞则趋于存活；*bcl*-2为重要的抗凋亡因子，定位于线粒体膜的Bcl-2蛋白质可通过调节线粒体功能而制约着凋亡的发生. 研究指出电离辐射引起DNA分子损伤，激活P^{53}蛋白发挥转录子作用，使*bcl*-2表达下降，而使caspase-3激活，从而导致细胞凋亡，Bcl-2蛋白质也是caspase-3的底物之一，激活的caspase-3通过降解Bcl-2蛋白，进一步地减少Bcl-2蛋白的量. 以往认为*bcl*-2抗凋亡的机制有：抑制膜内Ca^+的释放，具有抗氧化的特性，组织胞内细胞色素C的释放，通过抑制白介素-1β转化酶的自身催化而抑制细胞凋亡. 我们的研究结果表明，在普通支架组犬的胆管组织平滑肌细胞中*bcl*-2表达比^{103}pd支架组明显，而具有较明显的犬胆管平滑肌细胞凋亡的^{103}pd支架组*bcl*-2表达反而不如犬胆管平滑肌细胞凋亡不明显的普通支架组，提示*bcl*-2的表达与平滑肌细胞凋亡呈负相关.

caspase-3和Fas在^{103}pd支架组表达比普通支架组表达强，而球囊扩张术后30 d发现，^{103}pd支架组胆管腔面积比普通支架组明显增加，胆管狭窄程度比普通支架组小，这主要是由于^{103}pd辐射激活Caspase-3蛋白酶和Fas基因，引起增殖平滑肌细胞凋亡，从而减轻胆管损伤后胆道愈合过程中的管腔狭窄，*bcl*-2在^{103}pd支架组表达比普通支架组表达弱，但其具有较明显的犬胆管平滑肌细胞凋亡，而球囊扩张术后30 d发现，^{103}pd支架组胆管腔面积比普通支架组明显增加，胆管狭窄程度比普通支架组小，这主要是由于^{103}pd辐射抑制*bcl*-2基因表达，诱导增殖平滑肌细胞凋亡，从而减轻胆管损伤后胆道愈合过程中的管腔狭窄，进一步说明了胆管内放射治疗对胆管损伤后胆管狭窄有明显的作用.

4 参考文献

1 Lossi L, Tamagno I, Merighi A. Molecular morphology of neuronal apoptosis: analysis of caspase 3 activation during postnatal development of mouse cerebellar cortex. *J Mol Histol* 2004;35:621-629

2 李小明, 童新, 宋天保, 孙志贤. Caspase-3 基因在凋亡的HL-60细胞及肿瘤细胞中的表达. 中华放射医学与防护杂志 1999;19:297-306

3 Semenov DV, Aronov PA, Kuligina EV, Potapenko MO, Richter VA. Oligonucleosome DNA fragmentation of caspase 3 deficient MCF-7 cells in palmitate-induced apoptosis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004;23:831-836

4 Olive PL, Durand RE. Apoptosis:an indicator of radiosensitivity in vitro? *Int J Radiat Biol* 1997;71:695-707

5 Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the *bcl*-2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401

6 Weissman JL. Old Problems, new techniques: The ingtervention al radiologist and the lacrimal apparatus. *Radiology* 1999;212:305-306

7 Eschelman DJ, Shapiro MJ, Bonn J, Sullivan KL, Alden ME, Hovsepian DM, Gardiner GA Jr. Malignant biliary duct obstruction: long-term experience with Gianturo stents and combinedmodality radiation therapy. *Radiology* 1996;200:717-724

8 Chmura SJ, Nodzenski E, Beckett MA, Kufe DW, Quintans J, Weichselbaum RR. Loss of ceramide production confers resistence to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1997;57:1270-1275

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1725-1730
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

热休克蛋白家族与肝癌的关系

吴顺华,成 军,郑玉建

吴顺华,成军,北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
吴顺华,郑玉建,新疆医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
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
通讯作者:成军,100011,北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn
电话:010-64481639 传真:010-64281540
收稿日期:2004-10-11 接受日期:2005-05-25

摘要

热休克蛋白HSP是一种广泛存在于微生物和动植物体内的一种应激蛋白.HSP在HCC的生物治疗中将发挥越来越重要的作用.HSP在生物体内起着参与加速降解和清除细胞代谢产物,维护细胞的功能和生存,协同免疫应答,调节信号传导通路,调控细胞周期,抑制凋亡以及促进微管的形成与修复等作用.大量研究显示一些HSP在肿瘤免疫中发挥作用,并有望制成基因疫苗应用于肿瘤的防治.本文综述了HSP70,HSP90,HSP47,HSP27等在肝癌的发生、发展和治疗中的进展及其在肝癌防治中的意义.

吴顺华,成军,郑玉建.热休克蛋白家族与肝癌的关系.世界华人消化杂志 2005;13(13):1725-1730
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1725.asp

0 引言

热休克蛋白(heat shock protein,HSP)是一种广泛存在于微生物和动植物体内的一种应激蛋白.当生物体受到环境中的物理、化学以及生物性因素作用发生细胞氧化损伤后,可以合成大量的HSP和其他应激蛋白.HSP的合成提高生物体对各类因素的耐受性,使细胞处于应激状态,抑制一些正常蛋白的合成并快速激活与抗损伤有关的蛋白基因.HSP是存在于细胞中的一种主要的分子伴侣,在细胞的生长发育、代谢分化、基因转录、维持组织细胞的自稳和环境适应性方面有很重要的作用.HSP在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用,肿瘤细胞的增殖、分化及转移等均有大量HSP参与.HSP与细胞的转化和恶变过程密切相关,癌基因转化的细胞和人类恶性肿瘤细胞系中,HSP表达增高[1-8].HSP能与多种癌基因产物结合形成异源蛋白复合体,介导癌蛋白构象成熟及转运,从而参与细胞转化过程[9-11].肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是消化系统常见的肿瘤,其恶性程度高、预后差.目前已有研究表明HCC是HSP70和HSP90α高表达肿瘤,细胞内HSP70和HSP90α表达增加与HCC发生、发展有关,且可能是HCC发展、恶化的重要标志.HSP70和HSP90α在发生、发展中较HSP27有更为重要的作用,但他们确切作用机制和相互关系有待进一步研究[12].随着对HSP与HCC相互关系研究的深入,HSP在HCC的生物治疗中将发挥越来越重要的作用. 因此,利用HSP的分子伴侣作用,通过DNA重组技术抑制HCC中高表达的HSP,达到提高HCC的放、化疗敏感性,下调与HCC恶性增殖相关的癌蛋白稳定性,进而遏制肿瘤细胞的增殖,对有效防治HCC有很重要的意义.本文综述了HSP的生物学分类和功能以及HSP家族常见蛋白与HCC发生、发展的关系及其在肝癌防治中的意义.

1 HSP家族的结构功能及分类

1.1 HSP的概念 HSP是指在热应激(或其他应激)下细胞合成或合成增加的一类蛋白,并不是由细胞分泌到血浆或组织液中发挥作用,而是在细胞内发挥作用,属于非分泌性蛋白.HSP最初是在果蝇(drosophila)中被发现的.早在1935年,科学家就观察到加热果蝇的蛹可诱导发育缺陷型.1962年遗传学家Ritossa *et al*[13]研究果蝇唾液腺染色体时发现,正常果蝇幼虫的唾液腺中有多线染色体(polytenic chromosome),他比一般染色体粗1 000-2 000倍,在光镜下就可看见染色体.将25℃培养的果蝇幼虫无意间置入30-32℃的环境中,30 min后在其巨大的唾液腺染色体上发现了3个新的膨突(puff).进一步观察认为,热休克诱导的果蝇染色体膨突现象不存在组织和发育期的差异,其膨突的生成与该区带基因的转录加强有关,提示热休克时可能有某种蛋白合成的增加.人们将这种现象称为热休克反应或热休克应答(heat shock response,HSR).目前认为热休克反应是细胞对各种不利因素刺激所表现的一种以基因表达和调控方面发生改变的反应.在这种反应过程中,转录和翻译合成某些蛋白的基因被关闭,而HSP基因打开,产生一组HSP,又称应激蛋白(stress protein,SP).随后的研究发现,一切生物细胞(包括原核细胞和真核细胞),温度增高时均可合成一类具有生物学活性及其多种生理功能的蛋白.不仅如此,其他因素刺激,如氧化磷酸化解联剂、重金属(汞、铜)、砷化物、氨基酸类似物(刀豆氨酸)、抗菌素(嘌呤霉素)、紫外线照射、饥饿、缺血或缺氧、创伤、感染、肿瘤、环境毒物、生长因子等200余种应激因素都能刺激诱导HSP的产生,表现了其对物种的普遍性和高度保守性.

1.2 HSP的分类 HSP包括一个庞大的糖蛋白超基因家族,

分子质量为M_r6 000-170 000.迄今为止，已发现30余种，根据同源程度及分子量大小分为HSP90、HSP70、HSP60、小分子HSP及泛素四组，分子量大小为M_r110 000的HSP，位于细胞质或细胞核中;M_r90 000的HSP家族，包括HSP90和GRP94，前者位于细胞质，后者位于内质网ER;HSP90家族常见有HSP90、gp96(葡萄糖缺乏时诱导合成的一类蛋白)等.其中HSP90指HSP90α和 HSP90β，这两种蛋白具有相似或相同的功能,都是细胞正常生长所必需的蛋白，缺一不可.M_r70 000的HSP家族，包括HSC70，GRP78(Bip)和GRP75，分别位于细胞质、内质网和线粒体;M_r60 000的HSP位于线粒体;低分子量HSP，分子量M_r20 000-30 000，位于细胞质或细胞核中;M_r10 000的HSP位于线粒体;泛素(ubiquitin)分子质量为M_r8 000，位于细胞质或细胞核.其中分子量M_r70 000的HSP在正常细胞中较少，但在应激状态下显著升高，对他的研究也较多.另一种分类是以其能否被诱导而分为结构型HSP(或称固有型)和诱生型HSP，前者为细胞内正常的组成成分,为细胞内的一种结构蛋白;后者为细胞的诱生HSP，通过诱导因素而产生.诱生型HSP则在蛋白水平起防御、保护作用.

1.3 HSP的功能特征 HSP是存在于细胞的一种主要的分子伴侣(molecular chaperoner).在细胞的生长发育、代谢分化、基因转录、维持组织细胞的自稳和环境适应性方面有很重要的作用.HSP最基本的结构为N端的一个具有ATP酶活性的高度保守序列和C端的一个相对可变的基质识别序列.后者倾向与蛋白的疏水结构区相结合,而这些结构区在天然蛋白中被折叠隐藏于内部而无法接近，也就是说HSP倾向于与尚未折叠或因有害因素被破坏了其折叠结构的肽链结合，并依靠其N端的ATP酶活性，利用ATP促成这些肽链的正确折叠、移位、修复或降解[5].HSP是迄今为止从原核生物到真核生物，一直到人类最为保守的蛋白[3]，生物在长期进化中，HSP是保留下来对抗损害进行自我保护的重要机制之一.HSP的共同特征为:(1)在热休克状态下优势表达，而其他蛋白表达受抑制;(2)在所有细胞中均表达;(3)其氨基酸序列在进化中高度保守;(4)平时HSP主要存在于细胞质中,应激时HSP迅速进入细胞核和核仁,应激恢复期,又迅速进入细胞质,当再次应激时HSP又返回细胞核;(5)HSP可以提高抗应激能力,HSP70生成量与细胞耐热力成正相关;(6)在其基因启动子上游具有热休克元件,能被特定的热休克因子启动而表达.HSP在细胞内的含量相当高，约占细胞总蛋白的5%，其功能涉及细胞结构的维持、更新、修复、免疫等.经大量研究表明,HSP可从以下几个方面来发挥分子伴侣的作用:(1)在应激状态下保护细胞内蛋白的正常结构及维持细胞蛋白自身稳定;(2)作为分子伴侣使蛋白正确折叠或聚集,参与多聚复合体的组装;(3)促使受损、变性蛋白的恢复;(4)加速降解和清除细胞代谢产物，能重新激活某些酶的作用，以维护细胞的功能和生存;(5)参与免疫应答;(6)调解信号传导通路;(7)调控细胞周期，抑制凋亡;(8)促进微管的形成与修复.

2 HSP与肝癌之间的关系

2.1 HSP70与肝癌 HSP70家族是多基因家族，广泛分布在细胞的亚细胞结构中,为可溶性胞质蛋白,定位于内质网，如胞质及胞核中组成性表达HSP70/HSP73，胞质中热诱导表达HSP72(HSP70)，PBP72/74(peptidebinding protein，PBP)等参与MHC Ⅱ类分子限制抗原呈递.线粒体基质中存在GRP75(glucoseregulated protein，GRP)，内质网中有丰富的GRP78/BiP(immunol-globulin heavy chain binding protein，BiP).HSP70家族N端结构域高度保守，具有ATP酶活性，ATP/ADP交换位点类似G肌动蛋白ATP酶结构域.HSP70家族C端结构域是结合多肽或特殊蛋白的部位，类似MHC结合肽结构域，同源性及功能差异大.HSP70家族成员具有翻译后磷酸化修饰，多在Ser/Thr，个别在Tyr(GRP75).HSP70家族在功能上具有一些共同特点:(1)所有HSP70具有ATP酶活性,个别具有蛋白酶作用,结合ATP后的构象改变促使靶蛋白与之解离，ADP-HSP70对靶蛋白具有更高亲和力，形成HSP70蛋白复合体后稳定;(2)选择性结合多肽或特殊蛋白，参与蛋白稳定构象形成、跨膜转运或降解;(3)HSP70蛋白复合体的形成需要其他HSP或细胞因子;(4)HSP70家族具有高度保守钙调素结合结构域.HSP70的表达既可以是快速强烈的诱导表达,又可以是低水平组成性表达，受热HSP自身负反馈调控.HSP70属诱生性HSP，其诱导表达是多个三聚体热休克因子(heatshock factor,HSF)与热休克元件(HSE)顺反式协同作用的结果.

HSP具有潜在的非特异性内源性细胞保护功能，这种细胞保护是指机体细胞在受到各种应激如高热、氧化等刺激时，产生的HSP可以增强细胞对损害的耐受程度，维持细胞的正常功能代谢，提高细胞的生存率.HSP对肝细胞有免疫保护作用.Redaelli *et al*[14]研究发现肝热预处理后，在肝组织中能明显观察到HSP32(HO-1)的表达,并通过减轻肝微循环紊乱,持续性抑制缺血后肝组织的损伤,表现为肝细胞胆汁生成的恢复、肝脏酶释放的减少及肝组织水肿、损伤的减轻.这说明HSP在肝组织中有保护作用,其可能机制是:(1)直接作用,即分子伴侣作用,通过HSP的大量产生来维护细胞的生存和机能;(2)间接作用，可能与氧自由基有关，HSP可以抑制NADPH氧化酶,减少氧自由基的来源,与糖皮质激素受体结合可促进SOD的生成,减少氧自由基造成的脂质过氧化作用,避免肝脏细胞的进一步被破坏.

HSP70被认为是肿瘤表面的特异性结构，正常细胞表面并不表达HSP70[15].肿瘤形成过程中，肿瘤细胞不断增殖，合成代谢增强，需要大量的HSP来调节和稳定这一异常增殖过程.正常细胞中仅表达少量HSP70参与细胞的生长代谢，并受细胞周期的严格调控，而肿瘤细胞

即使在无应激条件下，也能独立于细胞周期持续高表达诱导型HSP70，并呈现持续的高诱导表达异常分布和定位.在病毒转化和化学诱导的肿瘤细胞中，HSP70的表达比正常细胞高几倍.

HSP70是HSP家族中的重要成员之一，在多种肿瘤组织中表达上调，为肿瘤的发生、发展所必需.在许多恶性肿瘤(如乳腺癌、肠腺癌、肺癌等)中，HSP70的高表达与肿瘤的恶性程度及患者的无瘤生存期相关.肿瘤细胞高表达的HSP70能与多种癌基因产物结合形成HSP70-癌蛋白复合物，介导癌蛋白构象成熟及转运，维持癌蛋白结构与功能的完整，从而参与细胞的转化.HSP70作为肿瘤血清生物标志物在肝癌过度表达.Schueller *et al*[16]研究发现HSP70和90在热处理的肝癌细胞表达水平显著升高，增加了肝癌细胞肿瘤免疫原性，发挥HS肿瘤抗原的分子伴侣功能.在随后的研究中发现HSP70和HSP90在经射频处理的人HCC细胞(SK-HEP-1)中过度表达，提示HSP对宿主肿瘤的免疫反应调节是将来免疫治疗的重要策略.

肿瘤的发生是细胞的恶性增殖与细胞凋亡之间平衡失调的结果.HSP70的高表达增强了肿瘤细胞抗凋亡能力，使细胞的生长抑制效应和死亡减弱.Lim *et al*[17]在研究肝癌中丰富的酪氨酸磷酸化蛋白时发现细胞骨架和应激蛋白小分子的酪氨酸激酶抑制剂可影响HSP70，HSC71和GRP75等分子伴侣蛋白与细胞骨架的高度磷酸化，介导了细胞的流动性，抑制细胞凋亡.HSP70的持续高表达通过调节肿瘤细胞代谢所必需的蛋白分子构象而发挥其参与细胞增殖、死亡的功能.HSP70可能与多种原癌基因(c-fos，c-myc，scr，raf，p53，Rb)相互作用，介导其蛋白产物的构象成熟，影响细胞周期，调节细胞增殖[18].HSP70还参与了肿瘤细胞抗凋亡过程，可能与Bcl2，Bcl-XL，Cr-mA等抗凋亡蛋白协调作用抑制细胞凋亡;下调与细胞凋亡相关基因、蛋白和蛋白酶如SAPK/JNK和胱冬肽酶的活性，从而达到拮抗细胞凋亡的作用[19].

大量文献报道，HSP70家族与突变p53的结合在调控p53功能方面起着重要作用.HSP70-p53复合物的存在可能与肿瘤的发生有关，并可作为判断患者预后不良的指标.崔崇伟 *et al*[20]通过免疫组化、原位杂交及免疫荧光双标记激光扫描共聚焦显微镜等方法，发现在肝癌组织中HSP70与p53的表达存在密切关系，p53核阳性者同时伴有HSP70核阳性.并通过对3例HSP70与p53表达均呈阳性的标本进行免疫共沉淀，从分子水平上证实，HSP70-p53复合物是肝癌发生、发展中HSP70调节p53功能的一种重要方式;提示肝癌中存在基于HSP70-p53复合物的肿瘤主动免疫机制.HSP70对p53功能的调控可能有以下几方面:(1)HSP70的伴侣作用可使p53构象稳定，以保护p53免受蛋白酶的降解，并参与p53的胞质装配及核转运，从而调控p53 的功能;(2)HSP70使p53在胞质中的半衰期延长，可能是由于HSP70构象改变，需要高浓度ATP才能使p53与HSP70解离;亦有可能HSP70与p53结合后封闭p53的核定位序列，导致p53在胞质积聚;(3)突变p53的构象改变暴露出结合HSP70的高亲和力位点，亦可能使p53在胞质积聚，胞核中HSP70与p53结合DNA结构域结合，封闭p53结合DNA的功能，使p53失去调控蛋白的作用，从而促进肿瘤的发生、发展;(4)HSP70在抗原加工、呈递中作用，提示HSP70与突变p53结合，可能介导肿瘤特异抗原p53的降解及呈递，引起机体对p53的免疫反应.HSP70在肿瘤免疫中的这种作用，提示HSP70与突变的p53结合，可能介导突变的p53作为肿瘤抗原的降解及呈递，引起机体对p53的免疫应答.因此，利用HSP70能与肝癌组织来源的p53结合形成HSP70-p53复合物的这一特性，可望研制出新型、高效的特异性抗肝癌疫苗.

2.2 HSP90与肝癌 HSP90家族在氨基酸序列上高度保守，如白色念珠菌与其他真菌、脊椎动物和植物的HSP90相比有61-79%的同源性.HSP90的C端是寡聚化结构域，能结合底物蛋白，类似蛋白酶结合底物口袋.C端最后4个氨基酸都是glu-glu-val-asp(锥虫第2个glu被gln取代)，有趣的是该结构同样存在于真核生物的HSP70当中，这是HSP70与HSP90在结构上唯一的相似处，提示该结构具有重要的生物学意义.gp96是HSP90家族的成员，位于内质网腔，N端具有跨膜序列，C端有内质网腔定位序列，同样具有glu-glu-val-asp结构，用从肿瘤组织中制备的gp96免疫小鼠能产生抗相应肿瘤细胞的特异性保护性免疫应答，而从正常组织分离的gp96没有这种作用.gp96是一种高度保守和单态性蛋白.他具有分子伴侣功能，能与细胞内大量多肽非共价结合而不受细胞单倍型和MHC分子的影响.gp96-肽复合物也可在体外形成，并具有与体内相似的免疫活性.gp9参与MHC Ⅰ类抗原的提呈.用肿瘤源gp96-肽复合物免疫小鼠可诱发抗相应肿瘤细胞的MHC Ⅰ类限制性$CD8^+$细胞毒性T细胞免疫应答，并能产生记忆性T细胞应答，具备了作为疫苗的一个关键要素，与其他肿瘤源蛋白相比，gp96是一个有效的抗肿瘤疫苗，能更加有效的激发抗原特异性CTL反应[21].gp96是单态分子，结合的肽源于细胞蛋白，反映细胞蛋白构成，因此，从任何类型细胞制备的gp96均含有该特定类型细胞肽池的所有成分.gp96-肽复合物很有希望成为新一代抗肿瘤疫苗.

目前全世界共有3.5亿乙肝病毒感染者，我国约有1.7亿.目前应用的乙肝疫苗可预防乙肝感染，但对已感染乙肝病毒特别是已经发展成慢性肝炎、肝硬化和肝癌的患者，还没有有效的治疗药物.Meng *et al*[22]研究发现乙肝病毒特异多肽与热休克蛋白gp96的复合物，为慢性乙肝、肝硬化和肝癌的免疫治疗开创了新途径，但HBV体内复制、组装过程的具体机制至今尚未弄清.陆荫英 *et al*[23]综述了分子伴侣中的一些成员HSP90，HSP70，HSP60，葡萄糖调节蛋白94(GRP94)及钙连接蛋白(calnexin)等在HBV的生命周期中扮演了重要的角色，表明HSP在肝炎以及肝癌的发生、发展中有意义.

HSP90与人类肿瘤发生有较密切关系，Lee *et al*[24]应用strategic shotgun proteomics approach研究肝细胞瘤目标蛋白基因表达谱发现，在Hep3B细胞中HSP90的表达显著升高，而且与端粒的长短有关.可见HSP90的表达水平发挥分子伴侣功能启动端粒酶和端粒结合蛋白的表达，与HCC的发生有重要关系.HSP90参与肝细胞相关蛋白磷酸化作用的调节和蛋白酶体降解通路.Huang *et al*[25]发现肝细胞唾液酸糖蛋白缺乏和转铁蛋白受体磷酸化作用使gp96，HSP70，HSP90表达增高，表明当磷酸化作用缺失时，唾液酸糖蛋白细胞质结构域需要特异的分子伴侣结合后才能发挥调节作用.Gusarova *et al*[26]报道apoB是重要的肝载脂蛋白，apoB的网络作用可被前分泌降解介导的泛醌素蛋白酶体路径和HSP70调节，同时HSP90和HSP70共同参与了这种内质网相关apoB与蛋白酶体路径的蛋白降解作用.因脂肪肝的发生与载脂蛋白的分泌有直接关系，因此HSP也参与了脂肪肝的发病机制.

HSP90作为基因疫苗的应用可以治疗肿瘤.刘宪玲 *et al*[27]用反义核酸技术将反义HSP90重组子导入胃癌细胞系后，发现HSP90生长受抑，这些转染细胞生长亦受到不同程度抑制.G1期细胞明显增多，S期细胞明显减少，G1期被阻滞.可以看出，HSP90与细胞生长有关，通过抑制HSP90的表达可抑制肿瘤细胞生长.

2.3 HSP47与肝癌 HSP47是一种分子量为M_r47 000的HSP，属小分子量HSP家族.HSP47存在于胶原蛋白分泌细胞的ER内，与前胶原特异性结合，参与前胶原的折叠、装配、修饰、转运等过程，被认为是胶原特异性分子伴侣，在胶原合成及纤维化病理过程中发挥着重要作用.HSP47在ER内的作用可能包括以下几方面[28]：(1)防止新合成前胶原α链的错误聚集，帮助形成正确的三股螺旋结构.在HSP47基因敲除的小鼠模型中观察到HSP47缺失情况下，Ⅰ型胶原α链不能形成正确的三股螺旋结构[29]；(2)参与前胶原肽链的修饰.在单独应用Ⅲ型前胶原cDNA和应用HSP47及Ⅲ型前胶原cDNA共同转染293细胞的对比实验中观察到无HSP47存在情况下，Ⅲ型前胶原被过度修饰，说明HSP47参与了前胶原的修饰过程；(3)防止前胶原肽链在ER内的降解.HSP47的存在可以防止前胶原肽链的降解，这可能与HSP47属于serin家族有关，但目前尚未发现HSP47具有丝氨酸蛋白酶抑制物活性；(4)稳定前胶原的三股螺旋结构，防止三股螺旋形式前胶原的束集.大多数分子伴侣的作用是在其作用底物折叠装配过程中稳定其中间产物，而HSP47却与成熟的三股螺旋形式的前胶原结合，一方面可能是帮助稳定三股螺旋结构，另一方面可能是防止三股螺旋前胶原的进一步束集[30]；(5)对前胶原形成的质量控制，防止结构错误的前胶原泌出ER.采用α，α'-联吡啶抑制三股螺旋结构形成实验中，可见ER内大量新合成的前胶原肽链与HSP47的复合体滞留，提示HSP47可能具有阻止未成熟或错误折叠的前胶原泌出ER的功能；(6)协助前胶原分泌.利用反义RNA转染成纤维细胞，抑制HSP47合成，则可抑制前胶原分泌，但其他胞外基质成分不受影响.说明正常状态下HSP47有利于前胶原分泌.

HSP47的表达受多种转录因子的调节.HSP47一般在热休克(42-45℃)及其他因子刺激后表达明显增加.HSP47基因转录起始区含有高度保守的热休克元件(HSE)序列.在高等脊椎动物体内已发现四种热休克因子(HSFs)，分别标识为HSF1，HSF2，HSF3，HSF4，其中HSF1是应激状态下的主要转录因子.正常状态下，HSF1以单体形式存在，应激状态下，HSF1形成三聚体形式，进入胞核与HSE结合，启动HSP47基因的转录.应激状态下的HSP47基因转录是通过HSF-HSE间作用诱导起始的[28].HSP47的表达受到多种细胞因子的影响.在不同的培养细胞中观察到，转化生长因子-β1(TGF-β1)、白介素-4(IL-4)、成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)可使细胞HSP47 mRNA及其蛋白表达上调.相反，干扰素-(INF-γ)、表皮生长因子(EGF)可使HSP47 mRNA及其蛋白表达下调.这些细胞因子在调节HSP47分泌增减的同时同步调节着胶原mRNA及其蛋白表达的升降[31].

组织器官纤维化及硬化的主要病理改变是细胞外基质(ECM)的异常合成和堆积.胶原蛋白是胞外基质的重要组成部分，HSP47作为胶原特异性分子伴侣，在此过程中发挥着重要作用.对多种疾病模型和人类组织纤维化的病理研究均证实，HSP47的表达上调与胶原合成增加及纤维化进展在时间和分布区域上呈正相关.抑制HSP47表达可抑制胶原合成，减弱纤维化程度.慢性肝炎病毒持续感染会导致肝纤维化，如果这种纤维化不可逆，就会引起肝硬化甚至肝癌.病理状态下，大量分泌的HSP47则主要来自于异常增生的表型转化细胞.在肝纤维化区域，可见大量结合蛋白(desmin)阳性的脂肪细胞.这些表型转化细胞是纤维化区域胶原蛋白的分泌细胞，同时均高表达HSP47，这种HSP47与胶原表达的一致性与HSP47的胶原特异性分子伴侣功能相吻合[31].Park *et al*[32]在CCl_4造模的慢性肝损伤HSP70敲除的转基因小鼠检测发现经过6 wk的CCl_4处理，HSP70-/-小鼠ALT水平低于对照组.HSP25和HSP47的表达水平也低于对照组，肝坏死分级和嗜酸性粒细胞浸润在HSP70-/-和对照小鼠之间没有显著性差异，CCl_4处理的小鼠没有显著改变肝胶原的产生.Nagata *et al*[28]通过破坏小鼠HSP47基因，发现HSP47缺失的小鼠胚胎有错误的三股螺旋折叠形成，在这些小鼠的间充质细胞和上皮细胞中没有发现胶原的形成，最终导致胚胎死亡，可见，HSP47是小鼠发育所必需的；多组织表达检测发现HSP47在肝、肾、肺等多组织纤维化中显著上调，表明通过下调HSP47的表达，减少组织胶原的积累，可作为肝纤维化基因治疗的新策略.HSP47作为一种胶原特异的分子伴随，不仅参与纤维化/硬化疾病的形成，而且还在损伤修复和组织重建中起到重要作用.郭津生*et al*[33]采用免疫组织化学方法检测了6例

肝癌手术切除标本及乙酸诱导后不同时间大鼠胃溃疡组织标本内HSP47的表达和定位. 结果发现人肝癌包膜、癌旁肝纤维化纤维间隔内的纤维细胞以及在纤维间隔附近肝细胞周围的星状细胞表达HSP47蛋白. 大鼠胃组织内成纤维细胞、血管内皮细胞以及平滑肌细胞均有HSP47蛋白的表达. 溃疡基底肉芽组织内大量增生的成纤维细胞、小血管内皮细胞表现HSP47蛋白强阳性染色. 可见HSP47的表达在肝癌、肝纤维化的发生有重要意义.

2.4 HSP27与肝癌 HSP27的表达是在转录和翻译两个水平上进行调节的，但前者更为重要. HSP基因上游序列中存在一个热休克反应元件(heat shock element，HSE)，由3个以上的nGAAn核心序列重复排列构成. HSE作为HSP基因的顺式作用元件，在与作为反式作用因子的热休克转录因子结合以后，启动该HSP基因的表达. HSP27具有HSP亚家族的显著特点:在细胞内可表现为单体/二聚体，甚至*Mr*70 000的寡聚体. HSP生物体内有两种表达形式:诱导型主要在外界环境的刺激下表达，具有保护细胞的功能;构成型主要在生理状态下表达，与细胞的分化、发育密切相关.

HSP27在肿瘤的发生、发展及预后中也起了关键作用. 研究发现，高度表达HSP27的细胞，其发生多种肿瘤，如乳腺癌、前列腺癌、胃癌、卵巢癌等的危险性大大增高，且预后较差，HSP27可作为肿瘤预后好坏的可信指标之一[34]. 活性氧(reactiveoxygen species，ROS)是由外源性氧化剂或胞内有氧代谢中产生的、具有很高生物活性的氧自由基，可直接损害或通过一系列过氧化链式反应引起广泛的生物大分子结构破坏，并可直接改变细胞内环境稳定性. 在一些特定条件下，如病毒感染、缺血、缺氧、离子辐射、紫外线照射、化疗药物、化学试剂等都可通过介导活性氧的产生而导致细胞凋亡的发生. HSP27参与氧化应激保护细胞氧化损伤. Katsuki *et al*[35]报道HSP27能降低细胞中的ROS水平、延缓脂质过氧化及胞质蛋白的氧化等相关过程. 还原型谷胱甘肽(GSH)是细胞合成的、胞内重要的水溶性抗氧化剂. 实验证明，组成性表达和诱导性表达增加HSP27的过度表达，启动了通过促进GSH自身的氧化还原循环，提高葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性，使胞内GSH的水平增高，对TNF-α或放射线等其他类型的氧化损伤具有保护作用.

慢性丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝纤维化，肝硬变，肝脂肪变和肝细胞癌的发生紧密相关. HCV病毒RNA的NS5A蛋白是一种具有广泛反式激活作用的蛋白分子，其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸. NS5A主要定位于细胞ER，NS5A可能参与了细胞信号转导途径，通过JAK1介导STAT3的激活. NS5A蛋白能够下调Bcl-2和细胞周期调节基因p21WAF1的表达，HCV NS5A对于p21WAF1表达的抑制，实际上就是对于细胞周期的促进作用[36]. Choi *et al*[37]研究HCV非结构蛋白NS5A和NS5B的结合蛋白发现，HSP27与NS5A结合而不与NS5B结合，NS5A氨基端1-181氨基酸位点，HSP27氨基端1-122氨基酸位点是二者相互作用的结合域. HSP27普遍存在于细胞胞质内，当热应激时，HSP27在内质网与NS5A有共同锚定作用. 近年研究结果还证实，NS5A蛋白还具有结合载脂蛋白AI、AII的功能，在肝脏脂肪滴中也见到了NS5A的存在. 因此，认为NS5A蛋白在慢性丙型肝炎、肝脏脂肪变(steatohepatitis)的发病中也有重要地位[38]. 不同磷酸化形式的NS5A蛋白具有反式激活作用也是目前关于NS5A生物学功能研究的热点，推测NS5A蛋白的这种反式激活作用，可能是HCV感染与HCC发生、发展密切相关的重要分子生物学机制[39-41].

HSP27可以抑制细胞凋亡，保护肝细胞损伤. HSP27磷酸化使HSP27从寡聚体变为二聚体，并与Daxx结合，阻止了Daxx由胞核向胞质的转位以及与Fas、Ask1的结合，使该凋亡通路中断. 然而，当细胞表达寡聚体形式的HSP27或缺乏Daxx结合能力的突变体时，HSP27不能发挥抗凋亡作用[42]. 可见，HSP27与死亡受体Fas介导的凋亡途径密切相关. 但De Miglio *et al*[43]研究发现HCC细胞中HSP27在肝小丘过度表达，但不出现显著地保护非典型损害抑制凋亡. 因此，对于HSP27在肝癌细胞的作用机制尚需深入探讨.

总之，HSP与肝癌的研究已经取得了一定的进展. 由于HSP具有分子伴侣、抗氧化、协同免疫以及抗细胞凋亡等多种功能，且这些功能对于肝损伤的治疗有积极的作用，从而为肝癌的治疗供了一条新思路. 人们发现肿瘤自体产生的HSP结合了肿瘤抗原，引起特异性反应，但这种特异性由结合的多肽抗原决定. 源于肿瘤组织的HSP本身并非抗原，而是作为抗原载体发挥作用，可以增加抗原的免疫原性，激发肿瘤特异性T淋巴细胞，从而杀伤肿瘤细胞. 因此，人们提出HSP可以作为肿瘤免疫的分子佐剂发挥免疫防治作用. 正确认识HSP效应，能帮助我们进一步了解肝癌的发生和发展，并为其治疗提供新途径. 然而有关HSP治疗肝癌途径的研究仍存在着许多问题，且HSP一般在应激条件下才能大量产生，其抑制肿瘤的作用机制还需要进一步阐明. HSP家族在肝癌组织中过度表达，可以作为肝癌发生的血清生物标志物，对于肝癌的诊断和预后有指导意义. 随着学者们对HSP分子生物学和免疫学机制研究的深入，随着HSP70基因疫苗的研究的不断发展，gp96，HSP90，HSP27也受到了肿瘤研究者的关注[44-45]. 所以，HSP蛋白这一古老家族，已经成为肿瘤免疫治疗的一个新制高点. 进一步了解HSP家族多种蛋白在肝癌及其他器官肿瘤发生、发展中的作用以及抗肿瘤机制将成为今后继续研究的重要课题.

3 参考文献

1 Qu J, Zhu XG, Gu J, Yu YX, Cheng DX, Ye YJ, Cheng JN. High expression of HSP70 mRNA in human colorectal carcinoma and its clinical implication. *Zhonghua Shiyan Waike Zazhi* 1998; 15:559-560

2 Ren HY, Yi CQ, Zhang JK. Expression of PCNA and HSP70 inpatients with Hp infected gastricmucosa. *Tongji Yike Daxue Xuebao* 1999;28:135-137

3 Guo JC, Zhang XY, Yang YS, Ye L, Li JC, Fan DM. Over expression of heat shock protein (HSP) 70 in human Gastric

cancer. *Aizheng* 1999;18:45-46
4 Li C, Chen JD, Chai WJ. Expression of heat shock protein70, P-glycoprote in and PCNA in squamous cell carcinoma of esophagus. *Shiyong Aizheng Zazhi* 1999;14:205-207
5 Qiao HH, Zhao M, Yuan XH, Shi YJ, Zhou C, Fan YX, Huang CZ. Expression of heat shock protein90α and its effect on the growth of tumor in mice. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999;21:19-21
6 Wang XP, Liu GZ, Song AL, Chen RF, Li HY, Liu Y. Expression and significance of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:429-432
7 Chen SB, Hong JQ, Wang YH. Expression and significance of heat shock protein70 and p53 prote in ingastriccarcinoma. *Shiyong Aizheng Zazhi* 2000;15:241-242
8 Guo JC, Li JC, Fan DM, Qiao TD, Zhang XY. Regulation of HSP70 expression in human gastric cancer cell line SGC7901 by gene transfection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:773-776
9 Vander Straten A, Rommel C, Dickson B, Hafen E. The heat shock protein 83 (HSP83) is required for Raf-mediated signaling in Drosophila. *EMBOJ* 1997;16:1961-1969
10 Silver stein AM, Grammati kakis N, Cochran BH, Chinkers M, Pratt WB. p53 (cdc37) binds directly to the catalytic domain of Rafas well as to a site on hsp90 that is to pologically adjacent to the tetratri copeptide repeat binding site. *J Biol Chem* 1998;273:20090-20095
11 Shi Y, Zhao M, Xu X. Comparative study of expression levels of the major human heat shock proteins in cancer and normal tissues. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1998;20:277-279
12 Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 1993;62:349-384
13 Ritossa FM. A new puffing pattern induce by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experiential* 1962;18:571-573
14 Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T, Ledermann M, Baer HU, Dufour JF. Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology* 2002;35:1082-1092
15 Gullo CA, Teoh G. Heat shock proteins:to present or not, that is the question. *Immunol Lett* 2004;94:1-10
16 Schueller G, Kettenbach J, Sedivy R, Bergmeister H, Stift A, Fried J, Gnant M, Lammer J. Expression of heat shock proteins in human hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation in an animal model. *Oncol Rep* 2004;12:495-499
17 Lim YP, Wong CY, Ooi LL, Druker BJ, Epstein RJ. Selective tyrosine hyperphosphorylation of cytoskeletal and stress proteins in primary human breast cancers: implications for adjuvant use of kinase-inhibitory drugs. *Clin Cancer Res* 2004;10:3980-3987
18 Tchounwou PB, Yedjou CG, Dorsey WC. Arsenic trioxide-induced transcriptional activation of stress genes and expression of related proteins in human liver carcinoma cells (HepG2). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003;49:1071-1079
19 Wu YF, Cao MF, Gao YP, Chen F, Wang T, Zumbika EP, Qian KX. Down-modulation of heat shock protein 70 and up-modulation of Caspase-3 during schisandrin B-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:2944-2948
20 崔崇伟, 杨守京, 刘雁平, 刘彦仿. 人肝癌组织中p53与HSP70相互作用的初步研究. 细胞与分子免疫学杂志 2003;19:195-196
21 张士猛, 刘志敏. 热休克蛋白gp96作为抗原载体的研究进展. 中国生物工程杂志 2003;23:12-16
22 Meng SD, Song J, Rao Z, Tien P, Gao GF. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *J Immunol Methods* 2002;264:29-35
23 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;11:178-179
24 Lee CL, Hsiao HH, Lin CW, Wu SP, Huang SY, Wu CY, Wang AH, Khoo KH. Strategic shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. *Proteomics* 2003;3:2472-2486
25 Huang T, Deng H, Wolkoff AW, Stockert RJ. Phosphorylation-dependent interaction of the asialoglycoprotein receptor with molecular chaperones. *J Biol Chem* 2002;277:37798-37803
26 Gusarova V, Caplan AJ, Brodsky JL, Fisher EA. Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem* 2001;276:24891-24900
27 刘宪玲, 郭建成, 肖冰, 徐立, 俞召才, 樊代明. 热休克蛋白90反义核酸抑制人消化道肿瘤细胞生长的作用. 中华医学杂志 1999;79:714-715
28 Nagata K. Expression and function of heat shock protein 47: a collagen specific molecular chaperone in the endoplasmjc reticulum. *Matrix Biol* 1998;16:379-386
29 Nagata K. Therapeutic strategy for fibrotic diseases by regulating the expression of collagen-specific molecular chaperone HSP47. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2003;121:4-14
30 Tasab M, Jenkinson L, Bulleid NJ. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO* 2000;19:2204-2211
31 Rocnik E, Chow LH, Pickering JG. Heat shock protein 47 is expressed in fibrous region of human atheroma and is regulated by growth factors and oxidized low density lipoprotein. *Circulation* 2000;101:1229-1233
32 Park DH, Lee MS, Kim HJ, Kim HS, Lee YL, Kwon MS, Jang JJ, Lee MJ. Chronic hepatotoxicity of carbon tetrachloride in hsp-70 knock out mice. *Exp Anim* 2004;53:27-30
33 郭津生, 王吉耀, 纪元, 谭云山. 热休克蛋白47在人肝癌癌周组织和大鼠胃溃疡组织中的表达和意义. 胃肠病学和肝病学杂志 2000;3:255-257
34 Elpek GO, Karaveli S, Simsek T, Keles N, Aksoy NH. Expression of heat shock proteins HSP27, HSP70 and HSP90 in malignant epithelialtumour of the ovaries. *APMIS* 2003;111:523-530
35 Katsuki K, Fujimoto M, Zhang XY, Izu H, Takaki E, Tanizawa Y, Inouye S, Nakai A. Feeding induces expression of heat shock proteins that reduce oxidative stress. *FEBS Lett* 2004;571:187-191
36 Sarcar B, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology* 2004;322:51-60
37 Choi YW, Tan YJ, Lim SG, Hong W, Goh PY. Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:514-519
38 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
39 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
40 钟彦伟, 成军, 施双双, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 人源抗丙型肝炎病毒包膜蛋白E2单链抗体的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:109-112
41 成军, 施双双, 钟彦伟, 夏小兵, 王刚, 王琳, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白E2可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达. 中国病毒学 2001;16:220-223
42 Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 2000;20:7602-7612
43 De Miglio MR, Muroni MR, Simile MM, Calvisi DF, Tolu P, Deiana L, Carru A, Bonelli G, Feo F, Pascale RM. Implication of Bcl-2 family genes in basal and D-amphetamine-induced apoptosis in preneoplastic and neoplastic rat liver lesions. *Hepatology* 2000;31:956-965
44 Motoyama S, Saito S, Itoh H, Minamiya Y, Maruyama K, Okuyama M, Ogawa J. Methylprednisolone-induced expression of mitochondrial heat shock protein 60 protects mitochondrial membrane potential in the hypoxic rat liver. *Shock* 2004;22:234-239
45 Chen H, Yu YY, Zhang MJ, Deng XX, Yang WP, Ji J, Peng CH, Li HW. Protective effect of doxorubicin induced heat shock protein 72 on cold preservation injury of rat livers. *World J Gastroenterol* 2004;10:1375-1378

编辑 王谨晖 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1731-1733
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系

韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐

韩苏夏, 马瑾璐, 西安交通大学肿瘤研究所, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤科 陕西省西安市 710061
刘正稳, 西安交通大学传染病研究所, 西安交通大学医学院第一附属医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金资助项目, No. 30300300
西安交通大学自然科学基金资助项目, No. 2003-12
陕西省科学技术研究发展计划项目, No. 2004K13-G10
通讯作者: 韩苏夏, 710061, 陕西省西安市雁塔区健康路1号, 西安交通大学肿瘤研究所, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤科.
hansuxia22099@sohu.com
电话: 029-85323249
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-01

摘要

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)为单股正链RNA病毒.国内外已对数十个HCV全基因或片段基因进行了序列分析, 并对HCV的基因型分型.近年研究表明, HCV的基因型及其变异与肝细胞肝癌(HCC)有者一定的关系.其中, HCV1b基因型与HCC的发生显著相关;HCV核心区的变异与HCC的发生可能相关;HCV NS3与HCC的发生相关;HCV NS5的序列相对稳定为诱发HCC所必须的;而HCV E2/NS1与HCC的发生尚无定论.丙型肝炎及由其发展而来的肝细胞癌至今没有令人满意的治疗方法.研究HCV基因型及其变异与HCC发生的关系对阐明HCC发生的机理和HCC的防治有着重要的意义, 为HCC的治疗开辟了新的途径, 成为近年来国内外研究的热点, 通过对他的深入研究可能为HCC的基因治疗找到有效措施.

韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐. HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1731-1733
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1731.asp

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝细胞癌(HCC)的发生有着密切的关系, 而HCC的发生是HCV与机体相互作用的结果, 其他协同因素对这一过程的发生也起了一定的促进作用. HCV诱发HCC的机制仍不清楚, 体外研究清楚提示, HCV蛋白对肝脏癌变有直接影响.HCV有多个基因型, 并且具有高度变异性, 这种病毒学特点与致病性有着必然的联系.近年研究提示, 除了机体因素如免疫状况和遗传背景以及其他协同因素如酒精、抽烟、肥胖、合并乙型肝炎病毒(HBV)感染等以外, HCV的基因型以及HCV基因组不同区的变异与HCC的发生有着一定的关系, 本文就这方面的研究现状作一简述.

1 HCV基因型与HCC发生的关系

HCV的基因型存在着地区差异, 北美、欧洲国家以1a、1b型为主, 日本以1b型为主、2a型次之, 我国也以1b型为主、2a型次之, 部分地区也有混合型存在.为了探讨HCV基因型对肝病临床结局的影响, Roffi *et al*[1]对2 307例患者进行了分析.结果发现, 最常见的代表基因型为1b(40%)和2(28.1%).有这些基因型的患者的中值年龄比有其他基因型的患者的中值年龄大($P<0.01$).基因型1b患者的总生存比其他基因型者差($P<0.01$).发现肝硬化患者在280例(12.1%)例而且1b型是他们最具代表的分离株($P<0.01$).在1 481.8累积年的随访中, 62例(22%)发生HCC(估计粗发病率, 在所有肝硬化中为每100人1 a 4.1例, 基因1a为5.9例, 基因1b为4.5例, 非-1基因型为2.8例).考虑所有2 307例患者群, 仅基因1b与肝硬化和HCC的发生均显著相关.基因型1b与预后较差相关, 可能因为其引起肝硬化并继之引起HCC的发生.日本国立传染性疾病研究院的Huy和Abe[2]通过对亚洲多个国家HCV感染患者进行基因组分析发现, 基因型为1b的患者较其他患者更易发生较为严重的肝脏疾病如HCC, 并且对干扰素的治疗并不敏感.Hwang *et al*[3]对67例HCV急性感染患者进行分析.有39例(58.2%)基因型为1b, 53例(79.1%)发展为慢性肝炎.其中基因型为1b的患者发展为慢性肝炎的例数远高于非1b基因型患者(89.7% *vs* 64.3%; $P = 0.019$).而慢性肝炎更易发展为HCC.上述观察研究结果一致提示, HCV基因1b与HCC的发生有着密切关系.王乃昌*et al*[4]采用特异性引物分型PCR技术对48份HCV-RNA阳性的HCC患者、肝癌癌症患者、公共场所从业人员三组血清样本进行HCV基因型鉴定, 结果显示1b型为90.48%(38/42), 2a型为7.14%(3/42), 1b/2a混合型为2.38%(1/42).其中, 12例HCV阳性的HCC患者, 全部是1b型、其感染率为100%;而在非肝癌患者、公共场所从业人员除1b外还检出了2a、1b/2a混合型, 说明HCV1b型与HCC关系较密切.

2 HCV核心区基因变异与HCC发生的关系

丙型肝炎病毒(HCV)是单股正链RNA病毒, 不是逆转录病毒, 不能整合到宿主细胞的基因组中.但是, HCV可以在肝细胞中长期存在, 在肝(癌)细胞中均检测到HCV正、负链RNA, HCV RNA可能在肝细胞的恶性转化中起着重要的作用[5-9].HCV核心(C)区编码的基因具有较高的保守性, 其表达产物核心蛋白是HCV聚蛋白前体经细胞内信号酶切而形成的非糖基化蛋白, 由191个氨基酸组成, 相对分子量为19 000-22 000.较早研究表明核心

蛋白在肝细胞肝癌(HCC)组织中发生核转位表达，推测可能与HCC的发生有关[10].HCV核心蛋白可能在肝细胞癌变中起重要作用.已经证实，HCV核心蛋白在转基因小鼠能够引起细胞变性并可间接诱发HCC[11]因此，HCV核心基因及其变异与HCC的关系倍受关注.Gu *et al*[12]HCV转染人胚肝细胞发现细胞病理形态变化，并可能是肝细胞变性的间接原因.Yamaguchi *et al*[13]8例肝癌组织进行研究发现其中4例的HCV核心基因编码截短的蛋白，该蛋白可进入肝细胞核，很可能是HCC发生的重要机制.Ruster *et al*[14]对8例HCV相关HCC患者瘤和非瘤组织中HCV核心区内的序列变异进行研究，显示瘤组织分离物比非瘤组织分离物的核心区内有显著高的变异性.变异序列多样性包括缄默变异(同义突变)、导致氨基酸替换、框架终止密码的出现和导致读框移位的缺失突变.这些观察可能对HCV的病理学，特别是其潜在的致病性(包括致肝癌作用)有重要意义.

3 HCV E2/NS1区基因变异与HCC发生的关系

HCV E2蛋白中的蛋白激酶与细胞蛋白激酶相互作用可能影响了蛋白的合成和细胞的生长.Bagaglio *et al*[15]通过采用直接测序法分析47例HCC患者和31例慢性活动性肝炎(CAH)患者血清及13例HCC患者的肿瘤或非肿瘤组织.在47例HCC患者中有9例(19%)被检测到在E2蛋白区域660位点氨基酸变异，其中8例变异的氨基酸相同，而在CAH患者中类似的变异并未被检出(P = 0.008).660位点的氨基酸变异在肝脏的肿瘤组织也被检出而在同一肝脏的非肿瘤组织中却未被检出.从而证明E2区基因的变异可能与HCC的发生有关.关于HCV E2/NS1区基因变异与HCC发生的关系的研究报道较少.Park *et al*[16]确定2例HCC患者HCC和周围肝硬化肝组织E2/NS1区的高变区序列.HCC和肝硬化肝组织HCV RNA的序列差异分别为2和5个核苷酸.每例患者氨基酸序列在一和二个位点发生改变.这些发现虽然提示HCV在HCC癌变发生中可能的病因作用，但应在更多病例包括在同一患者的多株分离物进行HCV的全序列分析，才可能获得该区的变异与HCC发生关系的更多信息.

4 HCV NS3区基因变异与HCC发生的关系

已知HCV NS3丝氨酸蛋白酶在病毒的生活周期中起关键作用，而且可能与宿主细胞调节蛋白相互作用，因此，NS3蛋白也可能在肝细胞癌变中起重要作用.Zemel *et al*[17]对从HCC患者血清、肿瘤和非瘤组织分离的编码丝氨酸蛋白酶的HCV NS3基因进行基因分析.序列比较仅仅在从HCC组织分离的NS3克隆的催化位点附近产生独特变异.这些变异包括导致 一个“大的”带电氨基酸的插入，伴疏水氨基酸的一个极性的替换以及伴极性氨基酸的带电的替换.这些变化影响活性定位点周围电负荷的稳定性，并因此影响丝氨酸蛋白酶的活性和底物的特异性.这一研究首次确定从HCC组织分离的HCV NS3丝氨酸蛋白酶基因的催化区有显著的氨基酸改变.

5 HCV NS5区基因变异与HCC发生的关系

近几年来研究发现，HCV的野型(PKR)-NS5A株可能通过与PKR蛋白激酶结合和抑制其功能而有致癌潜能[18].为了确定NS5A-PKR蛋白激酶结合区是否可能涉及HCV相关肝癌的癌变过程，De Mitri *et al*[19]对85例HCC患者和51例慢性活动型肝炎(CAH)患者血清中的该序列进行了分析.对13例HCC病例还进行了肿瘤和非肿瘤肝组织的序列分析.结果:在88%的HCC和69%的CAH病例发现野型或保留PKR结合活性的单一变异株(P = 0.0 096).除3例外，所有HCC病例均显示在血清和肝组织间的氨基酸无多样性变化.野型在有或无肝硬化的HCC间的分布相同.该结果表明，与CAH组比较，野型NS5A-PKR株在HCC的流行率显著高.这些资料提示，HCV对PKR活性的抑制可能代表与HCV相关的致癌的一种可能机制.另外，Ruster *et al*[14]对8例HCV相关HCC患者瘤和非瘤组织中HCV NS5区内的序列变异进行研究也发现，瘤和非瘤组织分离物HCV NS5区序列的变异性无显著差异.结合这两项研究的结果似乎提示，HCV NS5序列的相对稳定(而不是变异)才可能为HCV诱发HCC所必需，但确切状况尚需深入研究.

总之，对HCV基因型及其变异与HCC发生的关系的研究，对阐明HCC的发生机制以及HCC的防治有着重要意义.然而，目前对HCV基因型特别是HCV的基因变异与HCC发生的关系的研究尚不够充分，因为大多研究仅局限于HCV的某一或某些基因区，而且观察对象较少.因此，有必要在更多的HCV相关HCC患者人群对HCV进行多基因区甚至全基因组序列的分析研究才有助于对HCV的基因变异(或不变异，如HCV NS5序列)与HCC发生的关系的阐明.

6 参考文献

1 Roffi L, Redaelli A, Colloredo G, Minola E, Donada C, Picciotto A, Riboli P, Del Poggio P, Rinaldi G, Paris B, Fornaciari G, Giusti M, Marin R, Morales R, Sangiovanni A, Belloni G, Pozzi M, Poli G, Mascoli N, Corradi C, Pioltelli P, Scalori A, Mancia G. Outcome of liver disease in a large cohort of histologically proven chronic hepatitis C: influence of HCV genotype. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:501-506

2 Huy TT, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infections in Asia. *Pediatr Int* 2004;46:223-230

3 Hwang SJ, Lee SD, Lu RH, Chu CW, Wu JC, Lai ST, Chang FY. Hepatitis C viral genotype influences the clinical outcome of patients with acute posttransfusion hepatitis C. *J Med Virol* 2001;65:505-509

4 王乃昌, 阎建文, 刘玉萍, 吴立平. 原发性肝细胞癌与HCV分型的关系. 疾病监测 2002;17:125-127

5 Tang L, Tanaka Y, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Detection of hepatitis C virus RNA in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization. *Cancer* 1995;76:2211-2216

6 Sansonno D, Cornacchiulo V, Racanelli V, Dammacco F. In situ simultaneous detection of hepatitis C virus RNA and hepatitis C virus-related antigens in hepatocellular carcinoma.

Cancer 1997;80:22-33
7 Ohishi M, Sakisaka S, Harada M, Koga H, Taniguchi E, Kawaguchi T, Sasatomi K, Sata M, Kurohiji T, Tanikawa K. Detection of hepatitis-C virus and hepatitis-C virus replication in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:432-438
8 Li L, Wang W, Yu X. Detection of hepatitis C virus RNA in the tissue of hepatocellular carcinoma by multiple detection system. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2000;14:47-51
9 Lei X, Zhao L, Liu C, Liu L, Zhou S, Wang J. Detection of hepatitis C virus from hepatocellular carcinoma and its relationship to hepatocarcinogenesis. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2001;32:183-187
10 Suzuki T, Matsuura Y, Harada T, Suzuki R, Saito I, Miyamura T. Molecular basis of subcellular localization of HCV core protein. *Liver* 1996;16:221-224
11 Tanaka N, Aoyama T. Possible mechanisms of hepatitis C virus-related hepatocarcinogenesis. *Nippon Rinsho* 2004;62:2137-2144
12 Gu J, Wang L, Che Y, Liu L, Jiang L, Dong S, Li W, Li Q. Morphological alteration and biological properties of hepatocytes not related to tumorigenesis following transfection with HCV core protein. *J Viral Hepat* 2005;12:20-26
13 Yamaguchi R, Momosaki S, Gao G, Hsia CC, Kojiro M, Scudamore C, Tabor E. Truncated hepatitis C virus core protein encoded in hepatocellular carcinomas. *Int J Mol Med* 2004;14:1097-1100
14 Ruster B, Zeuzem S, Krump-Konvalinkova V, Berg T, Jonas S, Severin K, Roth WK. Comparative sequence analysis of the core-and NS5-region of hepatitis C virus from tumor and adjacent non-tumor tissue. *J Med Virol* 2001;63:128-134
15 Bagaglio S, De Mitri MS, Lodrini S, Paties C, Cassini R, Bianchi G, Bernardi M, Lazzarin A, Morsica G. Mutations in the E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2005;12:243-250
16 Park CK, Park TR, Kim YB, Kim HY, Yoo JY, Kim CH, Choo SH, Cho JM. Viral loads and E2/NS1 region sequences of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma and surrounding liver. *Korean J Intern Med* 1997;12:28-33
17 Zemel R, Kazatsker A, Greif F, Ben-Ari Z, Greif H, Almog O, Tur-Kaspa R. Mutations at vicinity of catalytic sites of hepatitis C virus NS3 serine protease gene isolated from hepatocellular carcinoma tissue. *Dig Dis Sci* 2000;45:2199-2202
18 Gimenez-Barcons M, Franco S, Suarez Y, Forns 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 De Mitri MS, Morsica G, Cassini R, Bagaglio S, Zoli M, Alberti A, Bernardi M. Prevalence of wild-type in NS5A-PKR protein kinase binding domain in HCV-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2002;36:116-122

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅2006年《实用儿科临床杂志》

《实用儿科临床杂志》为儿科学类核心期刊、中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、俄罗斯《文摘杂志》来源期刊. 本刊办刊宗旨为贯彻党和国家的卫生工作方针、政策，贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针，反映国内外儿科医疗、科研等方面的新技术、新成果及新进展，促进学术交流. 本刊辟有专家论坛、论著、小儿神经基础与临床、实验研究、儿童保健、误诊分析、药物与临床、综述、小儿外科、病例（理）讨论、病例报告、临床应用研究等栏目. 2006年起本刊由月刊改为半月刊，A4开本，64页，每月5、20日出版，ISSN 1003-515X，CN 41-1106/R. 国内外公开发行，国内邮发代号：36-102，国外邮发代号：M1763. 欢迎广大儿科医务工作者和医学科教研人员、各级图书馆（室）订阅邮购. 国内定价：6.50元/期，156.00元/年；国外定价：10.00美元/期，240美元/年. 联系地址：453003河南省新乡市新乡医学院《实用儿科临床杂志》编辑部. 联系电话：0373-3029144，0373-3831456；传真：0373-3029144；E-mail: syqk@chinajournal.net.cn; syqk@xxmc.edu.cn.

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1734-1736
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

移植肝细胞基因调控研究

林 勇,曾 欣

林勇,曾欣,中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科
上海市 200003
国家自然科学基金资助项目,No. 30200122,No. 30400205
上海市自然科学基金资助项目,No. 04ZR14004
上海高校优秀青年教师后备人选基金资助项目,No. 03YQHB112
通讯作者:林勇,200003,上海市凤阳路415号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科. linyongmd@yahoo.com.cn
电话: 021-63610109-73255 传真:021-63520020
收稿日期: 2005-05-17 接受日期: 2005-05-30

摘要

随着基因工程和基因治疗方法的不断更新，肝细胞移植技术在基础研究和临床应用中已取得很大进展，特别是利用基因调控手段提高移植肝细胞增殖能力、改善移植肝细胞分化水平以及调控移植肝细胞特异性功能基因表达，为肝细胞移植的进一步应用展示了广阔的前景.通过对移植肝细胞某些特定靶基因表达的调控，将有可能培养出抗排斥能力强、存活时间长、功能作用全的“超级肝细胞”(super hepatocyte)，上述研究的开展对于急慢性肝病、肝纤维化、肝脏功能基因缺陷性疾病等的治疗具有重要意义，并将成为肝病细胞移植治疗研究的重要领域.

林勇, 曾欣. 移植肝细胞基因调控研究. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1734-1736
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1734.asp

0 引言

近20 a来，一系列基础与临床研究证实:利用肝细胞移植(hepatocyte transplantation，HCT)技术将各种类型移植肝细胞，包括正常成熟肝细胞、不同发育阶段肝细胞、肝潜能细胞、修饰型肝细胞移植于急慢性肝功能衰竭及肝脏功能基因缺陷性疾病受体体内，可以使之定居、增殖，并能重建肝组织结构及维持主要肝功能.相对于原位肝移植的供体缺乏、治疗代价高等不足，HCT具有很好的临床应用前景.但目前乃至今后HCT面临的最大挑战就是如何提高供体肝细胞在体、内外的增殖能力和分化水平，特别是维持其在受体内的增殖能力和生物学活性，以改善HCT的治疗效果.目前，人类基因组计划(human genome project)的完成和后基因组学的研究为HCT的进一步发展创造了条件，许多学者在基因水平开展了移植肝细胞的调控研究，通过调控移植肝细胞某些功能基因的表达，培养出抗排斥能力强、存活时间长、功能作用全的“超级肝细胞”(super hepatocyte)[1-2].我们先后在数项国家级和上海市基金的资助下，系统开展了移植肝细胞增殖、分化以及生物学功能活性的基因调控研究.一系列的结果证实，通过调控移植肝细胞某些重要基因的表达可有效改善移植肝细胞各种生物学活性，是HCT研究的重要领域之一.

目前，有关移植肝细胞基因调控研究主要关注以下三个方面:(1)提高移植肝细胞增殖能力;(2)改善移植肝细胞分化水平;(3)调控特异性功能基因表达.

1 提高移植肝细胞增殖能力

维持移植肝细胞在体内、外的增殖能力，对提高其功能活性和HCT治疗效果有极其重要的意义.一些研究通过调控细胞周期基因表达或外源导入增殖基因和抗凋亡基因以改善移植肝细胞的增殖能力.$p27^{Kip1}$基因表达产物可下调细胞周期素E及细胞周期素依赖性激酶CDK 2的活性，使细胞停滞在G1期，增殖受到抑制.Karnezis *et al*[3]发现$p27^{Kip1}$基因敲除的小鼠肝细胞DNA合成能力较野生型提高5倍;通过脾脏注射将此类肝细胞移植于肝纤维化小鼠，移植肝细胞增殖数量明显增加，小鼠平均生存期由野生型肝细胞移植组的35 d提高至57.5 d，2 mo的生存率提高近5倍.SV40T抗原基因是用于调控移植肝细胞增殖的重要外源目的基因之一，其诱导细胞增殖的作用可能与抑制抑癌基因p53和Rb的表达有关[4].Cai *et al*[5-6]将SV40T抗原基因片段整合入移植肝细胞基因组内，同时在SV40T抗原基因片段侧翼设计了LoxP重组位点，使该片段可被外源表达的Cre重组酶去除.SV40T抗原修饰后的移植肝细胞增殖能力明显增强，每隔48 h细胞数目增加1倍，且细胞形态和功能均具有成熟分化肝细胞的特点;由于移植肝细胞基因组中的SV40T抗原片段随时可被外源Cre重组酶切除，移植肝细胞的生长可被人为控制，并且能回复到永生化前的状态，避免了HCT治疗过程中肝细胞永生化趋势和成瘤危险.Kobayashi *et al*[4]将上述基因修饰过的移植肝细胞经脾内注射治疗肝切除致急性肝功能衰竭大鼠，发现大鼠生存率提高60%，生存时间由对照组的不足5 d延长至30 d;肝功能明显好转;病理解剖和免疫组化显示肝残余尾状叶增大，肝细胞再生明显.利用逆转录病毒将SV40T抗原基因与单纯疱疹病毒胸苷激酶基因片段同时整合入细胞构建回复性永生化肝细胞株，如肝细胞株OUMS-29/tk，能人为调控肝细胞增殖能力和永生化表现[7].Werner *et al*[8]通过脂质体介导转染白蛋白启动子调控的反义序列来抑制细胞周期负性调节蛋白Rb和P53，同时共转染表达细胞转录因子E2F和细胞周期蛋白D1基因的质粒，建立增殖能力很强的人肝细胞株HepZ.端粒和端粒酶与细胞的增殖关系密切，上调

肝细胞端粒酶催化亚单位-端粒酶逆转录酶(hTERT)表达能促进细胞生长，抑制细胞凋亡.Wege *et al*[9]利用逆转录病毒载体将hTERT基因导入人胎肝细胞构建HF-hTERT肝细胞株，用于HCT治疗，体内、外研究证实能明显提高移植肝细胞增殖水平、功能活性以及HCT治疗效果.

移植肝细胞的凋亡是影响供体肝细胞增殖与存活的重要因素之一，通过基因调控促进移植肝细胞抗凋亡基因的表达是增强HCT治疗效果的重要方法.Song *et al*[10]将*bcl*-2基因外源导入移植肝细胞，发现基因调控后移植肝细胞抗凋亡能力明显增强，caspase-3活性同时受到抑制.肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor，HGF)是肝细胞的强效促分裂剂，对维持肝细胞的增殖有重要作用.Lee *et al*[11]将*HGF*基因导入大鼠移植肝细胞，24 h HGF的分泌可达5-10 ng/10^6细胞;将HGF修饰的供体肝细胞移植于大鼠脾脏，肝细胞数量及功能均得到明显改善.

随着基因工程技术的日臻成熟，进一步调控移植肝细胞增殖相关基因的表达，可改善其功能活性，使基因修饰后的肝细胞存活时间延长、生物学特性更接近体内正常细胞，能更广泛的应用于HCT基础和临床研究.

2 改善移植肝细胞分化水平

目前，基因修饰移植肝细胞大多以增殖旺盛的胎肝细胞或肝细胞株作为研究对象，许多研究表明，细胞增殖能力与分化水平相互制约，增殖能力强的移植肝细胞往往分化能力差，其蛋白和糖原合成、药物代谢以及解毒功能均受到限制，此外，低分化的永生化肝细胞还存在潜在致癌性[5].如果仅上调肝细胞增殖基因的表达，特别是对尚缺乏成熟分化表型的胎肝细胞进行上述基因调控，将有可能抑制移植肝细胞分化能力和生物学功能.因此调控某些分化基因的表达可促进移植肝细胞向成熟表型转化并增强其功能.晚近，Kunieda *et al*[12]研究表明将调控分化水平的p21基因导入SV40T抗原基因修饰的永生化肝细胞NKNT-3，肝细胞的分化表型及功能均明显改善.

研究表明，肝细胞在分化转录水平上的调控是维持其功能的重要途径之一.许多与分化相关的转录因子如HNF3β、C/EBPα及HNF4α是调控肝细胞分化和维护肝细胞生物学功能的重要转录蛋白.缺乏HNF3β转录活性的肝细胞株的功能基因如白蛋白、甲状腺转运蛋白、转铁蛋白及醛缩酶B等表达显著下降，表明HNF3β在肝细胞特异性基因表达的转录调控中起重要作用.C/EBPα属于C/EBP家族，仅在高度分化且不分裂的细胞中高水平表达，肿瘤细胞中C/EBPα表达明显下降.将C/EBPα基因转染至永生化肝细胞或肝癌细胞株后，细胞增殖受到抑制，提示C/EBPα对细胞增殖起负性调控作用.而对敲除C/EBPα基因的肝细胞株进行体外培养后发现，细胞增殖明显增强，并且表现出去分化的某些特征，如增殖时间缩短、核异型性及成瘤性，提示C/EBPα对促进肝细胞分化起重要作用.HNF4α是一种核激素受体家族的转录因子，在分化成熟的肝细胞中高表达，是调控肝细胞分化和维护肝细胞生物学功能的重要转录蛋白.HNF4不仅可以影响肝细胞的分化表型，同时还调控肝细胞中参与脂肪代谢、白蛋白合成以及药物解毒等重要功能基因表达[13-14].研究发现:原代培养肝细胞HNF4等分化基因的表达下调，利用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide，DMSO)或制瘤素M诱导HNF4基因表达或上调HNF4基因的转录活性可以促进肝细胞分化，增强其功能[15-16].HNF4α过表达可逆转肝癌细胞的去分化状态.有研究表明将HNF4α基因转染至无内源性HNF4α表达的肝癌细胞株H5后，发现H5部分肝细胞功能被激活，包括表达α-抗胰蛋白酶、β-纤维蛋白原及甲状腺转运蛋白.用地塞米松诱导HNF4α基因转染后的细胞株，细胞HNF4α和糖皮质激素的表达提高10倍.将表达HNF4α的H5细胞用去甲基化药物5-氮胞苷处理，再用含有地塞米松的无糖培养基筛选阳性细胞株，发现这些肝细胞许多功能基因表达上调，其中一些细胞克隆已经完全恢复了正常肝细胞功能，表明HNF4α基因表达可充分维持正常肝细胞分化与功能[16].

3 调控特异性功能基因表达

基因调控移植肝细胞，不仅可以控制肝细胞自身的生物学特性，同时还可利用移植肝细胞作为载体将外源特异性功能基因导入体内，以增强HCT治疗作用.同种异体肝细胞移植后，受体对移植肝细胞的免疫排斥强度依赖于二者之间的组织相容性匹配程度，也是决定移植效果的关键因素之一.移植肝细胞自身的免疫原性诱导宿主体内$CD4^+$和$CD8^+$T细胞介导细胞免疫反应，还可通过FasL表达与移植肝细胞表面的Fas受体结合，诱发肝细胞凋亡[17].通过对移植肝细胞进行基因修饰，以降低宿主免疫排斥反应，可有效提高HCT治疗效果.Hayashi *et al*[18]为缓解宿主体内对移植肝细胞的补体依赖性细胞毒作用，将表达CD59抗原的逆转录病毒整合至大鼠供体肝细胞，并置于一定浓度的人血清内培养，细胞抗排斥能力明显提高，生存活力比对照组提高20%.Okada *et al*[19]将由巨细胞病毒(CMV)启动子驱动表达IL-10的腺病毒体外修饰供体肝细胞，并移植于受体脾脏，外源表达的IL-10可以明显缓解受体体内T细胞介导的免疫排斥反应，供体肝细胞的存活期明显延长，接近自体肝细胞移植的效果.Reddy *et al*[20]构建表达CTLA4免疫球蛋白的重组腺病毒体外修饰供体肝细胞，移植后表达的CTLA4球蛋白可阻断$CD4^+$和$CD8^+$T细胞分泌细胞因子和T细胞活化，有效抑制受体内细胞免疫应答，移植肝细胞存活时间明显延长.

将能治疗和控制慢性肝病、肝纤维化发展的功能基因导入移植肝细胞内并用于HCT体内研究，这些外源基因的表达可控制慢性肝病的病程，阻止肝纤维化的发生和发展.将IL-18基因修饰的供体肝细胞移植入肝纤维化大鼠，受体肝脏和外周血中均有IL-18高效表达，可以调控肝纤维化形成过程中Th细胞分泌细胞因子的比例，降低

肝脏自身免疫反应,逆转肝纤维化进程.进一步的研究利用可表达γ-IFN的重组腺病毒修饰小鼠移植肝细胞,脾脏移植治疗血吸虫性肝纤维化小鼠,外源表达的γ-IFN可抑制肝星状细胞活性,治疗4 wk后肝纤维化小鼠肝脏中Ⅰ型和Ⅲ型胶原表达明显下降;TGF-β1和其受体表达明显减少,肝纤维化发展得到有效控制[21-22].为减轻慢性肝病和肝纤维化造成的肝细胞坏死和功能减退,Mignon *et al*[23]将*bcl*-2修饰后的供体肝细胞移植于大鼠脾脏,发现受体肝脏抵抗Fas介导的细胞凋亡的能力明显增强,其肝细胞再生数量可增加16%,缓解了慢性肝病引起的肝细胞功能衰减和肝纤维化的发展.

目前,我们课题组在多项科研基金的资助下,先后开展了移植肝细胞的增殖基因(如人端粒酶重要组分hTR和hTERT基因)调控、分化基因(如HNF4基因)调控以及功能基因(如uPA、MMP-1、HGF、NO合酶基因)调控研究.初步结果显示,选择多个合适的外源基因并调控其在移植肝细胞内表达,可达到既提高肝细胞增殖能力,又促进肝细胞正常分化并维持其重要生物学功能的目的,也是利用基因工程技术在增殖与分化两方面双向调控移植肝细胞生物学功能、提高HCT治疗水平的有益探索.

总之,近年来HCT在基础研究和临床应用中已取得很大进展,利用基因工程技术提高移植肝细胞增殖能力、改善移植肝细胞分化水平并调控移植肝细胞特异性功能基因表达,为HCT的进一步应用展示了广阔的前景.随着基因工程、基因治疗技术等研究的不断深入,培养功能完备的"超级肝细胞"并在临床治疗中广泛应用将成为可能.

4 参考文献

1 Lee LA. Advances in hepatocyte transplantation: a myth becomes reality. *J Clin Invest* 2001;108:367-369

2 Guha C, Roy-Chowdhury N, Jauregui H, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte-based gene therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:51-57

3 Karnezis AN, Dorokhov M, Grompe M, Zhu L. Loss of $p27^{Kip1}$enhances the transplantation efficiency of hepatocytes transferred into diseased livers. *J Clin Invest* 2001;108:383-390

4 Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox IJ, Leboulch P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000;287:1258-1262

5 Cai J, Ito M, Westerman KA, Kobayashi N, Leboulch P, Fox IJ. Construction of a non-tumorigenic rat hepatocyte cell line for transplantation: reversal of hepatocyte immortalization by site-specific excision of the SV40 T antigen. *J Hepatol* 2000;33:701-708

6 Kobayashi N, Noguchi H, Westerman KA, Watanabe T, Matsumura T, Totsugawa T, Fujiwara T, Leboulch P, Tanaka N. Cre/loxP-based reversible immortalization of human hepatocytes. *Cell Transplant* 2001;10:383-386

7 Kobayashi N, Noguchi H, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Fujiwara T, Miyazaki M, Fukaya K, Namba M, Tanaka N. Insertion of a suicide gene into an immortalized human hepatocyte cell line. *Cell Transplant* 2001;10:373-376

8 Werner A, Duvar S, Muthing J, Buntemeyer H, Kahmann U, Lunsdorf H, Lehmann J. Cultivation and characterization of a new immortalized human hepatocyte cell line, HepZ, for use in an artificial liver support system. *Ann N Y Acad Sci* 1999;875:364-368

9 Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 2003;124:432-444

10 Song E, Chen J, Antus B, Su F, Wang M, Exton MS. Adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfer inhibits apoptosis and promotes survival of allogeneic transplanted hepatocytes. *Surgery* 2001;130:502-511

11 Lee JH, Kim WH, Park H, Yun C, Kim BH, Kwak SJ, Cho H, Kim MW. Production and characterization of immortalized rat hepatocytes secreting hepatocyte growth factor/scatter factor. *Hepatogastroenterology* 2000;47:978-983

12 Kunieda T, Kobayashi N, Sakaguchi M, Okitsu T, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Maruyama M, Noguchi H, Takesue M, Shibata N, Ohmoto K, Fujiwara T, Yamamoto S, Tanaka N. Transduction of immortalized human hepatocytes with p21 to enhance differentiated phenotypes. *Cell Transplant* 2002;11:421-428

13 Watt AJ, Garrison WD, Duncan SA. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* 2003;37:1249-1253

14 Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 2003;34:292-296

15 Lazaro CA, Croager EJ, Mitchell C, Campbell JS, Yu C, Foraker J, Rhim JA, Yeoh GC, Fausto N. Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* 2003;38:1095-1106

16 Naiki T, Nagaki M, Shidoji Y, Kojima H, Moriwaki H. Functional activity of human hepatoma cells transfected with adenovirus-mediated hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 gene. *Cell Transplant* 2004;13:393-403

17 Kawahara T, Yagita H, Kasai S, Sawa M, Kato K, Okumura K, Futagawa S, Mito M. Allogeneic hepatocyte transplantation: Contribution of Fas-Fas lignad interaction to allogeneic hepatocyte rejection. *J Gas Hep* 1998;13(Suppl):S119-S123

18 Hayashi S, Isobe K, Emi N, Okada H, Yokoyama I, Takagi H. Protection of xeno-hepatocytes from complement-mediated cytolysis by transduction with homologous restriction factor 20 gene using retroviral vector. *Eur Surg Res* 1998;30:161-167

19 Okada Y, Saito S, Fujisawa K, Fujiwara T, Tanaka N. Adenovirus-mediated viral IL-10 gene transfer prolongs survival of xenogeneic spheroidal aggregate-cultured hepatocytes. *Transpl Int* 2000;13(Suppl 1):S485-S493

20 Reddy B, Gupta S, Chuzhin Y, Kalergis AM, Budhai L, Zhang M, Droguett G, Horwitz MS, Chowdhury JR, Nathenson SG, Davidson A. The effect of CD28/B7 blockade on alloreactive T and B cells after liver cell transplantation. *Transplantation* 2001;71:801-811

21 Zhang LH, Pan JP, Yao HP, Sun WJ, Xia DJ, Wang QQ, He L, Wang J, Cao X. Intrasplenic transplantation of IL-18 gene-modified hepatocytes: an effective approach to reverse hepatic fibrosis in schistosomiasis through induction of dominant Th1 response. *Gene Ther* 2001;8:1333-1342

22 Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN-gamma gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in Schistosoma japonicum-infected mice. *Parasite Immunol* 2001;23:11-17

23 Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998;4:1185-1188

编辑 王谨晖 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1737-1743
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

三氧化二砷治疗肝癌的分子机制

吴顺华,成 军,郑玉建

吴顺华,成军,北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
吴顺华,郑玉建,新疆医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
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
通讯作者: 成军,100011,北京市,北京地坛医院传染病研究所.
cj@genetherapy.com.cn
电话:010-64481639 传真:010-64281540
收稿日期:2004-09-18 接受日期:2005-05-25

摘要

三氧化二砷(As_2O_3)在白血病和各类实体瘤的治疗中广泛应用.肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是消化系统常见的肿瘤.其恶性程度高、预后差.As_2O_3在与肝癌细胞的研究表明,他可以发挥细胞凋亡的正向调控作用,抑制肿瘤细胞增殖,是较好的抗肿瘤药物之一.但As_2O_3同时作为一种致癌物,与含巯基的大分子蛋白结合,影响细胞的正常代谢,导致细胞内信号转导通路异常调节,抑癌基因失活等,从而引起皮肤异常改变和其他内脏肿瘤如肝癌、肺癌、膀胱癌的发生.因此研究As_2O_3对肝细胞作用的机制对有效防治HCC有很重要的意义.本文从As_2O_3的生物学抗癌效应入手综述其治疗肝癌的分子机制.

吴顺华,成军,郑玉建.三氧化二砷治疗肝癌的分子机制.世界华人消化杂志 2005;13(13):1737-1743
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1737.asp

0 引言

砷是一种灰色类金属,元素周期表中第33号元素,相对原子质量A_r74.192,相对密度5.173,不溶于水和强酸,在自然界中,砷分布较广泛,在岩石和砷矿中,砷常以硫化物的形式存在,其他形式多以三价砷和五价砷的化合物形式存在,如亚砷酸酐、砷酸酐、亚砷酸钠、砷酸钠等.砷的生物学特性具有两面性,一方面为其剧毒性,另方面也是生命所必需的超微量元素,并且有抗癌作用.在很久以前人类就发现了砷的医用价值,三氧化二砷(As_2O_3)及四硫化四砷(As_4S_4,雄黄的主要成分)在白血病和各类实体瘤治疗中都广泛应用,并已经在中国、美国、欧洲等国成功上市.

我国学者应用As_2O_3治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)取得良好的疗效,并研究发现As_2O_3治疗APL的主要机制是诱导细胞凋亡,从而为实体瘤的治疗提供了一个新思路.肝细胞肝癌(HCC)是消化系统常见的肿瘤,其恶性程度高、预后差.As_2O_3治疗肝细胞癌的研究表明,他是较好的抗肿瘤药物之一[1-5].但As_2O_3同时是一种致癌物,可以引起皮肤异常改变和其他内脏肿瘤如肺癌、膀胱癌、肝癌等发生.因此研究As_2O_3对肝细胞作用的分子机制对有效防治HCC有很重要的意义.本文从As_2O_3的生物学抗癌效应入手综述其治疗肝癌的分子机制.

1 As_2O_3对巯基酶及大分子蛋白的影响

1.1 As_2O_3与巯基的相互作用 砷是一种细胞原浆毒,细胞内的相邻巯基是三价砷的主要化学受体.As_2O_3主要通过与巯基结合,改变和影响机体内多种酶和大分子蛋白的活性,继而引起一系列生物学抗癌效应.进入体内的外源性砷通过激活特异性激酶,抑制依赖巯基(-SH)的磷酸酶或干扰磷酸转移酶等作用,改变蛋白的磷酸化状态.受影响的重要酶系统有:丙酮酸脱氢酶、磷酸酯酶、细胞色素氧化酶、DNA聚合酶、谷胱甘肽(GSH)、半胱氨酸和二巯基化物如二巯基丙醇等,由磷酸酶衍变成砷还原酶,将五价砷还原为三价砷,抵抗As_2O_3的毒性作用.因此As_2O_3的毒理学作用机制是对许多酶的巯基有可逆性结合.

砷剂直接作用于巯基(-SH),以含巯基的酶为主攻方向,以这类酶的巯基为靶向,与相关的大分子蛋白结合[6].Hossain *et al*[7]发现$NaAsO_2$通过细胞膜到细胞核的信号级联反应,诱导鼠胸腺T淋巴细胞凋亡.$NaAsO_2$诱导GPI固定蛋白THY1聚集,继而有丝分裂原家族激酶MAKP和c-Jun激活,多聚ADP核糖聚合酶(PARP)降解,这个全部过程均可被二巯基苏糖醇(DTT)所阻断,这证明As^{3+}必须与巯基蛋白结合,才能通过信号转导过程诱导T淋巴细胞凋亡.

1.2 As_2O_3影响细胞氧化还原状态的酶类 一般认为,成人口服砷的中毒剂量为10-50 mg,致死剂量为60-200 mg.急性砷中毒通常发生在摄入后30 min,如与食物一起摄入,中毒症状出现的时间可延迟.其主要表现为:剧烈的恶心、呕吐、腹痛、腹泻和胃肠道出血,可因脱水和循环系统衰竭导致死亡.慢性砷中毒则以神经系统症状为主.As^{3+}进入体内与多种含巯基的酶如6-磷酸葡萄糖脱氢酶、细胞色素氧化酶、6-氨基酸氧化酶、磷酸氧化酶、胆碱氧化酶、氨基转移酶,特别是丙酮酸氧化酶相结合,导致细胞呼吸和氧化磷酸化过程及能量代谢障碍,损害细胞的呼吸作用.砷还可通过抑制还原型谷胱甘肽(GSH)等的抗氧化活性或选择性增强细胞色素P450依赖的单加氧酶活性而产生细胞毒性作用.GSH是细胞内抗氧化物.As^{3+}与GSH的巯基结合,抑制了GSH清除自由基抗氧化功能

及其重要的解毒功能，或选择性增强细胞色素氧化酶P450依赖的单氧化酶活性诱导细胞产生活性氧类(ROS). Sakurai *et al*[8]认为砷剂引起的细胞呼吸、氧化过程、氧化磷酸化过程和能量代谢的障碍以及活性氧类等对细胞多方位的氧化性损害,可能是导致肿瘤细胞杀灭、凋亡及抑制增殖的基本机制. Yang *et al*[9]研究膀胱癌、APL和胃肠癌等17种癌细胞系发现GSH在哺乳动物细胞对As_2O_3解毒中起着重要作用. 癌细胞中GSH含量低的对As_2O_3敏感，GSH含量高则对As_2O_3耐药. 而对As_2O_3的敏感性与肿瘤细胞中GSH的转移酶Pi和多药耐药相关蛋白Ⅰ的水平无关，他们认为肿瘤细胞的GSH水平和γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶抑制剂BSO(buthionine Sulfoxmine)对GSH的调节水平可作为选用As_2O_3治疗实体瘤的指征. Akao *et al*[10]在对神经母细胞瘤(NB)细胞的系列研究中也发现对As_2O_3敏感的NB，其细胞内GSH浓度均低于40 nmol/mg;当NB细胞内GSH浓度>40 nmol/mg时，As_2O_3不能导致其发生凋亡，所以内源性GSH浓度的变化是癌细胞对砷剂治疗的敏感性指标. Dai *et al*[11]研究也表明细胞内GSH含量对As_2O_3诱导凋亡有决定性作用. GSH的含量降低能增加肿瘤细胞对As_2O_3的敏感性，提示干扰肿瘤细胞内GSH氧化还原系统可以使肿瘤对As_2O_3的抑制增殖和诱导凋亡作用更敏感. 用N-酰半胱氨酸或硫辛酸增加细胞内GSH浓度，可阻断As_2O_3诱导的凋亡. 用BSO降低细胞内GSH浓度，可使HL60和U937细胞对As_2O_3的敏感性增加. Kito *et al*[12]研究As_2O_3治疗HCC，HLE，HLF，HuH7和HepG2时，发现BSO通过下调GSH的表达使HLE细胞对As_2O_3化疗敏感. 当BSO和As_2O_3联合应用时增加ROS产物，促进细胞凋亡.

2 As_2O_3治疗肝癌的分子机制

2.1 诱导细胞凋亡 细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象,在多细胞生物去除不需要的或异常的细胞中起着必要的作用,在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起重要作用. 细胞凋亡不仅是一种特殊的细胞死亡类型,而且具有重要的生物学意义及复杂的分子生物学机制[13]. As_2O_3诱导恶性肿瘤细胞凋亡的分子机制是基因控制的自主有序过程,需多种基因及其产物参与. (1)在As_2O_3诱导细胞凋亡的过程中，凋亡信号直接作用于线粒体，引起其结构与功能的改变. 线粒体是对砷最敏感的细胞器，线粒体功能障碍可能是细胞启动凋亡的重要因素之一. 线粒体膜通透性转运孔(MPT)是位于线粒体内膜和外膜接触点的一组多蛋白的复合物，主管膜内外交通. MPT的重要成分是邻近含巯基的腺嘌呤核苷转位蛋白(ANT)，ANT很可能是As_2O_3诱导MPT开放和细胞凋亡的触发器. As^{3+}与这些巯基结合形成二硫键，则MPT开放. 当As^{3+}导致细胞能量代谢障碍及ROS等氧化物损害了线粒体膜时，也同样使MPT通透性增强. 随之是线粒体跨膜电位(Δψm)降低或消失，细胞色素C和其他凋亡诱导因子(AIF)的产生和释放到胞质中，继而出现级联凋亡反应[14]. As_2O_3诱导细胞凋亡途径是多种形式、复杂变化的. Shen *et al*[15]报道以As_2O_3处理食管癌细胞系2 d后即可见凋亡现象，表现为线粒体的凝聚，这种变化早于染色质的凝聚，证明线粒体是As_2O_3作用的最早目标. Susin *et al*[16]发现亚砷酸以环孢素Cyclosporin和Bcl-2抑制的方式诱导MPT开放. 体外纯化重组的0.2 μmol/L的DTT能阻断As_2O_3诱导的细胞Δψm的消失，并阻断Caspase(胱冬肽酶)活化和细胞凋亡，BSO则能与As_2O_3协同增强凋亡作用. As_2O_3除引起线粒体功能障碍诱导凋亡外，还有:(2)与蛋白和氨基酸分子中的巯基结合，影响巯基酶活性，使蛋白灭活，导致细胞代谢异常而发生细胞凋亡;(3)As_2O_3处理肿瘤细胞后，Bcl-2表达减少，Bax表达增加，使Bcl-2与Bax比例下降而发生细胞凋亡;(4)通过促使癌细胞Fas的表达而促进癌细胞凋亡;(5)激活胱冬肽酶的活性诱导凋亡. 细胞粒体功能障碍导致胱冬肽酶级联激活,促使凋亡反应最终得以完成. MPT半开放，线粒体AIF释放到胞质后,激活了胱冬肽酶家族的某些成员,导致细胞蛋白选择性降解. Bcl家族成员可能通过调控这些分子的亚细胞定位和活性，实现其调控细胞凋亡的作用. Akao *et al*[10]发现砷剂诱导KOLL44和LYH7的凋亡与胱冬肽酶有关，As_2O_3诱导NB4细胞凋亡与胱冬肽酶-3(Cp-3)活化有关，通过Western blot方法应用胱冬肽酶-8抑制物ACIETD-CHO进行凋亡抑制分析，结果显示NB4细胞凋亡时伴有胱冬肽酶-8的活化. Jiang *et al*[17]研究发现以As_2O_3诱导人胃癌细胞系AGS凋亡时伴有胱冬肽酶-3的激活，同时可见胱冬肽酶-3的M_r 17 000肽的碎片、PARP裂解的M_r 85 000裂解产物，他们用胱冬肽酶的广谱抑制物ZVAD-fmk和胱冬肽酶-3特异抑制物DEAD-fmk可以部分抑制CP激活的AGS凋亡. 一些研究还认为在胱冬肽酶家族中胱冬肽酶-2、8、9、10为始动酶，而胱冬肽酶-3、6、7则起效应作用. 因此，胱冬肽酶级联形式的活化是As化合物诱导凋亡的重要信号通路. 在某一剂量范围的As_2O_3所激活的胱冬肽酶家族成员,参与了某种或某些方式的诱导凋亡.

治疗肿瘤最重要的作用机制就是促进肿瘤细胞凋亡. 对肝癌的研究也证实As_2O_3有明显的效果. Qian *et al*[18]用As_2O_3治疗中晚期原发性肝胆癌共33例，其中肝癌29例，胆囊癌4例，单用As_2O_3 15 mg·d^{-1}，静脉滴注，连用14-21 d为一周期，间歇2 wk重复. 结果29例原发性肝癌中，4例达PR，21例无变化(NC)，4例PD;4例胆囊癌中，1例CR，2例NC，1例PD，总有效率(CR+PR)为15.2%. 因此，无论是在血液肿瘤还是肝胆肿瘤中As_2O_3都是通过促进细胞凋亡达到抑瘤效果的.

2.2 As_2O_3干扰细胞信号转导和转录活化因子(signal transducers and ctivators of transcription，STAT)途径 细胞信号转导通路的激活，对于肝细胞内信号转导通路的影响,使肝细胞基因组转录产生异常调节,抑癌基因表达水

平的下降或失活，以及原癌基因和癌基因的激活、过表达都可对HCC的发生、发展产生影响[19]. 有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)是介导细胞信号转导的重要分子，普遍存在于多种生物，包括酵母和哺乳动物细胞. 自Sturgill *et al*[20]于1991年从动物细胞中鉴定出细胞外信号调节激酶(ERK)以后，MAPK信号转导通路的研究取得迅速发展. 除ERK外，还发现并克隆了c-Jun氨基末端激酶(JNK)/应激激活蛋白激活酶(SAPK)、p38和ERK5等MAPK亚族. 该激酶级联首先在促细胞分裂素所致的微管结合蛋白(MAP)激酶活化的途径中发现，故称MAP激酶级联. MAPK级联的核心是由三个Ser/Thr蛋白激酶: MAPK、MAPKK、MAPKKK组成. 级联方向为MAPKKK-MAPKK-MAPK. MAPK信号转导通路采用高度保守的三级激酶级联转导信号，细胞外刺激通过某些环节使MAPKK激活，转化MAP激酶激酶(MKK，MAP kinase kinase)，然后通过对苏氨酸和酪氨酸双位点磷酸化激活MAPK. 细胞外刺激作用于细胞，通过多级激酶级联使MAPK激活，激活的MAPK可通过磷酸化转录因子、细胞骨架相关蛋白、酶类等多种底物调节细胞生理过程. 因此，促细胞分裂素刺激的胞内信号级联反应概括为4步连续反应: (1) Ras的活化; (2) Raf-1的活化; (3) MAPK级联的活化; (4) 核效应. 哺乳动物细胞中，存在三条平行的MAPK级联反应，有ERK途径、JNK/SAPK、p38途径. 后两条途径主要对抑制细胞生长的刺激产生应答，如化学制剂、渗透压改变、热休克、蛋白合成抑制剂、脂多糖(LPS)和肿瘤坏死因子(TNF)等. 三条MAPK级联的Ser/Thr蛋白激酶具有相似的一级结构、活化机制和被底物识别的最小序列(TYY). 同一刺激能引起不同的平行级联应答，表明这些平行途径之间存在互相影响的通路. 三条途径的重要区别在于MAPK级联上游激酶活化的机制不同，ERK途径的MAPK级联上游激酶Raf-1被Ras直接活化，在凋亡信号启动的细胞凋亡过程中，PAK65可能是JNK和p38途径的MAPK级联上游激酶，受Ras的间接调节而被活化[21]. 他们通过相互独立的信号途径激活小G2蛋白-MAPKKKs-MAPKKs-MAPKs. 当细胞经As_2O_3处理后，则出现MAPK信号转导，同时应激相关的JNK、SAPK以及p38/MPK2，表明As_2O_3诱导凋亡可能与MAPK信号通路有关[22-23]. 此外，As_2O_3还可以降低酪氨酸激酶(PTK)活性，PTK在细胞增殖和分化的信号转导中起重要的作用. Li *et al*[24]在研究As_2O_3诱导K562凋亡中观察到细胞的PTK活性和BCR/ABL及ABL特异蛋白的PTK活性均降低. 随着PTK活性降低，细胞内某些蛋白酪氨酸磷酸化过程也减少，提示As_2O_3通过降低PTK活性来阻断BCL/ABL的抗凋亡信号的传导而诱导K562细胞凋亡. Hossain *et al*[7]研究也证明$NaAsO_2$诱导多胺合成的限速酶-鸟氨酸脱羧酶(ODC)的活性表达增高，从而导致鼠T淋巴细胞MAPK信号转导激活引起凋亡.

除了MAPK级联的ERK、JNK/SAPK、p38和PTK外，在信号转导中起着重要作用的还有丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)磷酸化激酶. MAPKK磷酸化并激活MAPK，而MAPKK被上游的蛋白激酶如Raf、Mos和MAPKKK激活[25]. 最常见的如Raf-1，是已知的许多激活MAPKK的细胞激酶之一，在细胞对刺激产生增殖响应的Ras信号转导通路中起着关键作用. 被激活的Ras(即Ras-GTP)可与Raf-1的N-末端域结合. 在与Ras-GTP结合并且其酪氨酸被磷酸化后，Raf-1可激活MAPKK. 例如，在白介素-2(IL-2)刺激下，Raf-1的酪氨酸被激活的SRC激酶($pp60^{SRC}$)磷酸化. 这个磷酸化作用对于Raf-1与Ras-GTP结合，并激活激酶MAPKK是绝对必须的[26]. 许多因子都可以充分激活Raf-1，例如，蛋白激酶C(PKC)，Ras-GTP和被激活的SRC激酶. 然而，这些因子最终并不总是导致同样的结果，相反地，常常产生各种各样不同的响应. 比如，蛋白激酶C将Raf-1磷酸化，随后用佛波酯处理，尽管这使得Raf-1的自身磷酸化增加了，但是MAPKK并未被激活. 而一旦MAPKK被Raf-1激活，就会把目标瞄准MAP激酶的异构体. 这些胞质Ser/Thr MAP激酶的异构体，即ERK-1和ERK-2被激活和向细胞核转移是信号转导通路上游Ras激活的最终结果. 如上所述，Raf-1激活了MAPKK，后者则将MAPK的苏氨酸和酪氨酸磷酸化而将他激活. 然后，MAPK磷酸化，并激活细胞核的转录因子，包括c-myc、c-Jun、c-fos、核因子-IL-6(NF-IL-6)、细胞质磷脂酶A2(cPLA2)、表皮生长因子受体(EGF-R)和蛋白激酶，如c-Raf-1、MAPKK和$p90^{rsk}$(蛋白磷酸酯酶-1，PP-1的糖原结合亚基)[21, 26]. 用MEK2作为酵母双杂交的诱饵，除c-Raf和KSR外，a-Raf是和MEK2作用的新配体. 体外结合实验证实了这种作用，作用点位于代表a-Raf激酶区的255-606氨基酸残基末端[27]. 可见细胞核转录因子参与了MAPK信号转导通路.

信号转导及转录活化因子(STAT)家族包括7个成员. 不仅参与正常的生理过程，而且还存在于肿瘤组织中. 信号通常产生于细胞膜表面的受体，PTK被组成性激活(导致信号转导蛋白持续激活)后，再激活STAT分子并使之磷酸化，然后进入细胞核内，STAT在核内与特异性的DNA启动子结合调节相关基因的表达. 正常生理条件下各种STAT蛋白的活化过程是短暂的，通常持续数分钟至几小时. 大多数人类肿瘤中都有STAT的组成性激活，尤其是STAT1，STAT3和STAT5. STAT1的功能主要与生长抑制有关，而STAT3和STAT5可通过抑制凋亡或诱导细胞增生作用参与肿瘤的发生和发展. 通过小分子抑制剂阻断PTK的信号转导可抑制不同肿瘤细胞株中STAT3或STAT5的组成性激活. 相对而言，缺乏STAT活性作用的正常细胞或肿瘤细胞对药物的耐受能力更强，如使用非显性STAT或反义寡核苷酸直接干预STAT信号时可获得相似的效应. 有关STAT信号途径的研究为人类肿瘤的干预治疗提供了新的分子标靶. 开发STAT蛋白(尤其是作为肿瘤治疗分子靶点的STAT3和STAT5)的抑制剂有助于进一步探究这些蛋白在

人类肿瘤中所起的重要作用[28].Cheng *et al*[29]研究发现As_2O_3可以抑制由IL-6诱导的STAT3酪氨酸激酶磷酸化，可以直接抑STAT3，激活MAPK，使JAK-STAT通路失活.因此As_2O_3可作为STAT3抑制剂发挥抗瘤效应.

2.3 As_2O_3诱导DNA损伤和促进抑癌基因的表达 砷能抑制DNA修复酶，加重DNA损伤.从而抑制肿瘤细胞的增殖.同时有许多重要的抑癌基因如Bax、Bcl-2、p53及c-myc大量表达，其中Bcl-2更为重要.Bcl-2蛋白是抗凋亡调控的最后的共同途径之一.目前认为Bcl-2可能通过以下机制抑制凋亡:(1)对脂质过氧化有保护作用，使自由基源产生系统不活化;(2)抑制$\Delta\psi m$的降低，从而抑制MPT开放，抑制细胞色素C(Cyto-C)和凋亡诱导因子(AIF)的释放;(3)可抑制IL1β转化酶(ICE，属半胱氨酸蛋白酶)，从而抑制IL1β前体转化成有活性的IL1β，继而诱导Fas基因表达.因此，Bcl-2下降时，可引发细胞凋亡.邓友平 *et al*[30]发现As_2O_3明显降低人宫颈癌Hela细胞存活率，但不依赖Bcl-2途径，主要可能通过抑制c-myc基因和病毒致瘤基因的表达来诱导其凋亡.Chen *et al*[31]报道As_2O_3能在mRNA和蛋白水平明显降低Bcl-2，但不影响Bax、Bcl-2、c-myc和p53基因的表达.Jiang *et al*[17]用As_2O_3诱导AGS细胞凋亡时发现，在As_2O_3处理后4 h即见p53蛋白水平的明显增加，如同时加入拮抗p53的寡聚核苷酸抑制p53高表达，则也抑制了细胞凋亡，表明As_2O_3抑制胃癌细胞株增殖和诱导凋亡作用与p53高表达有关.邓友平 *et al*[30]在诱导GLC82凋亡中发现As_2O_3对c-myc移位的调解作用可能是诱导凋亡的主要原因，p53基因参与其凋亡是早期过程，后期可能由p53基因激活的下游基因参与，同时观察到p16参与其凋亡过程.另一个重要的肿瘤抑制基因是p15，其在某些白血病和实体瘤中由于高度甲基化而失活.陈洪 *et al*[32]用As_2O_3静脉注射建立的HepA腹水型荷肝癌小鼠和实体型荷瘤鼠模型7 d，发现210 mg/(kg·d)组、315 mg/(kg·d)组均可有效抑制实体瘤的生长，抑瘤率分别是31.63%、42.13%，明显比DMSO对照组高($P<0.01$).腹水型荷肝癌小鼠两组平均生存时间分别是(22.50±2.43)d、(22.74±3.65)d，两组延命率分别是59.29%、76.69%，明显比DMSO对照组高($P<0.01$).流式细胞术分析腹水标本发现315 mg/(kg·d)组平均凋亡率达53.17%，而且还发现HepG2肝癌荷瘤鼠经As_2O_3处理后，实体瘤组织标本中Bcl-2表达下降，Bax表达增加，使Bcl-2/Bax的比例下降，认为这可能是诱导肝癌细胞凋亡的分子机制之一.As_2O_3可选择性地抑制肝癌细胞的凋亡[33-38].As_2O_3诱导细胞凋亡可能是通过改变Bcl-2，Bax的表达以及二者之间的比例实现的.

2.4 As_2O_3影响细胞周期的调控 细胞周期素(Cyclin)和其依赖的激酶(CDK)及CDK抑制蛋白(CKLs)三者相互协调从而完成细胞周期.前二者正向调节，CKLs起负向调节.Huang *et al*[39]报道，人Hela细胞在5 μmol/L的$NaAsO_2$作用下，KB细胞在10 μmol/L的$NaAsO_2$作用下，两种细胞总数的35%阻抑在分裂期，且伴有丝分裂异常，包括混乱的染色体聚合，纺锤体两极间拉长，荧光染色微管着色增强.剂量分析发现$NaAsO_2$在100 μmol/L以下即能显著增加微管聚合作用，结果提示As^{3+}诱导有丝分裂阻滞是由于As^{3+}影响纺锤体功能所致;他们在研究Hela细胞时，还发现在诱导有丝分裂同时伴随细胞周期素B(Cyclin B)的逐渐降解和细胞凋亡;As^{3+}对Bcl-2转染的Hela细胞只诱导分裂期细胞堆积，而不诱导凋亡;并见到Bcl-2高表达抑制Cyclin B的降解，这表明Cyclin B的降解速度是促进凋亡的决定性因素.

Li *et al*[40]发现As_2O_3明显抑制GTP诱导的微管蛋白的多聚化和微管形成，但仍保持GTP诱导的微管蛋白多聚体的稳定性.As_2O_3诱导微管蛋白分子中的两个相邻的半胱氨酸残基(Cys-12和Cys-13)交联，使结合GTP的这个位点失活，这可能是As_2O_3抑制GTP诱导效应的机制，这种非竞争性抑制可导致细胞凋亡.Park *et al*[41]报道As_2O_3能显著并呈剂量依赖性的使8种骨髓瘤细胞系阻滞在G1/G2-M期，抑制这些细胞的增殖，这种作用与As_2O_3诱导周期素依赖激酶的抑制物p21的mRNA及其蛋白水平的增高有关.他们还观察到As_2O_3通过下调Bcl-2使线粒体膜转运能力的丧失以及Cp-3增高活性，诱发骨髓瘤细胞凋亡.Seol *et al*[42]观察到As_2O_3对4种头颈癌细胞系都有抑制增殖作用，最敏感的PCL细胞系细胞被阻抑在G2/M期.在此期间，周期素依赖激酶的抑制物呈时间依赖性增加.细胞周期调解蛋白的分析证明，As_2O_3并不影响CDK2、CDK4、CDK6和细胞周期素D1、E和A，但CDC2和细胞周期素B1蛋白水平下降，As_2O_3还能使p21与CDC2的结合显著地增多，使CDC2激酶活性下降，结果表明As_2O_3的细胞阻抑作用与诱导p21增高和抑制CDC有关.刘琳 *et al*[36]用0.5-4.0 mg/L As_2O_3注射液作用于人肝癌细胞株(QGY27701、QGY27703)和正常人肝细胞株(LO2)0-72 h，发现前者细胞生长均受到不同程度抑制，且抑制作用与药物浓度和作用时间均呈明显依赖关系，而LO2细胞生长未受明显抑制.秦叔逵 *et al*[33]发现As_2O_3体内外抗肝癌作用，主要与As_2O_3诱导肝癌细胞发生凋亡有关，经药物作用后，肝癌细胞呈典型凋亡形态改变，如出现凋亡小体，流式细胞仪检测到亚G1期细胞形成的凋亡峰，As_2O_3实验组实体瘤组织切片检测到凋亡细胞，其研究还发现As_2O_3作用后肝癌荷瘤鼠组织标本中均见凋亡拮抗基因Bcl-2表达减少，Bax表达增加，这可能是As_2O_3诱导肝癌细胞凋亡的分子生物学基础.刘琳 *et al*[36]研究表明As_2O_3诱导QGY27701细胞凋亡属于迟发性凋亡，在肝癌细胞与正常肝细胞间具有选择性诱导凋亡作用，并与Bcl-2等基因调控有关，实验中观察到As_2O_3可使Bcl-2基因表达减少，Bax基因表达增加，并发现As_2O_3可使癌细胞周期阻滞于S期，从而阻滞有丝分裂.

2.5 As_2O_3对端粒酶的调节 端粒-端粒酶在肿瘤的发生、

发展中起重要作用.Rb、p53、p16、c-myc及p21等癌基因均可影响端粒酶(TLMA)的活性.绝大多数肿瘤TLMA活性增高.Hytiroglou *et al*[43]对肝炎和肝癌的端粒酶活性进行比较发现，肝癌中85%(28/33)显示端粒酶阳性，肝炎中50%(19/38)端粒酶呈弱阳性，4例正常肝组织端粒酶阴性.Nakashio *et al*[44]研究表明，肝癌细胞的分化程度与端粒酶活性也有关.分化良好的肝癌细胞端粒酶阳性率为73%(11/15)，中等分化的肝癌细胞为94%(16/17)，低分化的肝癌细胞为100%(5/5).端粒酶活性的表达可能在肝癌的形成中起重要作用.楼芳[45]采用序列重复扩增法(TRAP)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PA GE)银染法检测经As_2O_3作用后的肝癌细胞端粒酶活性变化，发现8.0 mg/L As_2O_3作用于肝癌细胞株SMMC-7721和QGY-7703，72 h后可完全抑制其端粒酶活性;3.5 mg/L的As_2O_3连续静脉给药7 d后可完全抑制HepG2肝癌小鼠瘤体组织的端粒酶活性;而5-Fu对照组端粒酶活性未被抑制.可见,As_2O_3可能是一种良好的肝癌细胞端粒酶活性抑制剂.

2.6 As_2O_3抑制NF-κB的活化 核因子κB(nuclear factor of κB，NF-κB)是一种广泛存在的转录因子，几乎每个真核细胞中都存在NF-κB，不同的刺激信号激活该转录因子后，参与相应的基因表达的调控，如细胞的生长、分化、凋亡、炎症反应、肿瘤发生等.NF-κB是一种普遍存在的转录因子，已发现有150多种物质可以激活NF-κB，受NF-κB调控的基因多达150余种.最初研究发现NF-κB是由p50和p65两个亚单位组成的异二聚体，后来发现存在有NF-κB家族，由于NF-κB与Rel家族有较强的同源性，所以又把NF-κB与Rel合称为Rel/NF-κB家族，在哺乳类动物中已发现有Rel/NF-κB家族的5个成员:p65(RelA)、RelB、c-Rel、p50(NF-κB1)、p52(NF-κB2).在大多数细胞中，p50和p65是NF-κB活性形式的主要成分，所以通常所说的NF-κB或Rel/NF-κB即为p50/p65异源二聚体[46].As_2O_3可强烈抑制HTLV21和HTLV22(human T2cell leukemia virus type 1，2)细胞的IκBα磷酸化,使F-κB不能进入细胞核中，即抑制了NF-κB的活化，下调NF-κB依赖性的抗凋亡蛋白Bcl-2启动子的表达.使得Δψm下降及Cyto-c的释放，导致caspase-3激活，最终诱导了HTLV21和HTLV22这两种对大多数凋亡诱导剂有抵抗作用的细胞发生凋亡.可见,抑制NF-κB的活性也是砷剂诱导肿瘤细胞凋亡的机制之一[47].As_2O_3可以通过激活NF-κB选择性地抑制磷酸肌醇3激酶(PI3K)存活通路,抑制这种治疗的耐药性[48].也可以在非常低剂量下改变糖皮质激素受体(GR)介导的基因激活而不是糖皮质激素基因的表达,激活GR和GRBD的水平与砷存在明显的剂量反应关系,这种作用与AP-1和NF-κB介导的基因激活有关[49].

2.7 As_2O_3的其他调控途径 Ca^{2+}，NO是新的凋亡信号转导信使[50].As_2O_3可以提高胞质Ca^{2+}、NO浓度，胞质Ca^{2+}、NO浓度升高与细胞凋亡呈平行关系，且二者对As_2O_3呈时间、剂量依赖性.推测砷可能通过以下机制改变胞质Ca^{2+}浓度:(1)由于膜表面的Bcl-2相关蛋白具有阳离子选择性通道的功能，Bcl-2能在内质网、细胞核和线粒体水平影响Ca^{2+}的亚细胞分布.因而,砷等凋亡信号对Bcl-2的抑制作用使Ca^{2+}通道开放，胞质Ca^{2+}浓度升高;(2)细胞内活性氧(ROS)活性升高及砷剂直接作用于细胞内钙离子转位酶的巯基均可使胞内外Ca^{2+}平衡失控;(3)线粒体Δψm下降使Ca^{2+}吸收逆转，导致Ca^{2+}由线粒体转移至胞质.内质网及线粒体内Ca^{2+}耗竭可直接或通过加强线粒体内氧化应激而导致细胞凋亡,而且钙离子本身作为一种凋亡信号，可调节钙离子敏感的关键酶如蛋白激酶、磷脂酶、核酸内切酶及谷氨酰氨转移酶等诱导凋亡[51-52].肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor，TNF)是一种具有多种生物学效应的细胞因子，其生物学效应包括促进细胞生长、分化、凋亡及炎症诱发等.TNF的生物学效应都是通过细胞表面的两种TNF受体引发的，即Fas(CD95)/FasL(CD178)蛋白，他们主要分布于活化的T细胞表面，属于TNF家族，大多作用于线粒体上游阶段，由于NB4细胞缺乏CD95，因此过去认为，As_2O_3诱导凋亡效应不通过Fas/FasL通路.最近发现As_2O_3通过上调CD95/CD95L的表达、活化胱冬肽酶-8和胱冬肽酶-3将HL260和RL(一种B淋巴细胞系)细胞阻滞在G1期，并抑制其增生，诱导其凋亡.用抗CD95抗体处理细胞,能够阻止通过CD95/CD95L信号通路诱导的凋亡[53].Liao *et al*[54]研究AP-1、NF-κB和As_2O_3的关系时，发现低剂量的As_2O_3可上调AP-1和NF-κB的表达，通过介导Fas/FasL通路诱导凋亡.即通过诱发肿瘤坏死因子a介导的免疫应答促使细胞凋亡[55].

肿瘤的发生、发展是一个复杂的自然过程.近年来，随着人们对凋亡分子机制的深入研究，认识到促进肿瘤细胞凋亡是一条全新和有效的治疗途径.As_2O_3正是通过诱导细胞凋亡而起到抗肿瘤作用的,因此,诱导肿瘤细胞凋亡已成为研究热点.As_2O_3用于临床治疗白血病已经取得了很大的进展,但用于治疗肝癌,国内尚处于多中心协作的临床试验阶段，国外也正在进行实体瘤Ⅰ、Ⅱ期临床研究.As_2O_3诱导肿瘤细胞凋亡的某些具体机制尚未完全阐明.其可能的机制为:(1)As_2O_3选择性的与肝细胞的大分子蛋白或氨基酸分子中的巯基具有强的亲和性,能影响巯基酶的活性或直接与蛋白的巯基结合,使蛋白灭活,引起细胞代谢异常而发生细胞凋亡;(2)下调致癌基因表达或上调抑癌基因表达;(3)导致线粒体内膜电位Δψm破坏，使ATP合成异常,不能为细胞提供充足能量而引起凋亡;(4)抑制细胞缝隙连接间通讯(GJIC)功能，使细胞增殖能力减弱而凋亡;(5)As_2O_3体内代谢所形成的亚砷酸取代了磷酸而干扰细胞的能量代谢，致使细胞退行性变，发生凋亡;(6)干扰细胞正常的信号转导通路,导致细胞转录因子异常调节，诱导凋亡.

总之，As_2O_3既是一种剧毒物质，又是抑制肿瘤的良好药物，其确切的致/治癌双向作用机制并未完全阐明.如何正确的应用其有利的一面是研究关键所在.因此，在对As_2O_3的研究过程中，应运用现代分子生物学新技术，从新的角度探索其可能的作用机制，把As_2O_3更好地应用于临床.

3 参考文献

1 Yang LJ, Wang WL. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. *World J Gastroenterol* 2002;8:808-814

2 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokineinduced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468

3 Zhang G, Long M, Wu ZZ, Yu WQ. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:243-246

4 Sun ZJ, Pan CE, Liu HS, Wang GJ. Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:79-81

5 Pu YS, Hour TC, Chen J, Huang CY, Guan JY, Lu SH. Arsenic trioxide as a novel anticancer agent human transitional carcinoma:characterizing its apoptotic pathway. *Anticancer Drugs* 2002;13:293-298

6 Nemeti B, Gregus Z. Reduction of arsenate to arsenite in hepatic cytosol. *Toxicol Sci* 2002;70:4-12

7 Hossain K, Akhand AA, Kato M, Du J, Takeda K, Wu J, Takeuchi K, Liu W, Suzuki H, Nakashima I. Arsenite induces apoptosis of murine T lymphcytes through membrane raftlinked signaling for activation of c-Jun aminoterminal kinase. *J Immunol* 2000;165:4290-4297

8 Sakurai T, Ochiai M, Kojima C, Ohta T, Sakurai MH, Takada NO, Qu W, Waalkes MP, Fujiwara K. Role of glutathione in dimethy-larsinic acid-induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198:354-365

9 Yang CH, Kuo ML, Chen JC, Chen YC. Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells. *British J Cancer* 1999;81:796-799

10 Akao Y, Yamada H, Nakagawa Y. Arsenic_induced apoptosis in malignant cells in vitro. *Leuk Lymphoma* 2000;37:53-63

11 Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo grow inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 1999;93:268-277

12 Kito M, Akao Y, Ohishi N, Yagi K, Nozawa Y. Arsenic trioxide-induced apoptosis and its enhancement by buthionine sulfoximine in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:861-867

13 Messmer UK, Pfeilschifter J. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 2000;22:878-881

14 Yu Y, Jia P, Huang Y, Cai X, Chen G. Diamide and cyclosporin A enhanced arsenic trioxide-induced apoptosis in NB4 cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2002;23:254-257

15 Shen ZY, Shen J, Cai WJ, Hong C, Zheng MH. The alteration of itochondria in an early event of arsenic trioxide induced apoptosis in esophageal carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2000;5:155-158

16 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-446

17 Jiang XH, Wong BC, Yuen ST, Jiang SH, Cho CH, Lai KC, Lin MC, Kung HF, Lam SK. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cell through up-regulation of p53 and activation of caspase-3. *Int J Cancer* 2001;91:173-179

18 Qian J, Qin S, He Z. Arsenic trioxide in the treatment of advanced primary liver and gallbladder cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2001;23:487-489

19 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;12:253-257

20 Sturgill TW, Ray LB, Anderson NG, Erickson AK. Purification of mitogen-activated protein kinase from epidermal growth factor-treated 3T3-L1 fibroblasts. *Methods Enzymol* 1991;200:342-351

21 成军. 肿瘤相关基因. 第一版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999:96-100

22 Iwama K, Nakajo S, Aiuchi T, Nakaya K. Apoptosis induced by arsenic trioxide in leukemia U937 cells is dependent on activation of p38, inactivation of ERKand the Ca2+ dependent production of superoxide. *Int J Cancer* 2001;92:518-526

23 Kang SH, Song JH, Kang HK, Kang JH, Kim SJ, Kang HW, Lee YK, Park DB. Arsenic trioxide induced apoptosisis independent of stress responsive signaling pathways but sensitive toinhibition of inducible nitric oxide synthase in HepG2 cells. *ExpMol Med* 2003;35:83-90

24 Li JE, Wu WL, Wang ZY, Sun GL. Apoptotic effect of As2S2 on K562 cells and its mechanism. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:991-996

25 Cook JG, Bardwell L, Thorner J. Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the S. cerevisiae filamentous-growth signalling pathway. *Nature* 1997;390:85-88

26 方福德, 杨焕明. 分子生物学前沿技术. 第一版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:54-56

27 Yin XL, Chen S, Yan J, Hu Y, Gu JX. Identification of interaction between MEK2 and A-Raf-1. *Biochim Biophys Acta* 2002;1589:71-76

28 俞丽芬, 吴云林. 信号传导及转录活化因子STAT与消化系统疾病的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:1196-1201

29 Cheng HY, Li P, David M, Smithgall TE, Feng L, Lieberman MW. Arsenic inhibition of the JAK-STAT pathway. *Oncogene* 2004;23:3603-3612

30 邓友平, 林晨, 梁萧. As2O3诱导人宫颈癌Hela细胞凋亡及Bcl-2保护作用的机制研究. 中国科学(C辑) 1999;29:335-338

31 Chen Z, Wang ZY, Chen SJ. Acute promyelocytie lerkemia: cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis. *Pharmacol Ther* 1997;76:141-149

32 陈洪, 秦叔逵, 陈惠英. As2O3诱导人肝癌细胞株SMMC-7721凋亡的实验研究. 肿瘤防治研究 1998;25:336-338

33 秦叔逵, 陈洪, 陈惠英. As2O3诱导人肝癌细胞株凋亡的初步研究. 临床肿瘤学杂志 1998;3:40

34 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英. As2O3对人肝癌细胞株选择性抑制作用的实验研究. 临床肿瘤学杂志 1999;4:39-41

35 陈洪, 秦叔逵, 潘麒声. As2O3抗肝癌作用的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:27-29

36 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英. As2O3选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:70-73

37 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. 世界华人消化杂志 2000;8:532-535

38 陈惠英, 王为, 秦叔逵. As2O3对人肝癌细胞株VEGF表达的影响. 临床肿瘤学杂志 2000;5:2

39 Huang SC, Lee TC. Arsenic inhibits mitotic division and perturbs spinale dynamias in Helas 3 cells. *Carcinogenesis* 1998;19:889-896

40 Li YM, Broome JD. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Res* 1999;59:776-780

41 Park WH, Seol JG, Kim ES, Hyun JM, Jung CW, Lee CC, Kim BK, Lee YY. Arsenic trioxide mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin_dependent kinase inhibitor p21 and apoptosis. *Cancer Res* 2000;60:3065-3071

42 Seol JG, Park WH, Kim ES, Jung CW, Hyun JM, Kim BK, Lee YY. Effect of arsenic trioxide on cell cycle arrest in head and neck cancer cell line PCI-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:400-404

43 Hytiroglou P, Kotoula V, Thung SN, Tsokos M, Fiel MI, Papadimitriou CS. Telomeruse activity in precan-cerous hepatic nodules. *Cancer* 1998;82:18-31
44 Nakashio R, Kitamoto M, Tahara H, Nakanishi T, Ide T, Kajiyama G. Significance of telomerase activit y in t he diagosis of small differenttiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74:141-147
45 楼芳. 砷制剂治疗实体瘤的研究进展. 临床肿瘤学杂志 2000;5:69-73
46 Mahieux R, Pise-Masison C, Gessain A, Brady JN, Olivier R, Perret E, Misteli T, Nicot C. Arsenic trioxide induces apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1-and type 2-infected cells by a caspase-3-dependent mechanism involving Bcl-2 cleavage. *Blood* 2001;98:3762-3769
47 巨立中, 成军, 钟彦伟. 核因子κB的信号转导机制及研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12:948-950
48 Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL, Fala F, Billi AM, Manzoli L, Cocco L, Martelli AM. Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *J Cell Physiol* 2005;202:623-634
49 Bodwell JE, Kingsley LA, Hamilton JW. Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR-mediated gene repression:complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. *Chem Res Toxicol* 2004;17:1064-1076
50 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
51 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Zeng Y. Mitochondria, calcium and nitricoxide in the apoptotic pathway of esophageal carcinoma cells induced by As2O3. *Int J Mol* 2002;9:385-390
52 Iwama K, Nakajo S, Aiuchi T, Nakaya K. Apoptosis induced by arsenic trioxide in leukemia U937 cells is dependent on activation of p38, inactivation of ERKand the Ca2+ dependent production of superoxide. *Int J Cancer* 2001;92:518-526
53 Zhu J, Okumura H, Ohtake S, Nakamura S, Nakao S. Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemiaPlymphoma cell lines via the CD95/CD95L system. *Oncol Rep* 2003;10:705-709
54 Liao WT, Chang KL, Yu CL, Chen GS, Chang LW, Yu HS. Arsenic induces human keratino-cyte apoptosis by the FAS/FAS ligand pathway, which correlates with alterations in nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activity. *J Invest Dermatol* 2004;122:125-129
55 Ivanov VN, Hei TK. Arsenite sensitizes human melanomas to apoptosis via tumor necrosis factor alpha-mediated pathway. *J Biol Chem* 2004;279:22747-22758

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第六届全国胃肠动力学术研讨会征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组定于2005-11上旬在武汉召开全国第六届胃肠动力学术会议，届时将邀请国内外胃肠动力学专家就本学科的基础和临床研究进展作专题演讲，并进行广泛的学术交流. 现将征文有关事项通知如下:

1 征文内容

(1)胃肠动力障碍性疾病的基础和临床研究; (2)胃肠功能性疾病的基础和临床研究; (3)胃肠神经系统功能与胃肠动力学基础研究; (4) 胃肠动力学检测方法的临床应用.

2 征文要求

(1)论文摘要不得超过800字，电脑打印(附软盘)，格式为: 题目，作者，单位，邮编，目的，方法，结果和结论，附联系电话及E-mail地址; (2)已在全国公开发表的论文不予受理.

3 投稿地址

武汉市解放大道1277号协和医院消化科 刘劲松收(邮编: 430022)，电话: 027-85726381; 2 武汉市丁字桥路100号湖北省医学会林勇 胡丽萍收(邮编: 430064)，电话: 027-87893467.

4 截稿日期

2005-07-30

5 会议具体时间地点

另行通知. 会议信息，论文投搞，表格下载请登陆网站:http://hubeiyiyuan.go.nease.net.

中华医学会消化病学分会

消化病学分会胃肠动力学组

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1744-1746
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

丁酸钠抗肿瘤作用的新进展

崔路佳,高善玲,裴凤华

崔路佳,高善玲,裴凤华,哈尔滨医科大学附属第二医院消化科
黑龙江省哈尔滨市 150086
省教育厅科学技术研究项目计划,No. 10541142
通讯作者:裴凤华,150086,黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第二医院消化科.
电话:0451-86605143
收稿日期:2005-03-31 接受日期:2005-04-09

摘要

丁酸钠作为一种去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,主要通过改变组蛋白的乙酰化程度来改变染色质结构,参与多种基因的表达;可抑制多种肿瘤细胞生长,诱导细胞成熟分化,诱导癌细胞发生凋亡,达到治疗肿瘤的目的.因此探索丁酸钠抗肿瘤的作用机制能够为肿瘤的治疗提供新的思路.

崔路佳,高善玲,裴凤华.丁酸钠抗肿瘤作用的新进展.世界华人消化杂志 2005;13(14):1744-1746
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1744.asp

0 引言

丁酸钠(sodiumbutyrate,NaBT)是膳食纤维在肠道中酵解后产生的一种无毒的四碳短链脂肪酸,丁酸及其稳定的衍生物能够影响多种生理过程[1].最近的研究证明,丁酸钠可以诱导结肠癌[2-3]、食管癌[4]、肝癌[5]、骨髓瘤[6]等多种肿瘤细胞凋亡,尤其在消化系统肿瘤的诱导分化和凋亡疗法中成为研究的热点之一.丁酸钠对肿瘤细胞的作用机制较复杂,现就主要作用机制作一综述.

1 组蛋白乙酰化/去乙酰化与肿瘤的关系

1.1 组蛋白乙酰化/去乙酰化在基因转录调控中的作用 基因有序的转录调控是机体细胞维持正常功能的前提,如果基因转录调控功能紊乱,细胞可能发生癌变.核心组蛋白的乙酰化和去乙酰化与基因调控密切相关,负责组蛋白乙酰化和去乙酰化的是一对功能相互拮抗的蛋白酶-组蛋白乙酰化转移酶(HAT)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC).HAT乙酰化组蛋白氨基末端(从核小体向外伸展的氨基末端是进行转录后乙酰化修饰的部位),除与DNA结合外,还与非组蛋白的调控蛋白和多蛋白复合物间相互作用,这种作用使氨基末端形成特定的二级结构,对核小体排列及染色质浓缩有重要作用.乙酰化修饰通过瓦解氨基末端的二级结构并中和组蛋白所带的正电荷以及疏水的乙酰基团产生的空间阻力,降低组蛋白与DNA的亲和力,舒展核小体结构,从而激活基因转录;而HDAC的功能相反,抑制基因转录[7].特定基因的表达状态取决于被转录因子定位在靶基因启动子上的HAT和 HDAC间的动态平衡.HDAC作为调控基因的关键蛋白酶,其功能异常被证实与肿瘤的发生发展有直接关系[8].因此,通过对HDAC功能的抑制,可以达到治疗肿瘤的目的[9].

1.2 HAT和HDAC对肿瘤治疗的启迪 高等生物体内最早发现的HAT包括CBP/p300、P/CAF、TAF Ⅱ 250等.编码具有HAT内源活性的CBP基因的突变与肿瘤的发生密切相关,CBP基因的缺失和突变在大肠癌、胃癌患者中发生率较高.病毒癌蛋白(E1A)可与CBP/p300结合,揭示了HAT活性与癌症之间的关系.E1A 与CBP/p300结合后破坏了CBP/p300与P/CAF间的相互作用.而E1A对细胞的转化需要E1A和CBP/p300的相互作用,这一相互作用可能使CBP/p300失活[10].

组蛋白乙酰基化是由HAT和HDAC共同调节的,高乙酰基化的染色质与转录激活基因有关,低乙酰基化的染色质则与转录抑制基因有关.抑制HDAC的活性能够抑制基因的转录,促进细胞分化.在白血病中,几种转录因子由于异常招募HDAC而抑制特定基因的表达.例如,来源于急性粒细胞白血病(APL)患者的细胞系中由于染色体易位产生的融合癌基因产物通过招募HDAC而抑制转录.已经报道了APL中4种基因与视黄酸受体α(RARα)基因相融合产生融合蛋白,这4种基因分别是前髓细胞基因(PML)、卵核质蛋白基因(NPM)、前髓细胞白血病锌指基因(PLZF)和核有丝分裂器基因(NuMA).在ALP中RARα的融合蛋白招募HDAC,从而导致组蛋白低乙酰化,结果在癌细胞中出现转录异常[11].

1.3 丁酸钠在组蛋白去乙酰化方面的作用机制 丁酸钠是一种组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,属非细胞毒类抗癌化合物.已知丁酸钠会引起细胞核内多种变化,包括组蛋白的超乙酰化、DNA的甲基化及非组蛋白的修饰.其中以组蛋白的超乙酰化最为重要,与基因表达和抑制细胞生长有关.组蛋白的作用是将DNA包装成核小体,而组蛋白超乙酰化则会导致DNA和组蛋白分离,使转录因子激活特异基因[12].丁酸钠使组蛋白超乙酰化后,激活一些转录因子,使转录因子结合并激活某些基因,最终可抑制细胞生长,又诱导细胞分化.最近哈佛大学医学院的一个研究小组的实验结果表明,丁酸钠主要通过两个途径抑制人大肠癌细胞生长,其一是通过组蛋白的超乙酰化,诱导p53非依赖性$p21^{WAF1}$的表达[13],而$p21^{WAF1}$是细胞周期素依赖的蛋白激酶的抑制剂,丁酸钠可使$p21^{WAF1}$的表达水平升高[14];其二是通过表皮生长因子(EGF)反应途径.

组蛋白去乙酰化与DNA的甲基化对基因转录均有抑制作用.近年研究发现,二者对基因表达的调控作用有密切联系.甲基化可诱导局部组蛋白去乙酰化,使染色质乙酰化水平降低,且甲基化的序列可募集甲基CpG结合蛋白(MeCP)与组蛋白去乙酰化酶复合物(MeCP-HDAC)发挥对基因表达的抑制作用.MeCP可与HDAC形成复合物的研究报道提示,HDAC参与对p16基因的抑制可能是通过与高甲基化有关的途径,即去甲基化改变基因局部的甲基化状态,影响了MeCP在启动子区的结合,丁酸钠作用于MeCP-HDAC复合物,抑制复合物活性,从而使基因恢复表达[15].HDAC抑制剂对去甲基化制剂的这种协同作用提示HDAC参与了甲基化抑制p16基因表达的过程.可见,丁酸钠可通过增加组蛋白乙酰化水平,诱导一些基因的转录活性.

组蛋白乙酰化可通过改变染色体结构参与基因表达的调控,抑制肿瘤细胞增殖,诱导分化[16].丁酸钠是一种细胞分化诱导剂,而丁酸能够诱导人白血病细胞株HL-60(早幼粒阶段)走向成熟阶段分化.肿瘤细胞在丁酸钠诱导下发生分化,分化过程中可引起细胞微细胞结构、蛋白质及核酸等变化,有的出现类似正常细胞的表型,有的甚至恢复了正常细胞的某些功能.李丰*et al*[17]应用丁酸钠对低分化人大肠癌细胞Clone-A进行诱导分化,结果显示,电镜下,细胞表面由原来比较光滑变成表面丝状突起及囊泡明显增多.多数细胞内质网数量、密度明显增加,内质网形态变长,结构趋于正常.小剂量丁酸钠诱导后细胞形态明显向正常细胞分化.

2 丁酸钠诱导肿瘤细胞凋亡

大量研究表明,肿瘤不仅是细胞增殖和分化异常的疾病,也是细胞凋亡异常的疾病,多种肿瘤的发生与细胞凋亡障碍有关[18].已有研究证实丁酸钠能抑制多种体外培养的肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞衰老和凋亡,被认为是一种基因表达的调控剂.流行病学研究发现高纤维膳食可降低致癌剂所诱发的胃肠道肿瘤发生.膳食纤维进入结肠后经细菌发酵产生短链脂肪酸,包括丁酸、乙酸和丙酸.丁酸不仅是结肠上皮细胞主要的能量来源,而且许多体内和体外试验证实丁酸钠能促进结肠癌细胞的凋亡,对正常肠上皮细胞则具有促进增生,抑制凋亡的保护作用[19].结直肠癌的发生与肠上皮细胞的增殖与凋亡失衡有关.邵荣江*et al*[20]观察丁酸钠对体外培养的人肝癌细胞SMMC-7721的促凋亡作用.采用流式细胞仪检测发现在G_0/G_1峰前有一亚二倍体凋亡峰,该峰随丁酸钠作用时间和剂量增加而增高;DNA电泳进一步证实细胞DNA降解为180-200 bp的寡核苷酸片段,形成典型梯状电泳带;透射电镜从形态学角度证实了丁酸钠处理后的细胞发生了凋亡.布立民*et al*[21]细胞毒性试验证实,单独应用丁酸钠作用于大肠癌细胞HCT-8,丁酸钠各组随着剂量的增加,细胞抑制程度逐渐明显,电镜下可见细胞核固缩、染色质浓缩等典型凋亡表现,认为丁酸钠诱导凋亡的能力可能是高纤维饮食能预防大肠癌发生的机制之一.刘薇*et al*[22]对丁酸钠作用下的体外培养卵巢癌细胞3AO的凋亡相关指标进行了检测,其中形态学变化是判断凋亡有无发生的基础,阶梯形DNA降解模式是鉴定凋亡的特异性生化指标.研究发现,细胞经一定浓度的丁酸钠作用一定时间,光镜下可见核浓缩等形态学改变,琼脂糖凝胶电泳中可见典型的DNA梯形条带,提示丁酸钠通过诱导3AO细胞凋亡影响其生长.对于不同的细胞系,丁酸钠诱导其凋亡的机制并不完全相同,相关研究提示丁酸钠有可能作用于细胞周期检查点,尤其是G_1检查点,抑制细胞周期通过该检查点进入S期.肿瘤发生过程中,细胞周期检查点的调节发生改变,特别是G_1检查点失控,导致肿瘤不断进行分裂增殖[23].丁酸钠诱导细胞凋亡与细胞周期S期和G_1期的改变密切相关,丁酸钠使细胞周期阻滞于G_1期,不能顺利进入S期,从而抑制细胞的增殖.G_1期阻滞可能是丁酸钠诱导凋亡的机制之一,但细胞周期改变是否是一个独立事件,尚需进一步研究.通过灭活细胞周期检查点,可增强细胞凋亡敏感性,达到调节肿瘤治疗敏感性的目的[24-25].

细胞凋亡径路大致有三条:(1)死亡受体通路;(2)线粒体通路;(3)内质网通路.Nakagawa *et al*[26]认为,丁酸钠引起细胞凋亡的机制是丁酸作用于内质网,由半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspases)级联活化所致.内质网在蛋白质脂类合成、物质运输等方面均起着重要作用,在细胞内膜系统中占有中心地位.Caspase-12存在于内质网,丁酸钠可引起内质网功能失调,激活Caspase-12,进而剪切Caspase-3,引发细胞凋亡.Desagher *et al*[27]发现,Caspase-3活化可能与抑癌基因Fas的过度表达有关,Fas配基(FasL)与Fas结合后与胞质中的Fas相关死亡结构域蛋白(FADD)形成三聚体,FasL-Fas-FADD复合物激活Caspase-8;p53通过上调bax的表达,促进线粒体细胞色素C释放,激活Caspase-9;被激活的Caspase-8、Caspase-9使Caspase-3酶原水解形成具有分解蛋白质活性的Caspase-3,可导致多种细胞死亡,又称为“凋亡蛋白酶”,故Caspase-3的活化在丁酸钠诱导的细胞凋亡中起重要作用.

线粒体功能改变在细胞凋亡的发生中起关键性作用,其证据是:抑制线粒体的三羧酸循环功能即可引起细胞凋亡.线粒体跨膜电位(Δψm)是三羧酸循环产生的能量传递给电子,电子传递过程中释放能量,将质子从基质泵入膜间腔而形成.Δψm是衡量线粒体功能是否正常的一个重要指标,他的下降是凋亡的一个早期特征.刘薇*et al*在用丁酸钠诱导3AO细胞凋亡的过程中,Δψm下降,推测丁酸钠作用使线粒体膜通透性增加,从而导致Δψm降低,促凋亡物质释放,当作用达一定时间,Δψm崩解,活化链反应,细胞便进入不可逆的凋亡过程.线粒体通路和内质网通路既各自独立,又相互联系,Bcl-2家族在各通

路的调控中发挥重要作用，其中Bcl-2/Bax是Bcl-2家族两个具有代表性的重要成员，分布于线粒体和内质网膜上，Foyouzi-Youssefi *et al*[28]研究表明，Bcl-2过表达可使两条通路诱导的凋亡受到抑制；而Bax过表达则可导致Δψm丢失，Bcl-2的过表达不能阻止Bax介导的凋亡，从而促进线粒体通路诱导的凋亡. 研究显示丁酸钠作用后，Bcl-2表达降低，Bax表达升高，他们参与了细胞凋亡的调节.

总之，组蛋白乙酰化/去乙酰化与肿瘤密切相关，丁酸钠作为组蛋白去乙酰化酶抑制剂之一，已广泛应用于肿瘤研究中，对丁酸钠抗肿瘤作用机制的进一步研究将为肿瘤的防治提供新的思路.

3 参考文献

1 狄茜, 李扬, 赵雪俭, 宫城妙子. 丁酸钠对前列腺癌PC-3M细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用. 吉林大学学报(医学版) 2004;30:710-712

2 王朝晖, 张雪梅, 战敏. 转化生长因子β1和丁酸钠对结肠癌细胞UPA和PAI-1调节作用的影响. 癌症 2001;20:660-661

3 Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* 2002;132:1012-1017

4 沈忠英, 陈铭华, 蔡维佳, 沈健, 陈炯玉, 洪超群, 曾毅. 丁酸钠对食管永生化上皮细胞增殖、分化和凋亡的作用. 中华病理学杂志 2001;30:121-124

5 黄炜, 黄济群, 彭安, 张东方. BEL-7402人肝癌细胞分化指标的研究. 肿瘤防治研究 2001;28:17-20

6 杜红玲, 戚豫, 石永进, 卜定方, 武淑兰. 脱乙酰化酶抑制剂与去甲基化制剂联合诱导U266细胞凋亡和p16基因重新表达. 癌症 2002;21:1057-1061

7 殷红, 陈子兴. 组蛋白去乙酰化异常与恶性肿瘤. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2003;23:238-240

8 汤屹, 刘文勉, 周剑峰. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂治疗肿瘤的机制和临床应用研究进展. 中华血液学杂志 2002;23:329-331

9 赵洁, 苏琦. 组蛋白乙酰化/去乙酰化与白血病的研究进展. 肿瘤学杂志 2004;10:436-438

10 罗惠霞, 王玉炯. 组蛋白乙酰化/去乙酰化在真核基因转录调控中的作用. 中国生物工程杂志 2004;24:19-21

11 刘春艳, 孙海晶, 陆军, 黄百渠. 组蛋白乙酰化与癌症. 生物化学与生物物理进展 2003;30:19-22

12 Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M, Komatsu Y, Nishino N, Horinouchi S. Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;48:20-26

13 Huang L, Sowa Y, Sakai T, Pardee AB. Activation of the p21^{WAF1}/CIP1 promoter independent of p53 by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) through the Splsites. *Oncogene* 2000;19:5712-5719

14 李凡, 罗和生, 丁一娟, 李曦. 丁酸钠对结肠癌HT-29细胞的增殖抑制作用及iNOS表达的影响. 癌症 2004;23:416-420

15 Magdinier F, Wolffe AP. Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD 2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4990-4995

16 Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, Rifkind R, Marks PA, Richon VM. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:8492-8497

17 李丰, 吴一迪, 王芸庆, 宋今丹. 丁酸钠诱导的人大肠癌细胞成熟分化中的表型变化. 中国医科大学学报 2000;29:404-407

18 高虎, 张方信, 梁君蓉. 药物诱导细胞凋亡与胃癌治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:795-796

19 罗和生, 李瑾. 丁酸钠和阿司匹林对结肠癌细胞小肠三叶肽表达的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:465-467

20 邵荣江, 艾中立, 张力, 王璐, 刘汉燕, 王波涌. 丁酸钠诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡作用的评价. 数理医药学杂志 2004;17:213-215

21 布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红. 丁酸钠联合穿琥宁对大肠癌细胞HCT-8增生的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1193-1196

22 刘薇, 汤春生, 荣风年. 丁酸钠诱导卵巢癌3AO细胞凋亡的研究. 肿瘤防治研究 2004;31:189-191

23 付士波, 鞠桂芝, 杨英. 蝎毒对B16黑色素瘤细胞生长的抑制作用. 吉林大学学报(医学版) 2004;30:178-180

24 Weidle UH, Grossmann A. Inhibition of histone deacetylases: a new strategy to target epigenetic modifications for anticancer treatment. *Anticancer Res* 2000;20:1471-1485

25 周剑峰, 汤屹, 刘文勉, 孙汉英, 胡俊波, 龚建平. 丁酸钠增强U937细胞凋亡敏感性的分子机制研究. 中华肿瘤杂志 2002;24:320-322

26 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403:98-103

27 Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the contral control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000;10:369-377

28 Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N, Krause KH. Bcl-2 decreases the free Ca^{++} concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5723-5728

编辑 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1747-1749
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

聚乙二醇α-干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展

周 平,谢仁江

周平,空军总医院感染内科 北京市 100036
谢仁江,湖南城步县人民医院 湖南省城步县 422500
通讯作者:周平,100036,北京市,空军总医院感染内科. zhoup428@sina.com
电话:010-66928472
收稿日期:2005-04-15 接受日期:2005-05-14

摘要

在慢性乙型病毒性肝炎的抗病毒治疗中,α-干扰素占有重要地位.近几年来,随着聚乙二醇α-干扰素(PEG-IFNα)的研制成功,使慢性乙肝的治疗效果有了进一步的提高.本文就PEG-IFNα的临床种类和药理学特点及其治疗HBeAg阴性和HBeAg阳性慢性乙型病毒性肝炎的进展情况进行了综述.

周平,谢仁江.聚乙二醇α-干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展.世界华人消化杂志 2005;13(14):1747-1749
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1747.asp

0 引言

病毒性肝炎是临床上最常见的疾病之一,严重威胁人们的身体健康.尤其是慢性乙型病毒性肝炎(慢性乙肝)已成为我国和当今世界一个较为严重的公众健康问题.目前全球大约有3.5亿慢性乙肝病毒(HBV)感染者,其中约75%分布在亚太地区.我国HBV感染率约为60%,人群中约有10%为慢性HBV携带者.对于慢性乙肝的治疗,虽然目前临床上尚无特效的治疗方法,但积极有效的抗病毒治疗有助于患者肝脏功能的改善、病情的稳定,可以减缓或终止肝硬化的发生,降低肝癌的发生率,提高患者的生活质量.在慢性乙肝的抗病毒治疗中,α-干扰素占有重要地位.特别是近几年来,随着聚乙二醇α-干扰素(PEG-IFNα)的研制成功,使慢性乙肝的治疗效果有了进一步的提高.本文就PEG-IFNα治疗慢性乙肝的进展情况进行综述.

1 PEG-IFNα的种类和特点

目前市场上已经获得美国FDA和欧盟批准的PEG-IFNα产品有2种,一是由瑞士罗氏公司研制生产的Pegasys(商品名:派罗欣,PEG-IFNα-2a,),其分子质量为40 ku,由于PEG为分枝状,可使患者体内干扰素有效血药浓度长达168 h,达到持续抑制病毒的目的,同时分枝状的空间结构减少了干扰素的抗原性,降低了中和抗体的产生,主要分布于肝脏,直接作用于病毒复制的靶器官,分布容积低,因此,无需根据体重调节剂量,使用方便.使用剂量为每次180 μg,每周1次.二是由美国先灵葆雅公司研制生产的Peg-Intron(商品名:佩乐能,PEG-IFNα-2b),其分子质量为12 ku,PEG为直链,使用剂量需按体重计算,每千克体质量0.5-1.0 μg,每周注射1次.由于前者的相对分子质量明显大于后者,因此其半衰期较长,注射1 wk内血药浓度更稳定.但从临床疗效和不良反应发生率看,两种PEG-IFNα比较接近.最近有学者[1]对这两种PEG-IFNα治疗基因型1丙型肝炎病毒感染者的早期病毒学反应进行了一对一的研究.该研究阶段性分析结果发现,在治疗慢性丙肝基因1型患者时,两种PEG-IFNα的药代动力学(PK)和病毒清除能力存在差异.在治疗的前4 wk,派罗欣血清谷值可持续处于高水平;治疗第8 wk,派罗欣组平均HCV RNA水平(lg10)降低3.22±0.236,佩乐能组降低2.65±0.279.提示在治疗慢性丙肝基因1型患者时,派罗欣早期病毒清除能力优于佩乐能.

与普通干扰素相比,PEG-IFNα具有下列特点[2]:(1)可经过肾脏和肝脏清除,肝脏清除在其中起重要作用,支链聚乙二醇的作用使肾脏清除率较普通干扰素明显下降,使得其在肝脏的暴露时间延长,能够更好地发挥其抗病毒活性.因肾脏不是主要代谢途径,故可以适用于轻、中度(肌酐清除率> 20 mL/min)肾功能不全患者.(2)体内吸收速度相当快,药物在体内的循环时间明显延长,而且在患者体内基本保持一种非常稳定的血药浓度,可持续7 d,在这7 d里,血药浓度基本上是恒定的,这样其对病毒所产生的抑制作用当然也就是持续性而非间歇性的.(3)每周给药1 次,5-8 wk后可达稳态血药浓度,在稳态时,最大血药浓度(C_{max})和最小血药浓度(C_{min})之间仅有1.5-2.0倍的差别,此后PEG-IFNα不再积蓄.(4)干扰素的聚乙二醇化还可以降低免疫原性,当干扰素分子聚乙二醇化以后,聚乙二醇分子就在干扰素分子外面形成一个分子屏障,保护其免受酶的分解,降低其免疫原性,也就是说其诱导产生干扰素抗体的能力也随着干扰素的聚乙二醇化有所下降.

2 PEG-IFNα治疗HBeAg(-)/HBV DNA(+)慢性乙肝

Marcellin *et al*[3]报道:PEG-IFNα-2a治疗HBeAg(-)/HBV DNA(+)慢性乙肝临床疗效明显,在改善肝脏功能,ALT复常率和血清HBV DNA阴转等方面疗效优于拉米夫定.该项研究为随机、部分双盲、多国多中心试验.共有537例HBeAg(-)/HBV DNA(+)慢性乙肝患者被纳入临床研究中.分为PEG-IFNα-2a+安慰剂(177例);PEG-IFNα-2a+拉米夫定(179例)和拉米夫定(181例)3组,分别接受(1)PEG-IFNα-2a 180 μg,每周1次 +安慰剂,每

天1次;(2)PEG-IFNα-2a 180 μg，每周1次+拉米夫定100 mg，每天1次;(3)拉米夫定 100 mg，每天1次治疗.共治疗48 wk，随访24 wk.结果显示，PEG-IFNα-2a+安慰剂组和PEG-IFNα-2a+拉米夫定组在ALT复常率和血清HBV DNA<2.0×10^7拷贝/L的比率(59%和43%;60%和44%)明显高于拉米夫定组(44%，P = 0.004和P = 0.003;29%，P = 0.007和P = 0.003).血清HBV DNA持续<4×10^5拷贝/L的比率，在PEG-IFNα-2a+安慰剂组和PEG-IFNα-2a+拉米夫定组分别为19%和20%，亦明显高于拉米夫定组(7%，P<0.001);在应用PEG-IFNα-2a治疗的患者中，有12例患者HBsAg转阴，而拉米夫定组无1例HBsAg转阴.但PEG-IFNα-2a+安慰剂和PEG-IFNα-2a+拉米夫定两组间无显著差异.

α-干扰素在治疗HBeAg阳性慢性乙肝期间或治疗后不久，出现ALT显著升高，这与HBeAg/HBeAb血清转换和乙肝病毒抑制增加相关，但对HBeAg阴性慢性乙肝，ALT升高与病毒应答的关系尚未确定.Piratvsuth *et al*[4]首次报告:HBeAg阴性慢性乙肝患者接受干扰素抗病毒治疗期间，ALT显著升高与病毒应答相关.该研究为随机、部分双盲、多国多中心试验，纳入537例HBeAg阴性慢性乙肝患者，患者接受以下3种治疗方法之一:(1)PEG-IFNα-2a 180 μg，每周1次+安慰剂，每天1次;(2)PEG-IFNα-2a 180 μg，每周1次+拉米夫定100 mg，每日1次;(3)拉米夫定100 mg，每日1次.共治疗48 wk，随访24 wk.复合主要终点为:(1)ALT复常;(2)24 wk随访结束后(72 wk)HBV DNA<2.0×10^7拷贝/L.ALT显著升高为ALT峰值>正常值上限10倍;ALT中度升高为ALT峰值在5-10倍正常值上限之间.结果显示，治疗期间，单用PEG-IFNα-2a组ALT显著升高发生率明显高于PEG-IFNα-2a联合拉米夫定组及单用拉米夫定组(P = 0.007和P = 0.038).随访期间，单用拉米夫定组或联用PEG-IFNα-2a组ALT显著升高较PEG-IFNα-2a组更常见(P = 0.033和P = 0.021);ALT中等升高发生率也可见类似的趋势.总之，治疗期间ALT显著升高与72 wk随访结束时ALT复常显著相关(P = 0.011)，但ALT中度升高与随访结束时ALT复常无相关性.研究者指出，能获得持续病毒学应答的患者在治疗过程中，ALT显著升高更常见.该研究提示，PEG-IFNα-2a单用或联合拉米夫定以及单用拉米夫定治疗HBeAg阴性慢性乙肝患者，ALT显著升高可能有益.

3 PEG-IFNα治疗HBeAg(+)/HBV DNA(+)慢性乙肝

在最早的一项应用PEG-IFNα-2a治疗HBeAg(+)/HBV DNA(+)慢性乙肝的临床研究中，Cooksley *et al*[5]对194例既往未曾接受过α-干扰素治疗的患者，分别随机予以PEG-IFNα-2a 90、180、270 μg，每周一次、普通α-2a干扰素 450万U，每周3次，治疗24 wk，随访24 wk.结果发现，予以PEG-IFNα-2a 90、180、270 μg，每周一次治疗的患者中，HBeAg阴转率分别为37%、35%和29%;接受普通α-2a干扰素治疗的患者为25%.予以PEG-IFNα-2a治疗的患者持续应答(HBsAg(-)、HBV DNA(-)和ALT正常)的比率是接受普通α-2a干扰素治疗患者的两倍(24% *vs* 12%，P = 0.036).4组患者在应用过程中，不良反应的发生率和严重程度大致相同，无显著差异.作者认为PEG-IFNα-2a治疗HBeAg(+)/HBV DNA(+)慢性乙肝，在HBsAg(-)、HBV DNA(-)和ALT复常等方面疗效优于普通α-2a干扰素.

最近 Lau *et al*[6]报道:应用派罗欣单一治疗、与拉米夫定联合治疗及拉米夫定单一治疗HBeAg阳性的慢性乙肝患者的疗效和安全性结果.该项大规模多中心研究结果显示，HBeAg阳性慢性乙肝患者采用派罗欣单一治疗或联合治疗，治疗后应答率显著高于拉米夫定单一治疗;联合治疗的应答率并不高于派罗欣单一治疗;派罗欣治疗未出现非预期不良事件，联合拉米夫定未明显改变派罗欣的安全性.该研究共纳入814例HBeAg阳性慢性乙肝患者，所有患者按1∶1∶1接受下列治疗:派罗欣180 μg、每周1次+安慰剂、每天1次;派罗欣180 μg、每周1次+拉米夫定100 mg，每天1次;拉米夫定100 mg，每天1次.患者接受48 wk治疗，并在随后的24 wk无治疗随访期结束后接受评价.联合主要终点为HBeAg血清转化或HBV DNA<10^8拷贝/L，次要终点为HBeAg消失和ALT恢复正常.全部治疗组患者的基线特征具有可比性.总体人群主要为亚洲人(85-87%).随访24 wk(第72 wk)后，派罗欣单一治疗组或联合治疗组中达到主要终点和次要终点的患者比例显著高于拉米夫定单一治疗组(表1).第72 wk时，派罗欣(+拉米夫定)治疗组16例患者出现HBsAg血清转化，而拉米夫定单一治疗组没有患者出现HBsAg血清转化.全部治疗组中，因安全性原因停止治疗的比例都很低(≤3%).大多数不良事件轻微，所有治疗组的严重不良事件发生率都很低(2-6%).派罗欣单一治疗组与联合治疗组的不良事件相似.这一结果与上述在HBeAg阴性慢性乙肝患者中进行的研究结果类似.作者认为基于派罗欣的安全性和有效性研究结果，应将派罗欣作为HBeAg阳性的慢性乙肝患者的一线治疗方案.

对于慢性乙肝，抗病毒治疗完全应答的标志应为HBsAg/HBsAb血清转换.经拉米夫定治疗的患者，很少出现HBsAg/HBsAb血清转换，阿德福韦治疗1 a后，约1.6%的患者出现HBsAg/HBsAb血清转换.PEG-IFNα除有抗病毒作用外，还具有免疫调节作用，可能参与诱导HBeAg阴转及HBsAb出现.在抗病毒治疗中，HBV基因型可影响PEG-IFNα的临床效果.Janssen *et al*[7]报告:慢性乙肝患者单用PEG-IFNα-2b及其联用拉米夫定，对HBsAg/HBsAb血清转换率作用相同.HBV基因型对HBsAg/HBsAb血清转换可产生影响.该项研究为全球多中心、随机、双盲、对照试验，纳入266例HBeAg阳性慢乙肝患者，接受PEG-IFNα-2b 100 μg每周1次，联合拉米

表1 3组患者主要终点和次要终点比

	派罗欣+安慰剂(271例)	派罗欣+拉米夫定(271例)	拉米夫定(272例)
联合主要终点			
HBeAg血清转化	32%(P<0.001)	27%(P=0.023)	19%
HBV DNA<10^8拷贝/L	32%(P=0.012)	34%(P=0.003)	22%
次要终点			
HBeAg消失	34%(P<0.001)	28%(P=0.043)	21%
ALT恢复正常	41%(P=0.002)	39%(P=0.006)	28%

夫定100 mg每天1次或安慰剂治疗，共治疗52 wk.在治疗32 wk后，PEG-IFNα-2b剂量减半.停药后随访26 wk.结果显示，在随访结束前，共有85例(36%)患者HBeAg阴转.HBeAg阴转患者中，A基因型(90例)占47%，B基因型(23例)占44%，C基因型(39例)占28%，D基因型(103例)占25%(P<0.001，A型 *vs* D型和B型 *vs* C型).多变量分析显示，基因型是HBeAg阴转的重要的独立预测因子.在所有患者中，18例(7%)出现HBsAg阴转，16例(6%)出现HBsAg/HBsAb血清转换.PEG-IFNα-2b联合拉米夫定治疗，未能增加HBeAg阴转、HBsAg阴转及HBsAg/HBsAb血清转换.16例HBsAg/HBsAb血清转换患者中，3例出现于用药期间，13例出现于停药随访期间.所有出现HBsAg/HBsAb血清转换的患者在随访结束时，ALT均为正常，HBV DNA低于10^6拷贝/L.HBsAg/HBsAb血清转换率随HBV基因型不同而不同，A型11例(13%)，B型2例(9%)，C型为0，D型2例(2%).HBeAg阴转患者中，HBsAg/HBsAb血清转换率分别为A型28%，B型20%，C型0，D型8%.

研究者认为，HBeAg阳性的慢性乙肝患者接受PEG-IFNα-2b治疗1 a，可使HBsAg/HBsAb血清转换率达6%，但联合使用拉米夫定并不增加HBsAg/HBsAb血清转换率.1/3的A基因型患者出现HBsAg/HBsAb血清转换，提示对HBeAg阳性的慢性乙肝患者，抗病毒治疗时应考虑HBV基因型.PEG-IFNα对A和B基因型疗效最好.

以上文献报告的结果显示:PEG-IFNα无论是在治疗HBeAg阳性，还是HBeAg阴性的慢性乙肝患者方面，都具有良好的临床效果.其疗效均优于普通α-2a干扰素和拉米夫定，但联合应用拉米夫定并不能明显提高PEG-IFNα治疗的应答率.HBV基因型对PEG-IFNα的抗病毒效果有一定影响，PEG-IFNα对HBV A和B基因型疗效较好，对C和D基因型疗效较差.

4 参考文献

1 Bisceglie AMD, Rustgi VK, Thuluvath P, Davis M, Ghalib R, Lyons MF, Ondovik MS. Pharmacokinetics and pharmcodynamics of pegylated interferon alfa-2a or alfa-2b with ribavirin in treatment naive patients with genotype chronic hepatitis C. *Hepatology* 2004;40(Suppl 1):734A

2 黄阿农, 郑苏芹, 童郁韫. 抗丙型肝炎病毒新药 - 聚乙二醇干扰素. 医药导报 2004;23:779-780

3 Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R. Peginterferon alfa-2alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004;351:1206-1217

4 Piratvisuth T, Marcellin P, Lau G, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Rui J, Lu ZM, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P, Pluck N. ALT flares and sustained ALT response in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B treated with Peginterferon alfa-2a (40KD) (Pegasys®), Peginterferon alfa-2a (40KD) plus lamivudine or lamivudine alone. *Hepatology* 2004;40(Suppl 1):656A-657A

5 Cooksley WG, Priatvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC. Peginterferon alpha-2a (40KD): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2003;10:298-305

6 Lau G, Priatvisuth T, Kang XL, Marcellin P, Thongasawat S, Cooksley G, Gane E, Chow WC, Paik SW, Chang WY, Berg T, Flisiak R, Pluck N. Peginterferon alfa-2a (40KD)(Pegasys®) monotherapy and in combination with lamivudine is more effective than lamivudine monotherapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B: results from a large, multinational study. *Hepatology* 2004;40(Suppl 1):171A

7 Janssen HL, Flink HJ, Zonneveld MV, Niesters HG, Man RAD, Schalm SW, Erasmus MC. HBsAg seroconversion in chronic HBV patients treated with pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine. The role of HBV genotype. *Hepatology* 2004;40(Suppl 1):660A

编辑 王谨晖 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 July 28;13(14):1750-1759
ÊÀ½ç»ªÈÉÏû» ÔÓÖ¾ ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫

杨贵波, 邵一鸣

杨贵波, 邵一鸣, 中国疾病预防控制中心 北京市 100050
通讯作者: 杨贵波, 100050, 北京市, 中国疾病预防控制中心.
quibyang@public.bta.net.cn
电话: 010-63184103 传真: 010-83157886
收稿日期: 2005-05-14 接受日期: 2005-05-24

摘要

人类免疫缺陷病毒(HIV)主要通过突破黏膜屏障侵入人体.在全世界范围内大约有90%的HIV感染是通过黏膜发生的.由于黏膜固有层中存在大量的CD4+CD45RO+ T淋巴细胞,他们表达HIV的受体CD4和辅助受体CCR5，是HIV侵入黏膜后优先攻击的靶细胞.这些细胞为HIV早期繁殖提供场所并为系统扩散制造更多的病毒.黏膜中HIV及其感染细胞不仅存在于黏膜免疫系统的效应部位，也大量存在于黏膜免疫系统的诱导部位.HIV感染导致黏膜CD4+ T淋巴细胞快速损耗并进而导致黏膜免疫功能缺陷.由于绝大多数感染因子都通过黏膜侵入人体，黏膜免疫功能缺损必然导致机会性感染增加，最终导致艾滋病的发生和感染者因完全无法控制机会性感染而死亡.由于黏膜既是HIV侵入机体的主要门户，又在HIV感染的急性期及随后的整个病理过程中发挥作用，因此在AIDS疫苗和药物的研究中应重视对HIV黏膜传播的控制.

杨贵波, 邵一鸣. 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫. 世界华人消化杂志 2005; 13(14):1750-1759
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1750.asp

0 引言

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus，HIV)是获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome，AIDS)，即艾滋病的致病因子[1].HIV感染是世界卫生组织公布的导致死亡人数最多的病毒感染之一.在人们开始认识HIV还不足25 a的时间里，HIV/AIDS已无情地剥夺了成千上万人的生命.据世界卫生组织，在2004年中有约四千万HIV感染者或AIDS患者.仅2004年AIDS死亡人数就高达300多万，新发感染者约有500万.尽管全世界都在致力于寻找预防和治疗HIV感染和AIDS的新措施(高效抗病毒药物和各种疫苗)，然而至今仍然无法根除感染者体内的病毒或完全控制病毒复制，也尚未治愈过任何一位AIDS患者[2].

HIV属于逆转录病毒科的慢病毒属，分为HIV-1和HIV-2两型:前者在全世界范围内广泛流行，而后者则主要流行于西非.HIV-1主要通过性接触、血液及其制品或污染针具在人群中水平传播,和在母婴之间垂直传播[3-4].原发性HIV-1感染可引起急性逆转录病毒综合征，其特征为发烧、咽炎、淋巴腺病、肌痛、皮疹和头痛[5].在美国约有50%的HIV-1感染者在2-6 wk内出现急性逆转录病毒综合征.在暴露于HIV-1后，从血清阳转到发展为AIDS，感染者平均经过10 a左右的无症状期[6-8].然而，有大约5%的感染者在未经任何治疗的情况下可长期保持无症状，称为长期不进展者(long-term non-progressors，LTNPs).他们可多年维持低病毒载量、正常的免疫功能和稳定的CD4+ T细胞数[9].有趣的是有部分人在通过黏膜反复接触病毒后也不被感染.表明人体中存在一些尚不清楚的免疫保护机制可以控制或阻止HIV-1感染.

尽管能够被HIV-1感染的人体细胞有多种，但能支持产毒性感染的细胞(productively infected cells)类型主要是那些被激活过的或记忆性的CD4+ T淋巴细胞和巨噬细胞[10-11].HIV-1抗原特异的CD4+ T淋巴细胞会被优先感染[12].CD4分子是HIV-1进入靶细胞的主要受体[13-14]，他主要表达于部分T淋巴细胞、单核/巨噬细胞和树突状细胞.但多数研究者认为树突状细胞并不支持产毒性感染.HIV-1的主要辅助受体为CCR5和CXCR4.但其他分子，包括GalCer和CCR1、CCR2b、CCR3、CCR8、CX3CR1、Apj、Str133、Gpr1、Gpr15、ChemR23、RDC1等也可充当HIV-1的受体或辅助受体[15-17].HIV-1的半衰期小于6 h并很可能仅为30 min[18].HIV-1感染过的CD4+T细胞的半衰期平均约为1-1.5 d.在未经治疗的感染者中,HIV-1每天约要感染2×10^9细胞.但由于病毒cDNA被整合入感染细胞的基因组后可长期存在于细胞核内,使得清除体内病毒的唯一希望是所有感染细胞的死亡.据估计,即使在高效抗病毒药物的作用下要清除感染者体内的病毒所需的时间应在60 a以上[19].而现有的候选疫苗尚未显示出任何可彻底清除这些感染细胞的能力.

对HIV-1感染途径的研究发现，在HIV-1的传播中，性接触传播占绝大部分(75-80%)[20].因此，黏膜传播是世界上HIV-1传播的主要途径[21-22]，全球范围内有90%的HIV-1感染是通过黏膜发生的.另一方面，不论HIV-1是否通过黏膜侵入人体，黏膜都是HIV-1繁殖的主要场所.1998年Veazey *et al*[23]报道SIV感染恒河猴肠黏膜中CD4+T淋巴细胞很快大量损耗.在6 a之后两个不同的研究组同时发现HIV-1感染者肠黏膜固有层CD4+ T淋巴细胞很快被选择性地耗损,这种耗损在感染后很快出现并持续存在于感染后的各个时期，即使在高效抗HIV-1药物治疗期间CD4+T淋巴细胞耗损也同样发生.表明肠黏膜

在整个AIDS病理过程中，尤其是在感染后很早就起着十分重要的作用. 因此，HIV-1 疫苗和药物研究应重视对HIV-1黏膜传播的预防和对黏膜中HIV-1的控制. 可以预期，能够诱导黏膜免疫保护的AIDS疫苗势必在有效遏制艾滋病的全球蔓延中发挥巨大的作用.

1 黏膜是 HIV-1 进入机体的主要途径

HIV-1传播的途径有多种:如静脉吸毒者间共用注射针具可将HIV-1从带毒一方传给另一方;携带HIV-1的血液也可通过输血将病毒传给受血者. 然而随着公共卫生条件的改善，通过血液及其制品和污染针具的传播会得到有效地控制. 与黏膜相关的传播主要有母婴传播和性接触传播. 自 1981 年首次发现艾滋病至今，性传播一直是世界上 HIV-1 传播的主要方式[20]. 在性传播过程中，黏膜是 HIV-1侵入机体的主要途径[24]. 黏膜接触的病毒主要来自 HIV-1 携带者的黏膜分泌液、母乳、产道液及精液等体液[25-28]. 这些体液中的病毒以游离的形式存在或位于被感染的细胞之中. 暴露于病毒的黏膜主要为消化道黏膜和泌尿生殖道黏膜.

通过生殖道黏膜传播的HIV-1主要来自感染者的精液或生殖道分泌液. 在感染者的精液中可发现具感染力的游离病毒和带病毒的细胞[29-31]. 原发性感染的HIV-1 多为均一的巨噬细胞嗜性病毒，并为非合胞体诱导(non-syncytium inducing，NSI)表型[32-33]. 近来也有报道发现一些妇女感染的HIV-1 为不均一的异源病毒，而通过性接触使其被感染的男子所带的病毒则为均一的同源病毒[34]. 黏膜传播HIV-1的来源尚有感染的母乳和感染者的唾液等[35]. 虽然通过感染者唾液传播的危险相对很低，仅1-5%患者唾液中含感染性 HIV-1，但母乳在母婴传播中的机率却较高. 母乳中的一部分病毒以游离的病毒粒子存在，另一部分存在于感染过的细胞之中. 母乳中的细胞较多，尤其是感染者的初乳中可能带有大量的感染细胞.

HIV-1进入消化道黏膜的主要途径可能有四种[36]:即通过微皱褶(microfold，M)细胞、树突状细胞(dendritic cell，DC)、或上皮细胞的转运以及通过上皮屏障裂隙或生理性开放[37]进入黏膜. HIV-1也曾经被发现于男同性恋艾滋病患者直肠黏膜的肠嗜铬(EC)细胞之中[38]. 但 HIV-1 是否可通过 EC 细胞进入机体尚无报道. 覆盖于器官性黏膜相关淋巴组织之上的上皮为小结相关上皮(follicle associated epithelium，FAE). M 细胞为FAE中的特殊上皮细胞. 这种细胞顶端微绒毛较短、细胞内溶酶体水平较低，主要功能为摄取和传递抗原[39-40]. 除FAE外，M细胞也被发现于人的结肠和直肠黏膜上皮中. 有研究发现 HIV-1 可以黏附于小鼠和兔的 M 细胞顶面[41]，也有电镜观察发现 HIV-1 病毒粒子位于 M 细胞内[42]. 因此，在黏膜物理屏障完整的情况下，HIV-1有可能通过M细胞进入消化道黏膜.

DC细胞为能够激活幼稚T淋巴细胞的专业抗原呈递细胞，广泛存在于机体各个部位，包括胃肠道和生殖道黏膜. DC 也被发现于大鼠的肠黏膜上皮中，可能直接接触肠腔内的病原物质[43]. 其在HIV-1黏膜传播和病理过程中的确切作用目前还不清楚. 由于DC细胞表达HIV-1的受体 CD4 和辅助受体 CCR5，因此 HIV-1 可以感染 DC 细胞. 另外，不同DC细胞表达不同的C类凝集素受体如DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin，DC-SIGN，又名 CD209). DC-SIGN 能高亲合力地与 HIV-1 的膜蛋白结合[44-46]，因此 DC 可能充当将HIV-1从黏膜转运到次级淋巴器官的载体[47-49]. 结合于 DC 表面的 HIV-1 可长时间保其持感染力，并能被有效地传递给靶细胞. 有研究表明，急性感染期 SIV(simian immunodeficiency virus)复制可很快见于猕猴生殖道黏膜的 Langerhan 细胞(Langerhan cells，LC)和组织 DC 中. 因此，DC 可能是最先接触黏膜表面 HIV-1 的细胞类型之一[50-53]，他们可能通过顺、反感染(cis-infection、trans-infection)，既被 HIV-1 感染或仅与 HIV-1 结合，从而传递 HIV-1 并促进其产毒性地感染 CD4+T 淋巴细胞. 因此，DC 可能是 HIV-1 突破黏膜屏障、尤其是生殖道黏膜的主要介导者.

由于研究发现 HIV-1 能够感染培养的上皮细胞，通过穿胞作用穿越上皮进入黏膜可能是HIV-1入侵机体的另一途径[54-55]. 曾经有不同的研究者证明HIV-1存在于活体病理解剖的肠黏膜标本的上皮细胞之中[56-57]. 虽然肠上皮细胞并不表达 CD4 这一 HIV-1 赖以进入细胞的经典受体分子，但有研究证明肠上皮细胞可以表达半乳糖苷神经酰胺(GalCer)和 CCR5[16-17]. 同时也有研究表明 HIV-1 可以利用半乳糖苷神经酰胺作为受体感染结肠上皮细胞[58]. 体外研究中也发现HIV-1可以穿越由培养的肠上皮细胞系或子宫内膜细胞系形成的单细胞层. 尽管有报道指出HIV-1可以通过生殖道黏膜进行传播[20, 59]，但关于 HIV-1 如何通过生殖道上皮的机制尚不十分清楚. 生殖道黏膜是否出现溃疡性疾病与 HIV-1 感染具有显著的相关性，表明HIV-1可能通过损伤的生殖道黏膜进入体内[60]. 但在动物实验中已经证明，SIV可通过完好的阴道壁复层上皮、阴道颈部的上皮和阴茎部尿道进入体内. 因此，黏膜上皮本身难以完全阻止 HIV-1 的入侵.

2 黏膜是 HIV-1 繁殖的场所和靶组织

黏膜是HIV-1感染的主要组织[23]. 体外研究证明:免疫细胞(CD4+T 淋巴细胞、巨噬细胞等)、消化道和生殖道黏膜上皮细胞系等许多类型的细胞都对 HIV-1 感染敏感[11, 61-65]. 在体内研究中发现，HIV-1 产毒性感染(productive infection)的靶细胞主要是已激活的CD4+T淋巴细胞或记忆 CD4+T 细胞，另外还有巨噬细胞[10, 11, 66-69]. 也有报道指出 HIV-1 可产毒性感染树突状细胞[15, 70]，但对此

的报道并不一致.通常在原发感染的早期HIV-1以感染CD4+T淋巴细胞为主,即使所感染的病毒是M嗜性的病毒.而随着体内CD4+T淋巴细胞的耗损,组织中被感染的巨噬细胞会增加.

肠黏膜固有层中存在大量的淋巴细胞和巨噬细胞,他们都表达HIV-1受体CD4分子.绝大多数的CD4+T淋巴细胞都是被激活过的或处于静止期的免疫记忆细胞.由于肠上皮细胞表达CCR5,利用半乳糖苷神经酰胺为受体和CCR5为辅助受体进入黏膜的HIV-1多为M嗜性.尽管如此,由于肠黏膜中CD4+T淋巴细胞表达CCR5而巨噬细胞不表达CCR5[71],因此HIV-1进入黏膜后首先并且产毒性地感染大量的CD4+T淋巴细胞.在灵长类动物AIDS模型的研究中,不论是静脉内注射还是直肠内接种SIVmac251,在感染后的第3 d,就可用PCR(polymerase chain reaction)在肠黏膜里检测出SIVmac251的DNA,每100 000细胞中的拷贝数可达300-15 000个[72].

关于女性患者生殖道中首先被感染的细胞类型的体内研究资料较为缺乏[73].在慢性HIV-1感染女性的宫颈组织中,可发现被HIV-1感染的T淋巴细胞、巨噬细胞和Langerhans细胞[74].在SIV感染猕猴的AIDS模型的研究中,Spira *et al*[53]发现雌性生殖道中最初被感染的细胞为固有膜内的Langerhans细胞.Zhang *et al*[75]发现主要是CD4+T细胞而非树突状细胞在猴阴道内暴露于SIV 3 d后被感染.Hu *et al*[52]显示在阴道内暴露SIV的60 min内树突状细胞内有SIV RNA.近年Gupta *et al*[73]又使用器官培养模型对此进行了进一步研究,确定记忆CD4+T细胞为宫颈黏膜感染中首先被感染的细胞.但人生殖道黏膜中首先被HIV-1感染的细胞是CD4+T淋巴细胞还是树突状细胞尚需进一步研究.

除了CD4+T细胞和巨噬细胞以外,肠上皮中的其他细胞如肠上皮细胞和弥散内分泌细胞中也可检测出HIV-1的蛋白质或核酸[38, 56, 76-79].但并无报道表明体内这些细胞是否支持病毒的复制.HIV-1主要在激活的CD4+ T淋巴细胞中复制,与静止期CD4+T淋巴细胞产毒量小相一致.在HIV-1感染的CD4+T淋巴细胞中,处于静止期的CD4+T淋巴细胞中所含的病毒RNA比处于激活状态的CD4+T淋巴细胞中的病毒RNA要少5倍左右[75].

对于HIV-1跨越黏膜上皮屏障之后在人体内的扩散速度目前知之甚少.在灵长类动物AIDS模型的研究中发现,暴露于黏膜的SIV可局部存在较长时间[75,80]或在24-48 h内出现于收集该区域淋巴的淋巴结内[52, 81].

黏膜传播在某种程度上可能与黏膜局部所受的神经内分泌调节有关.生殖道黏膜的结构受生殖激素的影响而周期性地变化.在生殖道黏膜传播影响因素的研究中发现生殖激素可影响HIV-1转录[82].对月经周期是否影响生殖道中病毒的脱落量的报道尚不一致[83-84].在灵长类动物AIDS模型的研究中发现体内植入黄体酮可促进SIV传播,而雌激素则抑制SIV传播.可能与这些激素能影响阴道壁厚度或通过IL-2等影响CCR5和CXCR4表达有关[85-86].由于胃肠黏膜免疫系统也受神经内分泌的影响[87-88],而HIV-1也可感染肠黏膜内分泌细胞[38],因此胃肠神经内分泌对HIV-1黏膜传播的影响值得研究.

3 影响HIV-1跨越黏膜的因素

影响HIV-1通过黏膜传播的因素较多.传播者体内的病毒载量、分泌液中的病毒载量、被传播者的黏膜创伤、炎症、溃疡和危险的性行为等都可促进HIV-1的传播.影响病毒进入生殖道黏膜的因素目前尚不十分清楚.一些人仅暴露于HIV-1一次就被感染,而另一些则要在暴露多次之后才被感染[89].尚有一部分人在多次反复暴露之后也不被感染[90].可能影响HIV-1通过生殖道黏膜传播的因素较多.如在妇女体液中的HIV-1的载量、口服避孕药、妊娠、宫颈异位、性传播疾病(STD)、细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)、保护性黏膜免疫及一些已知或未知的遗传因素[85, 91-92]等都与HIV-1通过生殖道黏膜传播有关.在最近的报道中,Sha *et al*[93]发现与细菌性阴道病有关的细菌群落可以影响生殖道中HIV-1病毒的脱落量.病毒本身的特性也与其黏膜传播能力有关.有研究表明在异性传播中HIV-1 E亚型比B亚型更易通过黏膜传播[94-98].此外也有研究者指出A亚型和C亚型HIV-1也可能较易借助于性途径进行传播[99].

特异黏膜免疫保护的重要效应成分包括CTL(cytotoxic T lymphocyte)和为分泌型IgA(S-IgA).HIV-1特异的S-IgA曾经被发现于通过性接触而暴露于HIV-1的未感染者中[100-102].例如Clerici *et al*发现在夫妻中仅一方感染的暴露而未感染者的血清中可以检测到具有中和能力的IgA,其S-IgA可与gp41上的表位结合[103].黏膜IgA也出现于对HIV-1有抵抗力的性工作者和其他暴露而未感染的人中[100, 104-107].R5嗜性HIV-1能通过人子宫内膜HIC-1细胞单层,炎性细胞或递质可促进该过程[108].特异的细胞免疫反应也发现于暴露而未感染者的生殖黏膜分泌物中[109-110].因此,黏膜的细胞和体液免疫均有可能影响HIV-1通过黏膜传播.

化学促动因子(chemokine)受体CCR5和CXCR4是HIV-1进入细胞的主要辅助受体.已报道的其他辅助受体尚有CCR1、CCR2b、CCR3、CXC3CR1等.CCR5-Δ32突变可影响HIV-1感染.在美国一男性同性恋人群研究中,CCR5-Δ32纯合突变占暴露而未感染者的3.6%,在感染者中未见CCR5-Δ32纯合突变,尽管在美国白人中CCR5-Δ32纯合突变率为1.4%[111].CCR2-V64I突变不影响人对HIV-1的易感性,但纯合和杂合突变的感染者的AIDS进程和死亡推迟[112-114].在对肯尼亚的商业性工作者的研究中发现21-46%的慢速进展者携带该突变[112].另一影响AIDS进展的遗传特征涉及SDF-1,CXCR4的主要配体.已

有研究显示SDF-1阻止使用CXCR4为辅助受体的HIV-1感染[115-116]. 突变基因SDF-1 3’α导致SDF-1合成增加，竞争性抑制T淋巴细胞嗜性HIV-1与细胞的结合. 具有该纯合突变的HIV-1感染者的进展是否减慢尚无一致的结果[117-119]，但在诊断为AIDS后存活时间延长[119]. 尽管遗传因素可以影响HIV-1感染，但仅是众多影响因素之一.

由于趋化因子可与HIV-1的辅助受体结合，因此可能阻止HIV-1侵入靶细胞[120]. 在暴露而未感染者中，CD4+ T细胞产生的RANTES，MIP-1α和MIP-1β水平升高，并抑制巨噬细胞嗜性的HIV-1的复制[121-122]. 在16对仅一方感染HIV-1的异性性伴侣之间，外周血白细胞所产生的RANTES，MIP-1α，MIP-1β在量上无区别[101]. 另外，趋化因子及其类似物已用于抗HIV-1药物的应用研究中，T20(enfuvirtide)便是其中之一.

4 黏膜HIV-1感染导致免疫功能障碍

在HIV感染者中，黏膜功能会受到严重影响，包括黏膜的细胞和体液免疫应答[123-124]. 因此，那些黏膜表面经常接触大量感染因子的器官系统，如消化系统、呼吸系统、尿生殖系统等的正常功能也会受到相应的影响，如HIV/AIDS肠病和机会性感染导致的呼吸衰竭[125-126]会出现在许多HIV-1感染者之中.

用免疫组织化学[127-132]和流式细胞术[133-135]对黏膜中的淋巴细胞的检测发现，在HIV-1感染后CD4+/CD8+T细胞比例下降，CD8+T细胞增多. 在HIV-1感染者和SIV感染的非人灵长类动物模型的研究中都发现肠黏膜固有层中的CD4+T淋巴细胞很快减少. 与外周血相比，肠黏膜中CD4+T淋巴细胞的耗损要更快、更早并更为明显. 这种CD4+T淋巴细胞耗损使固有层中失去了重要的调节性T淋巴细胞，导致黏膜免疫缺陷. 肠黏膜中CD8+T淋巴细胞的增加主要因为HLA-DR+CD8+T细胞和CD11a+CD8+T细胞亚群的增加[134]. 这些可能是可识别HIV-1抗原的细胞毒性T淋巴细胞[136-138]. 这些CD8+T细胞可能在控制感染病毒繁殖[139-140]的同时杀死HIV-1的主要靶细胞，加快CD4+ T淋巴细胞耗损.

Sistig *et al*[141]对33例HIV-1患者和21例对照者唾液中IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA1，IgA2的水平进行了研究，发现HIV-1阳性患者中IgA2的水平显著降低. 研究表明HIV-1感染者唾液中的IgA具有中和HIV-1的能力[142]. HIV-1感染者唾液中的HIV-1-特异的IgA水平与疾病发展的进程有关. 在较早阶段可在血浆和唾液中检测到HIV-1特异的IgA[143]，且多数感染者的抗体可中和利用CCR5为辅助受体的原代病毒[144]. 但在疾病后期IgA水平很低或根本无法检测到. 这种分泌型IgA水平的下降或许与黏膜免疫功能在疾病晚期已出现严重缺陷有关. 另外也有报道表明HIV-1感染者黏膜中HIV-1特异的IgA水平较低[145]. 另有报道称在HIV-1感染者中可诱导出针对CT-B(cholera toxin B)的正常黏膜IgA B细胞反应[146]. 因此，HIV-1感染对黏膜体液免疫反应能力的影响可能存在个体差异.

HIV/AIDS肠病指艾滋病患者的胃肠功能紊乱，常见症状包括腹泻、吸收不良和体重减轻等，均频繁见于HIV-1感染病例的报道之中[125, 147-149]. 由于在多达30-40%的病例中无可鉴定的肠道病原体，因此引起这些症状的原因尚不清楚. 在无继发性感染的情况下，HIV-1感染者的小肠也发生萎缩，并伴有上皮细胞分裂能力低下和肠细胞成熟障碍[150]. 目前认为AIDS肠病可能因机会性感染、炎性反应所产生的细胞因子和HIV-1病毒对肠上皮细胞的直接感染所致[124, 151-152]. 由于HIV-1不仅感染免疫细胞也感染体外培养的肠上皮细胞[153-154]. 上皮细胞感染及CD+ T淋巴细胞耗损可直接或间接地破坏黏膜屏障功能的完整性. 有研究表明HIV-1即使不进入肠上皮细胞，也可通过与细胞表面GalCer结合而影响肠上皮细胞的功能[16-17]. 不仅如此，HIV-1产物Tat蛋白可诱导Caco-2细胞和人结肠黏膜分泌活动并抑制肠细胞分裂[151].

黏膜免疫功能障碍会导致机体对其他病毒、细菌、寄生虫感染的抵抗能力降低. AIDS患者往往伴有多种机会性感染，如巨细胞病毒感染[155]、各种细菌感染[156]、和寄生虫感染[157]等. 这些感染会进一步影响黏膜免疫功能的完整性.

5 黏膜保护与抗HIV-1感染疫苗

AIDS疫苗研究一直是HIV/AIDS研究的重点之一. 虽然针对HIV/AIDS的药物研究已经取得了长足的进展，如自1987年发现第一个抗HIV-1药物至今已有20多种被FDA (food and drug administration)批准用于治疗AIDS的药物. 药物治疗也显著地延长了感染者的寿命并改善了他们的生活质量. 但人们普遍认为疫苗应是防止HIV/AIDS流行最经济有效的最理想的手段，尤其是在欠发达国家中[158-162]. 自发现HIV-1是AIDS的致病因子以来的二十多年中，人们对蛋白亚单位疫苗、灭活病毒疫苗、减毒疫苗、活载体重组苗和DNA疫苗以及多种免疫策略等都进行了深入探索[163]. 虽然已进行了的III期临床试验宣告失败，但目前仍然还有20多种候选疫苗进入临床试验. 在不知这些疫苗是否能有效地预防或治疗HIV/AIDS之前，探索新的疫苗仍然是HIV/AIDS领域研究的前沿. 成功的经验告诉我们，黏膜疫苗是黏膜抗感染的有效措施. 由于黏膜在HIV-1感染和病理过程中起着十分重要的作用，探索黏膜AIDS疫苗便具有特别重要的意义.

基于高危人群的研究发现，一些人在黏膜反复暴露于HIV-1后仍然为HIV-1检测阴性，即WB (western blotting)检测HIV IgG阴性，HIV RNA和HIV DNA PCR阴性[164]. 在对这些暴露于HIV-1而未被感染的人群研究中发现了针对HIV-1的特异黏膜免疫反应[21, 100]，包括具有中和或阻断HIV-1通过肠上皮细胞的IgA[102, 106-107, 165]

和HIV-1特异的CD4+T辅助细胞和CD8+细胞毒T淋巴细胞[109,166]. 在黏膜自然暴露于HIV-1后能够产生黏膜免疫力而后重复多次暴露也不被HIV-1感染这一现象表明有效的黏膜免疫能够阻断HIV-1的黏膜传播. 由于黏膜免疫可在局部阻止HIV-1黏膜传播和控制通过黏膜进入的HIV-1的系统性扩散. 从而在很大程度上可以避免病毒突变和免疫逃逸的问题. 另一方面，非黏膜途径侵入机体的HIV-1在黏膜中的持续存在也会被局部免疫控制或清除. 因此黏膜AIDS疫苗对于成功地控制HIV/AIDS的广泛传播将起决定性的作用.

如何诱导有效的抗HIV/AIDS的黏膜免疫保护?用什么样的疫苗通过什么样的途径诱导什么样的免疫反应才能够防治HIV/AIDS是AIDS黏膜疫苗所面临的关键问题. 来自SIV感染猕猴和一些来自HIV-1感染者的数据表明:具有广泛中和能力的抗体、T淋巴细胞(包括CD4+ T辅助细胞和CD8+细胞毒性T淋巴细胞)和天然免疫都可能在控制HIV/SIV感染中发挥十分重要的作用[100-101, 106-107, 167-181]. 新的黏膜疫苗策略，如初始免疫后加强免疫(prime-boost);使用新一代黏膜佐剂、各种具有相互促进作用的细胞因子、化学促动因子、辅助刺激分子、CpG寡脱氧核苷酸的各种组合;标靶汇集黏膜淋巴的淋巴结等都在促进黏膜疫苗免疫效果方面显示了一定的作用. 部分疫苗实验在动物体内成功地诱导了黏膜免疫反应. 如Amara *et al*[182]用DNA疫苗进行初始免疫然后用rMVA(recombinant modified vaccinia virus Ankara)进行加强免疫后可控制黏膜感染并防止AIDS. 另外，黏膜疫苗在诱导局部免疫的同时也可诱导系统免疫应答[183]，表明黏膜疫苗在提供局部免疫保护作用的同时也可提供系统免疫保护. 目前由于对与HIV-1免疫保护相关的免疫因子知之尚少，严重阻碍了黏膜AIDS疫苗的研制. 未来应加强相关领域的研究:如与HIV-1免疫保护有关的天然免疫因子、中和抗体和细胞介导的免疫反应;诱导长效黏膜免疫记忆的免疫策略以及高效的黏膜佐剂等. 这些研究必将为理性设计黏膜AIDS疫苗提供重要的理论基础.

6 参考文献

1 Sharp PM, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hahn BH. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:867-876

2 Burger S, Poles MA. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Semin Liver Dis* 2003;23:115-124

3 Dibbern DA Jr, Glazner GW, Gozes I, Brenneman DE, Hill JM. Inhibition of murine embryonic growth by human immunodeficiency virus envelope protein and its prevention by vasoactive intestinal peptide and activity-dependent neurotrophic factor. *J Clin Invest* 1997;99:2837-2841

4 Sprecher S, Soumenkoff G, Puissant F, Degueldre M. Vertical transmission of HIV in 15-week fetus. *Lancet* 1986;2:288-289

5 Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, Kappes JC, Hahn BH, Shaw GM. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991;324:954-606

6 Lifson AR, Rutherford GW, Jaffe HW. The natural history of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1988;158:1360-1367

7 Moss AR, Bacchetti P. Natural history of HIV infection. *AIDS* 1989;3:55-61

8 Munoz A, Wang MC, Bass S, Taylor JM, Kingsley LA, Chmiel JS, Polk BF. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *Am J Epidemiol* 1989;130:530-539

9 Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, Montefiori D, Orenstein JM, Fox C, Schrager LK. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995;332:209-216

10 Gowda SD, Stein BS, Mohagheghpour N, Benike CJ, Engleman EG. Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 1989;142:773-780

11 Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS. 2nd ed. Washington, DC: *ASM Press*, 1998

12 Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 2002;417:95-98

13 Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;312:763-767

14 Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984;312:767-768

15 Yahi N, Baghdiguian S, Moreau H, Fantini J. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J Virol* 1992;66:4848-4854

16 Yahi N, Sabatier JM, Nickel P, Mabrouk K, Gonzalez-Scarano F, Fantini J. Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:24349-24353

17 Yahi N, Spitalnik SL, Stefano KA, De Micco P, Gonzalez-Scarano F, Fantini J. Interferon-gamma decreases cell surface expression of galactosyl ceramide, the receptor for HIV-1 GP120 on human colonic epithelial cells. *Virology* 1994;204:550-557

18 Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996;271:1582-1586

19 Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999;5:512-517

20 Royce RA, Sena A, Cates W Jr, Cohen MS. Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* 1997;336:1072-1078

21 Kresina TF, Mathieson B. Human immunodeficiency virus type 1 infection, mucosal immunity, and pathogenesis and extramural research programs at the National Institutes of Health. *J Infect Dis* 1999;179(Suppl 3):S392-396

22 Stevceva L, Strober W. Mucosal HIV vaccines: where are we now? *Curr HIV Res* 2004;2:1-10

23 Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol* 2001;22:626-633

24 Milman G, Sharma O. Mechanisms of HIV/SIV mucosal

transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1305-1312
25 Amedee AM, Lacour N, Ratterree M. Mother-to-infant transmission of SIV via breast-feeding in rhesus macaques. *J Med Primatol* 2003;32:187-193
26 Henin Y, Mandelbrot L, Henrion R, Pradinaud R, Coulaud JP, Montagnier L. Virus excretion in the cervicovaginal secretions of pregnant and nonpregnant HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993;6:72-75
27 Loussert-Ajaka I, Mandelbrot L, Delmas MC, Bastian H, Benifla JL, Farfara I, de Vincenzi I, Matheron S, Simon F, Brun-Vezinet F. HIV-1 detection in cervicovaginal secretions during pregnancy. *AIDS* 1997;11:1575-1581
28 Shugars DC, Wahl SM. The role of the oral environment in HIV-1 transmission. *J Am Dent Assoc* 1998;129:851-858
29 Mermin JH, Holodniy M, Katzenstein DA, Merigan TC. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991;164:769-772
30 Vernazza PL, Eron JJ, Cohen MS, van der Horst CM, Troiani L, Fiscus SA. Detection and biologic characterization of infectious HIV-1 in semen of seropositive men. *AIDS* 1994;8:1325-1329
31 Vernazza PL, Eron JJ, Fiscus SA. Sensitive method for the detection of infectious HIV in semen of seropositive individuals. *J Virol Methods* 1996;56:33-40
32 Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Brown AJ, Simmonds P. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J Virol* 1993;67:3345-3356
33 Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993;261:1179-1181
34 Long EM, Martin HL Jr, Kreiss JK, Rainwater SM, Lavreys L, Jackson DJ, Rakwar J, Mandaliya K, Overbaugh J. Gender differences in HIV-1 diversity at time of infection. *Nat Med* 2000;6:71-75
35 Barr CE, Miller LK, Lopez MR, Croxson TS, Schwartz SA, Denman H, Jandorek R. Recovery of infectious HIV-1 from whole saliva. *Am Dent Assoc* 1992;123:36-37
36 Janoff EN, Smith PD. Emerging concepts in gastrointestinal aspects of HIV-1 pathogenesis and management. *Gastroenterology* 2001;120:607-621
37 Madara JL, Parkos C, Colgan S, Nusrat A, Atisook K, Kaoutzani P. The movement of solutes and cells across tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1992;664:47-60
38 Levy JA, Margaretten W, Nelson J. Detection of HIV in enterochromaffin cells in the rectal mucosa of an AIDS patient. *Am J Gastroenterol* 1989;84:787-789
39 Neutra MR. Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol* 1998;274(5 Pt 1):G785-791
40 Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 1974;66:189-203
41 Amerongen HM, Weltzin R, Farnet CM, Michetti P, Haseltine WA, Neutra MR. Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991;4:760-765
42 Owen RL. M cells as portals of entry for HIV. *Pathobiology* 1998;66:141-144
43 Maric I, Holt PG, Perdue MH, Bienenstock J. Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J Immunol* 1996;156:1408-1414
44 Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587-597
45 Jameson B, Baribaud F, Pohlmann S, Ghavimi D, Mortari F, Doms RW, Iwasaki A. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* 2002;76:1866-1875
46 Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, Cunningham AL. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 2002;3:975-983
47 Cameron P, Pope M, Granelli-Piperno A, Steinman RM. Dendritic cells and the replication of HIV-1. *J Leukoc Biol* 1996;59:158-171
48 Grouard G, Clark EA. Role of dendritic and follicular dendritic cells in HIV infection and pathogenesis. *Curr Opin Immunol* 1997;9:563-567
49 Rowland-Jones SL. HIV: The deadly passenger in dendritic cells. *Curr Biol* 1999;9:R248-250
50 Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, Mannan P, Thompson LD, Abbondanzo SL, Nelson AM, Pope M, Steinman RM. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 1996;272:115-117
51 Frankel SS, Tenner-Racz K, Racz P, Wenig BM, Hansen CH, Heffner D, Nelson AM, Pope M, Steinman RM. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am J Pathol* 1997;151:89-96
52 Hu J, Gardner MB, Miller CJ. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* 2000;74:6087-6095
53 Spira AI, Marx PA, Patterson BK, Mahoney J, Koup RA, Wolinsky SM, Ho DD. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996;183:215-225
54 Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 1997;3:42-47
55 Hocini H, Bomsel M. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis* 1999;179(Suppl 3):S448-453
56 Heise C, Dandekar S, Kumar P, Duplantier R, Donovan RM, Halsted CH. Human immunodeficiency virus infection of enterocytes and mononuclear cells in human jejunal mucosa. *Gastroenterology* 1991;100:1521-1527
57 Kotler DP, Reka S, Borcich A, Cronin WJ. Detection, localization, and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV. *Am J Pathol* 1991;139:823-830
58 Fantini J, Cook DG, Nathanson N, Spitalnik SL, Gonzalez-Scarano F. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2700-2704
59 Holmberg SD, Horsburgh CR Jr, Ward JW, Jaffe HW. Biologic factors in the sexual transmission of human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1989;160:116-125
60 Dickerson MC, Johnston J, Delea TE, White A, Andrews E. The causal role for genital ulcer disease as a risk factor for transmission of human immunodeficiency virus. An application of the Bradford Hill criteria. *Sex Transm Dis* 1996;23:429-440
61 Braun J, Valentin H, Nugeyre MT, Ohayon H, Gounon P, Barre-Sinoussi F. Productive and persistent infection of human thymic epithelial cells in vitro with HIV-1. *Virology* 1996;225:413-418
62 Collman R, Hassan NF, Walker R, Godfrey B, Cutilli J, Hastings JC, Friedman H, Douglas SD, Nathanson N. Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types. *J Exp Med* 1989;170:1149-1163
63 Hassan NF, Campbell DE, Rifat S, Douglas SD. Isolation and characterization of human fetal brain-derived microglia in in

vitro culture. *Neuroscience* 1991;41:149-158
64 Moore JS, Hall SD, Jackson S. Cell-associated HIV-1 infection of salivary gland epithelial cell lines. *Virology* 2002;297:89-97
65 Phillips DM, Tan X, Pearce-Pratt R, Zacharopoulos VR. An assay for HIV infection of cultured human cervix-derived cells. *J Virol Methods* 1995;52:1-13
66 Orenstein JM, Fox C, Wahl SM. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 1997;276:1857-1861
67 Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993;362:355-358
68 Stein BS, Gowda SD, Lifson JD, Penhallow RC, Bensch KG, Engleman EG. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* 1987;49:659-668
69 Stein BS, Engleman EG. Mechanism of HIV-1 entry into CD4+ T cells. *Adv Exp Med Biol* 1991;300:71-86
70 Blauvelt A, Asada H, Saville MW, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Yarchoan R, Katz SI. Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J Clin Invest* 1997;100:2043-2053
71 Smith PD, Meng G, Salazar-Gonzalez JF, Shaw GM. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J Leukoc Biol* 2003;74:642-649
72 Didier A, Petry H, Stahl-Hennig C, Schafer M, Zeitz U, Schneider T, Boga JA, Matz-Rensing K, Herrmann K, Kaup FJ. Long-term follow-up study on SIV intestinal proviral load in rhesus macaques. *J Med Primatol* 2000;29:136-142
73 Gupta P, Collins KB, Ratner D, Watkins S, Naus GJ, Landers DV, Patterson BK. Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. *J Virol* 2002;76:9868-9876
74 Pomerantz RJ, de la Monte SM, Donegan SP, Rota TR, Vogt MW, Craven DE, Hirsch MS. Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. *Ann Intern Med* 1988;108:321-327
75 Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgrefe S, Staskus KA, Reimann KA, Reinhart TA, Rogan M, Cavert W, Miller CJ, Veazey RS, Notermans D, Little S, Danner SA, Richman DD, Havlir D, Wong J, Jordan HL, Schacker TW, Racz P, Tenner-Racz K, Letvin NL, Wolinsky S, Haase AT. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* 1999;286:1353-1357
76 Bigornia E, Simon D, Weiss LM, Jones J, Tanowitz H, Wittner M, Lyman W. Detection of HIV-1 protein and nucleic acid in enterochromaffin cells of HIV-1-seropositive patients. *Am J Gastroenterol* 1992;87:1624-1628
77 Fantini J, Yahi N, Chermann JC. Human immunodeficiency virus can infect the apical and basolateral surfaces of human colonic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9297-9301
78 Fantini J, Yahi N, Baghdiguian S, Chermann JC. Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *J Virol* 1992;66:580-585
79 Nelson JA, Wiley CA, Reynolds-Kohler C, Reese CE, Margaretten W, Levy JA. Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet* 1988;1:259-262
80 Hirsch VM, Sharkey ME, Brown CR, Brichacek B, Goldstein S, Wakefield J, Byrum R, Elkins WR, Hahn BH, Lifson JD, Stevenson M. Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIV(SM) PBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification. *Nat Med* 1998;4:1401-1408
81 Joag SV, Adany I, Li Z, Foresman L, Pinson DM, Wang C, Stephens EB, Raghavan R, Narayan O. Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ T cells, and AIDS. *J Virol* 1997;71:4016-4023
82 Ghosh D. Glucocorticoid receptor-binding site in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol* 1992;66:586-590
83 Harlow SD, Schuman P, Cohen M, Ohmit SE, Cu-Uvin S, Lin X, Anastos K, Burns D, Greenblatt R, Minkoff H, Muderspach L, Rompalo A, Warren D, Young MA, Klein RS. Effect of HIV infection on menstrual cycle length. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;24:68-75
84 Mostad SB, Jackson S, Overbaugh J, Reilly M, Chohan B, Mandaliya K, Nyange P, Ndinya-Achola J, Bwayo JJ, Kreiss JK. Cervical and vaginal shedding of human immunodeficiency virus type 1-infected cells throughout the menstrual cycle. *J Infect Dis* 1998;178:983-991
85 al-Harthi L, Landay A. HIV in the female genital tract: viral shedding and mucosal immunity. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44:144-153
86 Vassiliadou N, Tucker L, Anderson DJ. Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expression on peripheral blood mononuclear cells correlates with reduced HIV-1 infectability in vitro. *J Immunol* 1999;162:7510-7518
87 Ottaway CA. Neuroimmunomodulation in the intestinal mucosa. *Gastroenterol Clin North Am* 1991;20:511-529
88 Yang GB, Lackner AA. Proximity between 5-HT secreting enteroendocrine cells and lymphocytes in the gut mucosa of rhesus macaques (Macaca mulatta) is suggestive of a role for enterochromaffin cell 5-HT in mucosal immunity. *J Neuroimmunol* 2004;146:46-49
89 Staszewski S, Schieck E, Rehmet S, Helm EB, Stille W. HIV transmission from male after only two sexual contacts. *Lancet* 1987;2:628
90 Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367-377
91 Mostad SB. Prevalence and correlates of HIV type 1 shedding in the female genital tract. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14 (Suppl 1):S11-15
92 Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, Serwadda D, Li C, Kiwanuka N, Hillier SL, Rabe L, Gaydos CA, Quinn TC, Konde-Lule J. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997;350:546-550
93 Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, Spear GT. Female genital-tract HIV load correlates inversely with Lactobacillus species but positively with bacterial vaginosis and Mycoplasma hominis. *J Infect Dis* 2005;191:25-32
94 Kunanusont C, Foy HM, Kreiss JK, Rerks-Ngarm S, Phanuphak P, Raktham S, Pau CP, Young NL. HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand. *Lancet* 1995;345:1078-1083
95 Murray MC, Embree JE, Ramdahin SG, Anzala AO, Njenga S, Plummer FA. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 viral genotype on mother-to-child transmission of HIV-1. J *Infect Dis* 2000;181:746-749
96 Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, Sutthent R, Wasi C, Vithayasai P, Vithayasai V, Apichartpiyakul C, Auewarakul P, Pena Cruz V, Chui DS, Osathanondh R, Mayer K, Lee TH, Essex M. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 1996;271:1291-1293
97 Yoshino N, Naganawa S, Nakasone T, Imura S, Kita T, Honda M. Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Japan, 1989-1997: presence of two subtypes B and E with subtype E predominance. National Cooperative Study Investigators on Vertical Transmission of HIV-1. *Acta Paediatr*

Jpn 1998;40:503-509
98 Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997;3:1369-1375
99 Essex M. Human immunodeficiency viruses in the developing world. *Adv Virus Res* 1999;53:71-88
100 Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, Kariuki C, Ngugi EN, MacDonald KS, Ball TB, Clerici M, Plummer FA. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 1999;13:23-29
101 Mazzoli S, Trabattoni D, Lo Caputo S, Piconi S, Ble C, Meacci F, Ruzzante S, Salvi A, Semplici F, Longhi R, Fusi ML, Tofani N, Biasin M, Villa ML, Mazzotta F, Clerici M. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med* 1997;3:1250-1257
102 Mazzoli S, Lopalco L, Salvi A, Trabattoni D, Lo Caputo S, Semplici F, Biasin M, Bl C, Cosma A, Pastori C, Meacci F, Mazzotta F, Villa ML, Siccardi AG, Clerici M. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J Infect Dis* 1999;180:871-875
103 Clerici M, Barassi C, Devito C, Pastori C, Piconi S, Trabattoni D, Longhi R, Hinkula J, Broliden K, Lopalco L. Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* 2002;16:1731-1741
104 Belec L, Ghys PD, Hocini H, Nkengasong JN, Tranchot-Diallo J, Diallo MO, Ettiegne-Traore V, Maurice C, Becquart P, Matta M, Si-Mohamed A, Chomont N, Coulibaly IM, Wiktor SZ, Kazatchkine MD. Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J Infect Dis* 2001;184:1412-1422
105 Beyrer C, Artenstein AW, Rugpao S, Stephens H, VanCott TC, Robb ML, Rinkaew M, Birx DL, Khamboonruang C, Zimmerman PA, Nelson KE, Natpratan C. Epidemiologic and biologic characterization of a cohort of human immunodeficiency virus type 1 highly exposed, persistently seronegative female sex workers in northern Thailand. Chiang Mai HEPS Working Group. *J Infect Dis* 1999;179:59-67
106 Devito C, Hinkula J, Kaul R, Lopalco L, Bwayo JJ, Plummer F, Clerici M, Broliden K. Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. *AIDS* 2000;14:1917-1920
107 Devito C, Broliden K, Kaul R, Svensson L, Johansen K, Kiama P, Kimani J, Lopalco L, Piconi S, Bwayo JJ, Plummer F, Clerici M, Hinkula J. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol* 2000;165:5170-5176
108 Carreno MP, Krieff C, Irinopoulou T, Kazatchkine MD, Belec L. Enhanced transcytosis of R5-tropic human immunodeficiency virus across tight monolayer of polarized human endometrial cells under pro-inflammatory conditions. *Cytokine* 2002;20:289-294
109 Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, Njagi E, MacDonald KS, Bwayo JJ, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol* 2000;164:1602-1611
110 Promadej N, Costello C, Wernett MM, Kulkarni PS, Robison VA, Nelson KE, Hodge TW, Suriyanon V, Duerr A, McNicholl JM. Broad human immunodeficiency virus (HIV)-specific T cell responses to conserved HIV proteins in HIV-seronegative women highly exposed to a single HIV-infected partner. *J Infect Dis* 2003;187:1053-1063
111 Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996;2:1240-1243
112 Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet* 1998;351:1632-1633
113 Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, Wolinsky SM, Zhang L, Guo Y, Deutsch L, Phair J, Neumann AU, Ho DD. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med* 1998;4:350-353
114 Rizzardi GP, Morawetz RA, Vicenzi E, Ghezzi S, Poli G, Lazzarin A, Pantaleo G. CCR2 polymorphism and HIV disease. Swiss HIV Cohort. *Nat Med* 1998;4:252-253
115 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
116 Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833-835
117 Balotta C, Bagnarelli P, Corvasce S, Mazzucchelli R, Colombo MC, Papagno L, Santambrogio S, Ridolfo AL, Violin M, Berlusconi A, Velleca R, Facchi G, Moroni M, Clementi M, Galli M. Identification of two distinct subsets of long-term nonprogressors with divergent viral activity by stromal-derived factor 1 chemokine gene polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1999;180:285-289
118 Hendel H, Henon N, Lebuanec H, Lachgar A, Poncelet H, Caillat-Zucman S, Winkler CA, Smith MW, Kenefic L, O'Brien S, Lu W, Andrieu JM, Zagury D, Schachter F, Rappaport J, Zagury JF. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;19:381-386
119 van Rij RP, Broersen S, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* 1998;12:F85-90
120 Verani A, Lusso P. Chemokines as natural HIV antagonists. *Curr Mol Med* 2002;2:691-702
121 Furci L, Scarlatti G, Burastero S, Tambussi G, Colognesi C, Quillent C, Longhi R, Loverro P, Borgonovo B, Gaffi D, Carrow E, Malnati M, Lusso P, Siccardi AG, Lazzarin A, Beretta A. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med* 1997;186:455-460
122 Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med* 1996;2:412-417
123 Nilssen DE, Oktedalen O, Brandtzaeg P. Intestinal B cell hyperactivity in AIDS is controlled by highly active antiretroviral therapy. *Gut* 2004;53:487-493
124 Sharpstone D, Gazzard B. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. *Lancet* 1996;348:379-383
125 Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, Klein EB, Holt PR. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1984;101:421-428
126 Teixeira Junior AL, Nobre V, Lambertucci JR. Respiratory failure due to opportunistic diseases in AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35:411-412
127 Budhraja M, Levendoglu H, Kocka F, Mangkornkanok M, Sherer R. Duodenal mucosal T cell subpopulation and bacterial cultures in acquired immune deficiency syndrome. *Am J*

Gastroenterol 1987;82:427-431
128 Ellakany S, Whiteside TL, Schade RR, van Thiel DH. Analysis of intestinal lymphocyte subpopulations in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Am J Clin Pathol* 1987;87:356-364
129 Jarry A, Cortez A, Rene E, Muzeau F, Brousse N. Infected cells and immune cells in the gastrointestinal tract of AIDS patients. An immunohistochemical study of 127 cases. *Histopathology* 1990;16:133-140
130 Lim SG, Condez A, Lee CA, Johnson MA, Elia C, Poulter LW. Loss of mucosal CD4 lymphocytes is an early feature of HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1993;92:448-454
131 Rodgers VD, Fassett R, Kagnoff MF. Abnormalities in intestinal mucosal T cells in homosexual populations including those with the lymphadenopathy syndrome and acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology* 1986;90:552-558
132 Ullrich R, Zeitz M, Heise W, L'age M, Ziegler K, Bergs C, Riecken EO. Mucosal atrophy is associated with loss of activated T cells in the duodenal mucosa of human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. *Digestion* 1990;46 (Suppl 2):302-307
133 Clayton F, Snow G, Reka S, Kotler DP. Selective depletion of rectal lamina propria rather than lymphoid aggregate CD4 lymphocytes in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1997;107: 288-292
134 Schneider T, Ullrich R, Bergs C, Schmidt W, Riecken EO, Zeitz M. Abnormalities in subset distribution, activation, and differentiation of T cells isolated from large intestine biopsies in HIV infection. The Berlin Diarrhoea/Wasting Syndrome Study Group. *Clin Exp Immunol* 1994 ;95:430-435
135 Schneider T, Jahn HU, Schmidt W, Riecken EO, Zeitz M, Ullrich R. Loss of CD4 T lymphocytes in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 is more pronounced in the duodenal mucosa than in the peripheral blood. Berlin Diarrhea/Wasting Syndrome Study Group. *Gut* 1995;37:524-529
136 Kundu SK, Merigan TC. Equivalent recognition of HIV proteins, Env, Gag and Pol, by CD4+ and CD8+ cytotoxic T-lymphocytes. *AIDS* 1992;6:643-649
137 Nixon DF, McMichael AJ. Cytotoxic T-cell recognition of HIV proteins and peptides. *AIDS* 1991;5:1049-1059
138 Walker BD, Flexner C, Paradis TJ, Fuller TC, Hirsch MS, Schooley RT, Moss B. HIV-1 reverse transcriptase is a target for cytotoxic T lymphocytes in infected individuals. *Science* 1988;240:64-66
139 Brodie SJ, Patterson BK, Lewinsohn DA, Diem K, Spach D, Greenberg PD, Riddell SR, Corey L. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death. *J Clin Invest* 2000;105:1407-1417
140 Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* 1991;87:1462-1466
141 Sistig S, Lukac J, Vucicevic-Boras V, Delic D, Kusic Z. Salivary immunoglobulin A and G subclasses in HIV positive patients. *Eur J Med Res* 2003;8:543-548
142 Moja P, Tranchat C, Tchou I, Pozzetto B, Lucht F, Desgranges C, Genin C. Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mediated by parotid IgA of HIV-1-infected patients. *J Infect Dis* 2000;181:1607-1613
143 Raux M, Finkielsztejn L, Salmon-Ceron D, Bouchez H, Excler JL, Duliouist E, Grouin JM, Sicard D, Blondeau C. Comparison of the distribution of IgG and IgA antibodies in serum and various mucosal fluids of HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:1365-1376
144 Wu X, Hall S, Jackson S. Tropism-restricted neutralization by secretory IgA from parotid saliva of HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:275-281
145 Wright PF, Kozlowski PA, Rybczyk GK, Goepfert P, Staats HF, VanCott TC, Trabattoni D, Sannella E, Mestecky J. Detection of mucosal antibodies in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1291-1300
146 Eriksson K, Kilander A, Hagberg L, Norkrans G, Holmgren J, Czerkinsky C. Intestinal antibody responses to oral vaccination in HIV-infected individuals. *AIDS* 1993;7:1087-1091
147 Mathewson JJ, Jiang ZD, DuPont HL, Chintu C, Luo N, Zumla A. Intestinal secretory IgA immune response against human immunodeficiency virus among infected patients with acute and chronic diarrhea. *J Infect Dis* 1994;169:614-617
148 Ott M, Wegner A, Caspary WF, Lembcke B. Intestinal absorption and malnutrition in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Z Gastroenterol* 1993;31:661-665
149 Ullrich R, Zeitz M, Heise W, L'age M, Hoffken G, Riecken EO. Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV): evidence for HIV-induced enteropathy. *Ann Intern Med* 1989;111:15-21
150 Zeitz M, Ullrich R, Schneider T, Kewenig S, Hohloch K, Riecken EO. HIV/SIV enteropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:139-148
151 Canani RB, Cirillo P, Mallardo G, Buccigrossi V, Secondo A, Annunziato L, Bruzzese E, Albano F, Selvaggi F, Guarino A. Effects of HIV-1 Tat protein on ion secretion and on cell proliferation in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:368-376
152 Zund G, Madara JL, Dzus AL, Awtrey CS, Colgan SP. Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. *J Biol Chem* 1996;271:7460-7464
153 Asmuth DM, Hammer SM, Wanke CA. Physiological effects of HIV infection on human intestinal epithelial cells: an in vitro model for HIV enteropathy. *AIDS* 1994;8:205-211
154 Phillips DM, Bourinbaiar AS. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* 1992;186:261-273
155 Zippel T, Schneider T, Schmidt W, Koppe S, Riecken EO, Ullrich R. Identification of CMV-specific immunoglobulin production by intestinal biopsies of AIDS patients with CMV enteritis. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:271-275
156 Hailemariam G, Kassu A, Abebe G, Abate E, Damte D, Mekonnen E, Ota F. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a teaching hospital, Ethiopia. *Jpn J Infect Dis* 2004;57:41-43
157 Escobedo AA, Nunez FA. Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. *Acta Trop* 1999;72:125-130
158 Lehner T, Bergmeier L, Wang Y, Tao L, Mitchell E. A rational basis for mucosal vaccination against HIV infection. *Immunol Rev* 1999;170:183-196
159 Letvin NL. Progress in the development of an HIV-1 vaccine. *Science* 1998;280:1875-1880
160 Letvin NL. Strategies for an HIV vaccine. *J Clin Invest* 2002; 110:15-20
161 McMichael A, Hanke T. The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible? *Nat Rev Immunol* 2002;2: 283-291
162 Nabel G, Makgoba W, Esparza J. HIV-1 diversity and vaccine development. *Science* 2002;296:2335
163 McMichael AJ, Hanke T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med* 2003;9:874-880
164 Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, MacDonald KS, Ngugi EN, Plummer FA. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* 1996;348:1347-1351
165 Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C, Desgranges C. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 1998;9:277-287
166 Alimonti JB, Koesters SA, Kimani J, Matu L, Wachihi C, Plummer FA, Fowke KR. CD4+ T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women. *J Infect Dis* 2005;191:20-24
167 Alfsen A, Iniguez P, Bouguyon E, Bomsel M. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J Immunol* 2001; 166:6257-6265

168 Ferrantelli F, Ruprecht RM. Neutralizing antibodies against HIV-back in the major leagues? *Curr Opin Immunol* 2002;14:495-502
169 Gorny MK, Williams C, Volsky B, Revesz K, Cohen S, Polonis VR, Honnen WJ, Kayman SC, Krachmarov C, Pinter A, Zolla-Pazner S. Human monoclonal antibodies specific for conformation-sensitive epitopes of V3 neutralize human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from various clades. *J Virol* 2002;76:9035-9045
170 Goulder PJ, Rowland-Jones SL, McMichael AJ, Walker BD. Anti-HIV cellular immunity: recent advances towards vaccine design. *AIDS* 1999;13(Suppl A):S121-36
171 Heeney JL, Teeuwsen VJ, van Gils M, Bogers WM, De Giuli Morghen C, Radaelli A, Barnett S, Morein B, Akerblom L, Wang Y, Lehner T, Davis D.beta-chemokines and neutralizing antibody titers correlate with sterilizing immunity generated in HIV-1 vaccinated macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10803-10808
172 Letvin NL, Schmitz JE, Jordan HL, Seth A, Hirsch VM, Reimann KA, Kuroda MJ. Cytotoxic T lymphocytes specific for the simian immunodeficiency virus. *Immunol Rev* 1999;170:127-134
173 Montefiori DC, Graham BS, Zhou J, Zhou J, Bucco RA, Schwartz DH, Cavacini LA, Posner MR. V3-specific neutralizing antibodies in sera from HIV-1 gp160-immunized volunteers block virus fusion and act synergistically with human monoclonal antibody to the conformation-dependent CD4 binding site of gp120. NIH-NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *J Clin Invest* 1993;92:840-847
174 Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS* 1999;13(Suppl A):S137-162
175 Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katinger H, Parren PW, Mosier DE, Burton DR. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* 1999;10:431-438
176 Rowland-Jones S, Tan R, McMichael A. Role of cellular immunity in protection against HIV infection. *Adv Immunol* 1997;65:277-346
177 Ruprecht RM, Ferrantelli F, Kitabwalla M, Xu W, McClure HM. Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge. *Vaccine* 2003;21:3370-3373
178 Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghrayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999;283:857-860
179 Veazey RS, Shattock RJ, Pope M, Kirijan JC, Jones J, Hu Q, Ketas T, Marx PA, Klasse PJ, Burton DR, Moore JP. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat Med* 2003;9:343-346
180 Putkonen P, Thorstensson R, Ghavamzadeh L, Albert J, Hild K, Biberfeld G, Norrby E. Prevention of HIV-2 and SIVsm infection by passive immunization in cynomolgus monkeys. *Nature* 1991;352:436-438
181 Watkins BA, Reitz MS Jr, Wilson CA, Aldrich K, Davis AE, Robert-Guroff M. Immune escape by human immunodeficiency virus type 1 from neutralizing antibodies: evidence for multiple pathways. *J Virol* 1993;67:7493-7500
182 Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma HL, Grimm BD, Hulsey ML, Miller J, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 2001;292:69-74
183 Belyakov IM, Derby MA, Ahlers JD, Kelsall BL, Earl P, Moss B, Strober W, Berzofsky JA. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1709-1714

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

汤钊猷院士当选美国外科学会名誉会员

本刊6月27日讯 在125届美国外科学会年会的开幕式上，复旦大学医学院中山医院肝癌研究所所长、中国工程院院士汤钊猷教授当选为该学会2004年度名誉会员. 这是汤钊猷院士继2002年获中国香港外科医院名誉院士和2004年全国“白求恩奖章”后获得的又一殊荣.

据介绍，美国外科学会建于1880年，是美国历史最长、最有声望的外科协会. “名誉会员”是该学会给予外国学者的最高荣誉，迄今共选出23个国家的67位名誉会员，除英国最多外，多数国家仅有1-2位，在我国仅香港大学的John Wong和汤钊猷院士获此荣誉.

美国外科学会主席Polk教授指出：“汤钊猷教授是一位世界广泛公认的肝癌专家，他在实验室和手术室的贡献，拓宽了有关肝癌的基础知识，并提高了治疗水平；尤其在小肝癌的研究和不能切除肝癌的缩小后切除方面做出了贡献. 作为中国工程院院士、中华医学会副会长以及上海医科大学校长，对国家的公共事业也做出了显著贡献. 作为一位对人民无私奉献以及在外科学术上有极高境界的医生，汤钊猷毫无疑问值得当选为美国外科学会名誉会员. ”

汤钊猷院士在致答谢辞时说，他的当选不仅仅是个人荣誉，也是美国外科医生和中国外科医生间友谊的象征，希望通过他的当选，有助于加强两国外科界的学术交流与友谊.

·研究快报·

胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立

陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏

陈小燕, 温州医学院附属第二医院消化内科 浙江省温州市 325027
李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433
国家自然科学基金资助项目, No. 30270504
通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科. zhsli@81890.net
电话: 021-25070552 传真: 021-65341735
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 采用健康♂Sprague-Dwley(SD)大鼠建立胰腺外分泌功能研究的动物模型.

方法: 取体质量300-350 g SD大鼠16只，随机分为两组(对照组8只，实验组8只).麻醉后在大鼠幽门下5 mm和十二指肠、空肠交界处分别置直径2 mm的塑料管并固定;从十二指肠乳头Oddi括约肌处留置直径0.7 mm的塑料管.稳定30 min后，每隔15 min收集一次胆胰混合液，测定体积后留取100 μL胆胰混合液，用双蒸水稀释以测定蛋白含量，剩余的胆胰混合液在下一收集时间内灌入十二指肠.收集4管基础状态胆胰混合液后，实验组以3 mL/h的速度向十二指肠内灌注200 g/L脂肪乳液2 h，并收集8管胆胰混合液进行体积和蛋白测定.对照组不进行十二指肠灌注.

结果: SD大鼠胰管插管后均有澄清淡黄色胆胰混合液流出.十二指肠灌注200 g/L脂肪乳后胆胰混合液体积较基础状态增加54.17%(P<0.01);蛋白分泌量较基础状态增加115.1%(P<0.01)，实验组十二指肠灌注后胰液的蛋白含量和胰液体积均较灌注前升高，对照组胰液蛋白含量和体积无变化.

结论: 本实验成功建立胰腺外分泌功能研究的SD大鼠模型，优点在于可以直接收集胆胰混合液进行各项指标测定，反映胰腺外分泌功能，是一个有效、可靠，重复性好的动物模型.

陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏. 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1760-1762
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1760.asp

0 引言

到目前为止，国内关于直接测定胰液以研究胰腺外分泌功能的大鼠模型鲜见报道，1990年袁葆直 *et al*[1]对胰腺外分泌功能的研究曾经用Wistar大鼠胰腺插管收集胰液.以后国内学者多采用大鼠血清葡萄糖、血清淀粉酶、胰腺组织淀粉酶、胰腺腺泡^{3}H-亮氨酸掺入的测定等来间接反映胰腺外分泌功能的改变[2]，但具有局限性.为此，我们参考文献[3-6]，采用健康♂Sprague-Dwley(SD)大鼠建立胰腺外分泌功能研究的动物模型，这样就可以直接收集大鼠胰液测定胰液的体积、碳酸氢根浓度和蛋白浓度以直观反映胰腺外分泌功能，在此基础上可进一步研究胰腺外分泌功能的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 体质量300-350 g的健康♂SD大鼠(西普尔-必凯实验动物有限公司)16只，随机分为两组，对照组8只，实验组8只.200 g/L脂肪乳液购自广东侨光制药有限公司，直径2 mm的塑料管改良自扬州市长城医疗器械厂制造的一次性使用静脉输液针，恒流泵HL-2B购自上海市清浦沪西仪器厂，一次性使用intima-Ⅱ静脉留置针购自江苏碧迪医疗器械有限公司，微量进样器购自上海安亭微量进样器厂，BCA蛋白质检测试剂盒购自PIERCE公司.

1.2 方法 实验组动物禁食过夜，实验前2 h禁水.以20 g/L氯胺酮(60-80 mg/kg)腹腔麻醉后固定于恒温金属板上，维持肛温37℃.实验过程中每30 min追加一次1/3麻醉剂量的氯氨酮.用安尔碘消毒腹部皮肤后，沿腹正中切口开腹，暴露胃及十二指肠、胰腺，在幽门下5 mm和十二指肠、空肠交界处分别留置直径2 mm的塑料管并固定以待十二指肠脂肪乳的灌注，仔细分离幽门周围结缔组织后结扎幽门，结扎空肠上段;暴露胰管，从十二指肠乳头处顺畅无阻力地插入外径0.7 mm的一次性使用intima-Ⅱ静脉留置针，拔出针芯，固定留置针导管以收集胰液.动物稳定30 min后，每隔15 min收集一次胰液，测定体积后留取100 μL胰液用双蒸水稀释以测定蛋白含量，其余部分胰液在下一收集时段内从幽门下留置管内匀速注入十二指肠.收集4管基础状态胰液后开始以恒流泵HL-2B按3 mL/h的速度向十二指肠内灌注200 g/L脂肪乳液2 h，并收集8管灌注后胰液.对照组除了不进行十二指肠灌注外，其余处理同实验组.

1.3 观察指标 (1)胰液体积测定:采用微量进样器测定胰液体积(mL).(2)胰液蛋白测定:采用BCA法.操作流程严格按照BCA蛋白质检测试剂盒说明书进行.

统计学处理 实验数据以means±SD表示，应用SPSS 11.0统计软件，采用 t 检验对各组均数进行显著性检验，P<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 十二指肠灌注前后大鼠单位时间内胰液分泌体积的改变 对照组180 min内单位时间(15 min)分泌的胰液体积无明显变化，实验组十二指肠内灌注200 g/L脂肪乳液2 h后单位时间分泌的胰液体积均值较注射前增加31.6%(P<0.01).对照组和实验组在后120 min内胰液的蛋白分

泌量各时间点均值比较，在第105、120、165、180 min有显著性差别($P<0.05$)(图1).

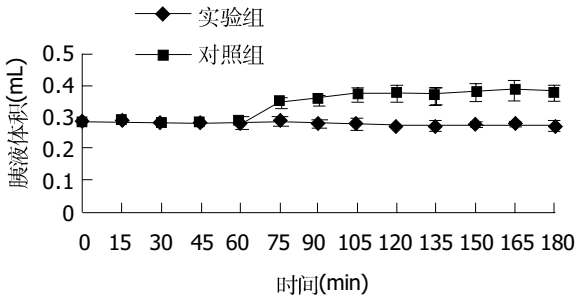


图1 两组大鼠单位时间分泌的胰液体积.

2.2 十二指肠灌注前后大鼠单位时间内胰液蛋白分泌量的改变 单位时间的胰液蛋白分泌量根据单位时间内分泌的胰液体积乘以同时间段内胰液的蛋白含量计算，以15 min为一个单位.对照组180 min内胰液蛋白分泌量无明显变化，实验组十二指肠内灌注200 g/L脂肪乳液2 h后胰液蛋白分泌量增加115.1%($P<0.01$).对照组和实验组在后120 min内胰液蛋白分泌量各时间点均值比较均有显著性差别($P<0.01$)(图2).

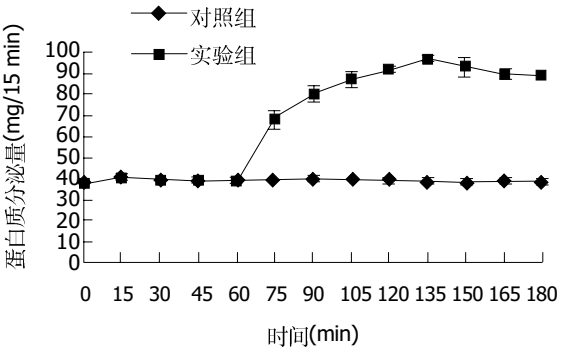


图2 两组大鼠胰液蛋白分泌量.

3 讨论

餐后胰腺外分泌是食物消化吸收过程中的重要组成部分，目前认为这一过程主要由内分泌激素胆囊收缩素(cholecystokinin，CCK)及迷走-迷走反射作用于胰腺的迷走神经胆碱能节后神经调节[7-11].但餐后迷走神经信号的上传、中枢整合后控制胰腺分泌信号的下传神经通路及在这一通路中参与的神经递质还未阐明.但是到目前为止，国内关于直接测定胰液以研究胰腺外分泌功能的大鼠模型鲜有报道.因此，有必要建立一个有效、可靠、重复性好的动物模型以进行胰腺外分泌调节机制的进一步研究.

胰腺外分泌的调节分为头相、胃相和肠相.其中肠相是调节胰腺分泌最重要的组成部分.食物进入小肠后，蛋白、脂肪和胃酸通过复杂的网络系统包括激素和神经递质产生局部的肠胰反射进一步刺激胰腺分泌.实验证明[12]:在长期应用阿托品以及迷走神经切除者的十二指肠刺激对于胰腺外分泌的影响较小.由于十二指肠黏膜的迷走神经初级传入纤维含有大量CCK-A及5-羟色胺(5-hydroxytryptamine，5-HT)受体，肠道内的刺激，如碳水化合物、高渗盐水及黏膜磨擦等，可导致肠黏膜嗜铬细胞(enterochromaffin cell，EC)释放5-HT，继而作用于迷走传入神经末梢的5-HT_3受体，引起迷走反射主导的胰腺分泌.本研究建立的动物模型希望能够通过十二指肠灌注营养物质，观察灌注前后收集的腺外分泌功能的改变，从而能够进一步进行胰腺外分泌调控机制的研究.

胰液是无色、无嗅的碱性液体，pH约为7.8-8.4，胰液中含有无机物和有机物.在无机成分中，碳酸氢盐的含量很高.胰液中的有机物主要是蛋白，由多种消化酶组成，含量由0.1-10%不等，随分泌的速度不同而有不同.因此，可通过测定单位时间胰液的体积和单位时间蛋白分泌量直接反映胰腺外分泌功能的改变.

本实验建立胰的外分泌功能研究的大鼠模采用两组动物胰管插管内均有澄清淡黄色胰液流出，直接收集胰液进行各项指标(体积、蛋白酶等)测定，观察胰液外分泌功能的改变，进一步可以进行各种胰腺外分泌功能的基础研究.本模型的优点就在于可以直接收集胰液进行各项指标测定，从而通过测定单位时间胰液的体积、碳酸氢根的浓度和单位时间蛋白分泌量，直接反映胰腺外分泌功能的改变.本模型的建立为大鼠胰腺外分泌功能调节机制的研究打下了基础，是一个有效、可靠，而且重复性很好的动物模型.

4 参考文献

1 袁葆直, 周吕. 侧脑室注射神经降压素对大鼠胰腺外分泌的影响. 基础医学与临床 1990;10:24-27
2 杨英魁, 朱文玉. 血糖浓度对糖尿病大鼠胰腺外分泌功能的影响. 生理学报 1994;46:52-58
3 Guan D, Phillips WT, Green GM. Pancreatic secretion stimulated by CCK is not mediated by capsaicin-sensitive vagal afferent pathway in awake rats. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):G881-G886
4 Li Y, Hao Y, Owyang C. Evidence for autoregulation of cholecystokinin secretion during diversion of bile pancreatic juice in rats. *Gastroenterology* 1995;109:231-238
5 Li Y, Wu XY, Zhu JX, Owyang C. Intestinal serotonin acts paracrine substance to mediate pancreatic secretion stimulated by luminal factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G916-G923
6 Li JP, Chang TM, Chey WY. Roles of 5-HT receptors in the release and action of secretion on pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G595-G602
7 Owyang C. Physiological mechanisms of cholecystokinin action on pancreatic secretion. *Am J Physiol* 1996;271(1 Pt 1):G1-G7
8 Niebergall-Roth E, Singer MV. Central and peripheral neural control of pancreatic exocrine secretion. *J Physiol Pharmacol* 2001;52(4 Pt 1):523-538
9 Li Y, Owyang C. Endogenous cholecystokinin stimulated pancreatic enzyme secretion via a vagal afferent pathway in rats. *Gastroenterology* 1994;107:525-531
10 Li Y, Hao Y, Owyang C. High-affinity CCK-A receptors on the vagus nerve mediates CCK-stimulated pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol* 1997;273(3 Pt 1):G679-G685
11 Li Y, Owyang C. Pancreatic secretion evoked by cholecystokinin and non-cholecystokinin-dependent duodenal stimuli via

vagal afferent fibers in rats. *J Physiol* 1996;491(Pt 3):773-782
12 Adler G, Beglinger C, Braun U, Reinshagen M, Koop I, Schafmayer A, Rovati L, Arnold R. Interaction of the cholinergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 1991;100:537-543

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定

王 斌,魏 泓

王斌,魏泓,中国人民解放军第三军医大学基础医学部实验动物学教研室 重庆市 400038
通讯作者: 魏泓,400038,重庆市,中国人民解放军第三军医大学基础医学部实验动物学教研室. weihong@mail.tmmu.com.cn
电话:023-68752051 传真:023-68752051
收稿日期:2005-05-28 接受日期:2005-06-08

摘要

目的: 提取和鉴定参与乳杆菌黏附肠上皮样细胞以及粘蛋白受体的细胞壁表面蛋白.

方法: 采用HRP标记的粘蛋白受体以及NHS-Biotin标记的HT-29细胞与提取的乳杆菌JCM1081的细胞壁表面蛋白进行蛋白印迹,对参与黏附的细胞壁表面蛋白进行初步鉴定.

结果: Western blot结果显示M_r 29 000和M_r 14 000的两种细胞壁表面蛋白在与粘蛋白受体和HT-29细胞的杂交中都出现了强阳性.

结论: 存在于乳杆菌JCM1081细胞壁表面的M_r 29 000和M_r 14 000的两种蛋白能够特异性识别粘蛋白受体和细胞膜受体,并与之结合,为乳杆菌JCM1081的黏附相关蛋白.

王斌,魏泓.乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定.世界华人消化杂志 2005;13(14):1762-1766
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1762.asp

0 引言

乳杆菌是人体肠道内正常的生理性有益菌,是肠黏膜生物屏障的主要组成部分,进入肠道内的乳杆菌通过黏附、定植于肠黏膜表面以保护肠黏膜上皮细胞免受各种病原微生物的损伤,所以乳杆菌在肠道内的黏附、定植是其发挥生理作用的前提和基础.黏附是细菌与宿主细胞相互作用的第一步,黏附过程首先是细菌的黏附素与宿主细胞表面的特异性黏附素受体识别,并与之结合,其后才引起一系列细胞变化过程.早在1985年,Op den Camp *et al*[1]在研究双歧杆菌黏附时发现,其细胞壁脂磷壁酸(LTA)与其黏附有关,提示LTA参与了乳杆菌对肠上皮细胞的黏附.LTA可能先锚定于细菌表面蛋白分子上,然后通过其脂类部分与宿主细胞表面的纤维连结蛋白结合[2].随后,一些学者又先后发现乳杆菌的胞壁表面蛋白以及胞外分泌型蛋白等也与黏附有关[3-4],而且在有些乳杆菌的外表面,还发现存在有一层呈单分子晶体排列的S层蛋白,也参与了乳杆菌的黏附[5-6].但到目前为止,对其黏附的具体机制以及黏附素蛋白仍缺乏较为深入的研究.为此本实验通过提取乳杆菌细胞壁表面蛋白,对其参与黏附的表面蛋白进行了初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)JCM1081,购自日本理化研究所微生物保藏中心.人结肠癌细胞株HT-29,ATCC编号HTB-38,由西南医院中心实验室惠赠.胰蛋白酶购自华美生物科技公司,新生牛血清购自天津TBD公司,DMEM培养基购自Gibco公司,粘蛋白、辣根过氧化物酶(HRP)、弗氏完全佐剂和不完全佐剂均购自Sigma公司,Sulfo-NHS-Biotin购自PIERCE公司,HRP-羊抗兔IgG和DAB显色试剂盒均购自博士德生物公司.

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 罗伊氏乳杆菌JCM1081在含100 mL/L甘油的MRS中-80℃保存,将以上菌株接种于新鲜配制的MRS液体培养基,37℃培养24 h.

1.2.2 细胞培养 将HT-29细胞置于含100 mL/L热灭活的新生牛血清和双抗(青霉素、链霉素浓度各为10 万U/L)的DMEM细胞培养液中,37℃、100 mL/L CO_2的二氧化碳培养箱中孵育,每天换液一次,每周传代一次,15-20 d后进行实验.

1.2.3 乳杆菌细胞壁表面蛋白的提取 采用Aleljung和

vagal afferent fibers in rats. *J Physiol* 1996;491(Pt 3):773-782
12 Adler G, Beglinger C, Braun U, Reinshagen M, Koop I, Schafmayer A, Rovati L, Arnold R. Interaction of the cholinergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 1991;100:537-543

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定

王 斌,魏 泓

王斌,魏泓,中国人民解放军第三军医大学基础医学部实验动物学教研室 重庆市 400038
通讯作者: 魏泓,400038,重庆市,中国人民解放军第三军医大学基础医学部实验动物学教研室. weihong@mail.tmmu.com.cn
电话:023-68752051 传真:023-68752051
收稿日期:2005-05-28 接受日期:2005-06-08

摘要

目的: 提取和鉴定参与乳杆菌黏附肠上皮样细胞以及粘蛋白受体的细胞壁表面蛋白.

方法: 采用HRP标记的粘蛋白受体以及NHS-Biotin标记的HT-29细胞与提取的乳杆菌JCM1081的细胞壁表面蛋白进行蛋白印迹,对参与黏附的细胞壁表面蛋白进行初步鉴定.

结果: Western blot结果显示M_r 29 000和M_r 14 000的两种细胞壁表面蛋白在与粘蛋白受体和HT-29细胞的杂交中都出现了强阳性.

结论: 存在于乳杆菌JCM1081细胞壁表面的M_r 29 000和M_r 14 000的两种蛋白能够特异性识别粘蛋白受体和细胞膜受体,并与之结合,为乳杆菌JCM1081的黏附相关蛋白.

王斌,魏泓.乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定.世界华人消化杂志 2005;13(14):1762-1766
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1762.asp

0 引言

乳杆菌是人体肠道内正常的生理性有益菌,是肠黏膜生物屏障的主要组成部分,进入肠道内的乳杆菌通过黏附、定植于肠黏膜表面以保护肠黏膜上皮细胞免受各种病原微生物的损伤,所以乳杆菌在肠道内的黏附、定植是其发挥生理作用的前提和基础.黏附是细菌与宿主细胞相互作用的第一步,黏附过程首先是细菌的黏附素与宿主细胞表面的特异性黏附素受体识别,并与之结合,其后才引起一系列细胞变化过程.早在1985年,Op den Camp *et al*[1]在研究双歧杆菌黏附时发现,其细胞壁脂磷壁酸(LTA)与其黏附有关,提示LTA参与了乳杆菌对肠上皮细胞的黏附.LTA可能先锚定于细菌表面蛋白分子上,然后通过其脂类部分与宿主细胞表面的纤维连结蛋白结合[2].随后,一些学者又先后发现乳杆菌的胞壁表面蛋白以及胞外分泌型蛋白等也与黏附有关[3-4],而且在有些乳杆菌的外表面,还发现存在有一层呈单分子晶体排列的S层蛋白,也参与了乳杆菌的黏附[5-6].但到目前为止,对其黏附的具体机制以及黏附素蛋白仍缺乏较为深入的研究.为此本实验通过提取乳杆菌细胞壁表面蛋白,对其参与黏附的表面蛋白进行了初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)JCM1081,购自日本理化研究所微生物保藏中心.人结肠癌细胞株HT-29,ATCC编号HTB-38,由西南医院中心实验室惠赠.胰蛋白酶购自华美生物科技公司,新生牛血清购自天津TBD公司,DMEM培养基购自Gibco公司,粘蛋白、辣根过氧化物酶(HRP)、弗氏完全佐剂和不完全佐剂均购自Sigma公司,Sulfo-NHS-Biotin购自PIERCE公司,HRP-羊抗兔IgG和DAB显色试剂盒均购自博士德生物公司.

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 罗伊氏乳杆菌JCM1081在含100 mL/L甘油的MRS中-80℃保存,将以上菌株接种于新鲜配制的MRS液体培养基,37℃培养24 h.

1.2.2 细胞培养 将HT-29细胞置于含100 mL/L热灭活的新生牛血清和双抗(青霉素、链霉素浓度各为10 万U/L)的DMEM细胞培养液中,37℃、100 mL/L CO_2的二氧化碳培养箱中孵育,每天换液一次,每周传代一次,15-20 d后进行实验.

1.2.3 乳杆菌细胞壁表面蛋白的提取 采用Aleljung和

Maurilia的方法[7-8].方法1:将-80℃低温保存的乳杆菌JCM1081菌种按10 mL/L的比例接种于新鲜配制的MRS培养基中，37℃培养24 h，培养至稳定期，收集菌体离心(6 000 *g*)15 min，并用冷的PBS缓冲液洗涤细菌2次，最后用20 mL PBS重悬菌体.在重悬液中加入溶菌酶(2 g/L)，37℃温育1 h.将上述重悬液离心(12 000 *g*) 15 min，沉淀菌体用1 mol/L氯化锂重悬，20℃温育20 h.离心收集上清(8 000 *g*，30 min)，上清液在0.01 mol/L PBS中4℃透析过夜，收集样品，冻干后备用.方法2:将-80℃低温保存的乳杆菌JCM1081菌种按10 mL/L的比例接种于新鲜配制的MRS培养基中，37℃培养24 h，培养至稳定期，收集菌体离心(6 000 *g*)15 min，并用冷的PBS缓冲液洗涤细菌2次.然后加入含30 mmol/L碳酸铵、1 mmol/L苯甲基磺酰氟、5 mmol/L EDTA以及10 g/L蔗糖(pH 8.0)溶液重悬菌体，后加入含2 000 U的变溶菌素、20 mg(10 900 kat/mg)溶菌酶的混合裂解液，37℃共孵育30-60 min，通过测定其A_{590}，以检测其原生质体的形成率.将上述菌液以10 000 *g*离心10 min，4℃，上清液在50 mmol/L碳酸氢铵溶液中(pH 7.0)透析过夜，收集样品贮于-20℃.

1.2.4 *粘蛋白的标记* 取粘蛋白溶解于0.1 mol/L碳酸盐缓冲液中(pH9.5)，配制成4 g/L的粘蛋白溶液;将HRP 8 mg溶解于2 mL蒸馏水中，配制成HRP溶液，然后加入至400 μL新鲜配制的0.1 mol/L过碘酸钠溶液中，混合物室温下搅拌20 min，然后置于0.001 mol/L(pH4.4)乙酸盐缓冲液中，4℃透析过夜;取出透析后的HRP，加入0.1 mol/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)20 μL调节pH至9.0-9.5;取1 mL粘蛋白和1 mL HRP溶液混合，置于室温下混合搅拌2 h，然后加入新鲜配制的4 g/L的硼氢化钠溶液100 μL以除去连接反应;混合液置于0.1 mol/L(pH7.4)的硼酸缓冲液中，4℃透析过夜，标记好的粘蛋白等体积加入800 mL/L甘油，-20℃保存.

1.2.5 *细胞的标记* 培养至单层的HT-29细胞用胰蛋白酶消化后，用PBS(pH8.0)洗涤3次，4℃，以除去培养基中所含有的其他蛋白.然后用PBS(pH8.0)重悬细胞，调整细胞浓度至2×10^9/L.加入标记物Sulfo-NHS-Biotin (1.0 g/L)，使其在细胞中的浓度为2 mmol/L(每毫升细胞悬液中加入200 μL 10 mmol/L Biotin).将细胞置于室温下共孵育30 min，然后用PBS+100 mmol/L甘氨酸洗涤细胞3次，以抑制和除去未标记的Biotin.

1.2.6 *乳杆菌多克隆抗体的制备* 将乳杆菌JCM1081菌液用灭菌的PBS洗涤2次后，用PBS重悬(浓度为$1\text{-}2\times10^{11}$ CFU/L)与弗氏完全佐剂等体积混合，乳化完全后，选用新西兰兔4只，每组2只，背部皮下和皮内多点注射，每点注射量0.2 mL左右.第1次免疫后，10-12 d后进行第2次注射，第2次注射采用不完全佐剂，开始出现IgG抗体;第2次注射后4 d，进行第3次注射，第2次与第3次注射方式和剂量同第1次.第3次注射后3 d，耳缘静脉采血ELISA检测抗体效价，如果效价较低可继续进行免疫，直到出现合适效价的抗体.

1.2.7 *罗伊氏乳杆菌JCM1081细胞壁表面蛋白的SDS-PAGE和Western Blot* 提取的罗伊氏乳杆菌JCM1081细胞壁表面蛋白进行SDS-PAGE，采用120 g/L分离胶和50 g/L浓缩胶的不连续浓度梯度，100 V恒压120 min.电泳完毕后，一部分胶用考马斯亮蓝R-250进行染色，另一部分胶移至电转膜仪上，将蛋白电转移至PVDF膜上，然后将HRP标记的粘蛋白和NHS-Biotin标记的细胞分别与PVDF膜上的蛋白置于37℃、100 mL/L CO_2培养箱中杂交孵育1 h，洗涤后加入DAB显色试剂，待显色后，用TBS洗涤膜以终止显色，出现棕色条带表明目的蛋白与黏附素受体结合.

将HT-29细胞接入T75 Flask中，加入DMEM培养液6 mL，置于37℃、100 mL/L CO_2培养箱中孵育，待长至单层细胞后，用灭菌的PBS(pH7.2)或0.05 mol/L乙酸钠缓冲液(pH5.0，含0.01 mol/L NaCl)洗涤2次.加入12 mL浓度为100 mg/L的JCM1081细胞壁表面蛋白液，37℃温育1 h，阴性对照中只加入相应的缓冲液.然后用上述缓冲液洗涤细胞3次.细胞用cell rubber pliceman刮取，并用缓冲液重悬，置于50 mL的Falcan tube中，再用缓冲液洗涤1次，并转入1.5 mL Eppendorf管中.在装有细胞的Eppendorf离心管中加入1 mL 0.1 mol/L盐酸-甘氨酸缓冲液(pH3.0)重悬细胞，进行洗脱，1 500 r/m离心5 min.上清液加入0.2 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液.然后置于330 g/L的PBS缓冲液中，4℃透析过夜.收集样品，进行SDS-PAGE，不连续浓度，50 g/L的浓缩胶和120 g/L分离胶，上样后，稳压100 V，120 min后将蛋白转移至PVDF膜上.用兔抗JCM1081的多克隆抗体进行杂交，洗膜后，再加入HRP-羊抗兔的IgG(1∶200)进行共孵育，最后用适当稀释的DAB显色液进行显色.另一部分样品进行同样的处理，即进行SDS-PAGE，然后用考马斯亮蓝进行染色.

2 结果

2.1 乳杆菌JCM1081细胞壁表面蛋白与粘蛋白受体结合的Western blot 采用两种不同的方法对罗伊氏乳杆菌JCM1081细胞壁表面蛋白进行了提取，将提取的细胞壁表面蛋白进行SDS-PAGE，从SDS-PAGE图谱中可以看出，利用方法1(溶菌酶结合氯化锂方法)提取得到的细胞壁表面蛋白与利用方法2(溶菌酶结合变溶菌素的方法)提取得到的细胞壁表面蛋白基本相似，但在M_r 29 000和M_r 14 000的范围内略有差异(图1).将上述两种方法提取得到的细胞壁表面蛋白进行SDS-PAGE，并将蛋白转移至PVDF膜上，然后与HRP标记的粘蛋白受体进行杂交，结果显示，

细胞壁表面蛋白，进行SDS-PAGE后分别与HRP标记的粘蛋白受体和NHS-Biotin标记的HT-29进行杂交，Western blot 结果显示，在乳杆菌JCM1081细胞壁表面蛋白中，M_r 29 000和M_r 14 000的两种蛋白在与粘蛋白和细胞的杂交中都出现了强阳性，表明这两种蛋白都能够特异性与粘蛋白受体和HT-29细胞结合，提示这两种蛋白可能参与了乳杆菌JCM1081与粘蛋白以及细胞的黏附.尤其对于与细胞的黏附，由于细胞膜表面分布有细菌黏附素的特异性受体，我们首次采用NHS-Biotin标记HT-29细胞，与电泳分离的乳杆菌细胞壁表面蛋白进行杂交，鉴定出与细胞膜受体特异性结合的乳杆菌细胞壁表面蛋白.Hayman *et al*[14]曾采用大鼠的肾细胞(NRK)与转移到纤维素膜上的血浆中的未知蛋白进行杂交，成功鉴定出一种新的与细胞黏附有关的血清扩散因子(SSF)，表明利用这种方法能够灵敏的检测到与细胞黏附的特异性蛋白.以上结果显示，M_r 29 000和M_r 14 000两种蛋白不仅可以和粘蛋白受体特异的结合，而且还能够与细胞膜受体特异性结合，表明这两种蛋白为乳杆菌JCM1081的黏附相关蛋白.

另外，我们将提取的乳杆菌JCM1081的细胞壁表面蛋白与细胞共孵育后，利用不同的缓冲液对黏附至细胞表面与膜受体特异性结合的蛋白进行洗脱，洗脱下来的蛋白进行免疫印迹，通过乳杆菌JCM1081的多克隆抗体对与膜受体特异性结合的乳杆菌细胞壁表面蛋白进行鉴定，结果显示，在M_r 29 000处有条阳性条带，表明这种M_r 29 000的蛋白为乳杆菌细胞壁表面蛋白，能够与细胞膜上的受体特异性给合.这与Granato *et al*[15]研究报道的结果不尽一致，Dominique研究发现分子量为M_r 50 000的EF-Tu是*Lactobacillus johnsonii* NCC533的黏附素蛋白，此黏附素蛋白参与了*Lactobacillus johnsonii* NCC533和HT-29细胞的黏附过程.这可能是由于乳杆菌JCM1081和约氏乳杆菌NCC533属不同的种，所以参与黏附的蛋白存在很大差异.但是与前面采用HRP标记的粘蛋白和NHS-Biotin标记的细胞检测到的黏附素蛋白一致，只是未出现M_r 14 000的杂交阳性条带，这可能是因为采用的抗JCM1081的抗体为多克隆抗体，M_r 14 000的蛋白未出现杂交阳性可能是由于此小分子蛋白免疫原性较低，或含量较少.但前面的实验已证实乳杆菌细胞壁表面蛋白中M_r 29 000和M_r 14 000这两种蛋白是参与乳杆菌与粘蛋白黏附的外表面黏附相关蛋白，而且可以和标记的HT-29细胞特异性结合，所以结合以上实验结果，提示M_r 29 000和M_r 14 000蛋白是乳杆菌JCM1081的黏附素蛋白，其不仅参与了乳杆菌与粘蛋白的黏附，同时也参与乳杆菌与肠上皮样细胞HT-29黏附.

Alelijung *et al*[7]在罗伊氏乳杆菌NCIB11951中发现了两个与Ⅰ型胶原黏附有关的细菌表面蛋白Cnb (Collagen binding protein，胶原结合蛋白)，Cnb蛋白M_r 29 000，氨基酸序列分析表明含有两个典型的胞外受体连接区的基序.Cnb基因上游的一个开放阅读框(ORF)与ATP连接组分有高度同源性，有别于S层蛋白家族.另一个Cnb蛋白M_r 31 000，与M_r 29 000的蛋白在抗原性方面有交叉反应，说明是同一类型相关蛋白，但其N-端氨基酸序列同源性较低，推测这可能是由于M_r 31 000蛋白由于修饰或降解，造成了N-端信号序列的缺失，由此引起分子量以及N-端氨基酸序列的不同.Maurilia *et al*[8]研究发现，在*Lactobacillus fermentum* 104R的细胞壁表面存在一种与其黏附有关的蛋白，称之为粘蛋白黏附促进蛋白(MAPP)，这种蛋白M_r 29 000，呈二聚体或多聚体，以非共价键连接在细菌表面，在细菌生长进入稳定期后，这种蛋白便可释放到培养上清中，此蛋白可介导*Lactobacillus fermentum* 104R与猪的小肠黏液以及猪胃粘蛋白的黏附，其N-端氨基酸序列与Cnb蛋白有一定的相似性.关于我们鉴定出的M_r 29 000蛋白是否与Cnb和MAPP为同一类蛋白，还有待于蛋白测序后进行深入的比较研究.

4 参考文献

1 Op den Camp HJ, Oosterhof A, Veerkamp JH. Interaction of bifidobacteria lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1985;47:332-334

2 Granato D, Perotti F, Masserey I, Rouvet M, Golliard M, Servin A, Brassart D. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacilus johnsonni* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:1071-1077

3 Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Fourniat J, Servin AL. Adhesion of human Lactobacillus acidophilus strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J Gen Microbiol* 1992;138 (Pt 8):1689-1696

4 Greene, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of *Lactobacilli* to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:4487-4494

5 Schneitz C, Nuotio L, Lounatma K. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer(S-layer). *J Appl Bacteriol* 1992;74:290–299

6 Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus M92*. *J App Microbiol* 2003;94:981-987

7 Aleljung P, Shen W, Rozalska B, Hellman U, Ljungh A, Wadstrom T. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr Microbiol* 1994;28:231-236

8 Rojas M, Ascencio F, Conway P. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2330-2336

9 Sajjan SU, Forstner JF. Characteristics of binding of *Escherichia coli* serotype O157: H7 strain CL-49 to purified intestinal mucin. *Infect Immun* 1990;58:860-867

10 Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkko S, Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol* 2001;64:119-126

11 Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:185-189

12 Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Lett Appl Microbiol* 1999;28:

159-163
13 Lorca G, Torino MI, Font de Valdez G, Ljungh A A. *Lactobacilli* express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 206:31-37
14 Hayman EG, Engvall E, A'Hearn E, Barnes D, Pierschbacher M, Ruoslahti E. Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins. *J Cell Biol* 1982;95:20-23
15 Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthesy-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of Lactobacillus johnsonii NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 2004;72:2160-2169

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用

郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周

郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周, 汕头大学医学院第二附属医院消化科 广东省汕头市 515041
通讯作者: 吴灵飞, 515041, 广东省汕头市东厦北路69号, 汕头大学医学院第二附属医院消化科. lingfeiwu@21cn.com
电话: 0754-8915810 传真: 0754-8346543
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)和促胃液素(gastrin, Gas)在胃癌前病变中的作用.

方法: 114例患者分为三组:浅表性胃炎组(CSG, $n = 49$)、萎缩性胃炎组(CAG, $n = 32$)和胃癌前病变组(GPL, $n = 33$), 另设正常对照组25人.采用^{14}C-呼气试验、Warthin-Starry染色及血清学抗体方法检测*H pylori*, 采用放免法检测血清Gas水平.

结果: 与正常对照组*H pylori*感染率相比, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎及胃癌前病变组均明显增高(63.2%, 71.9%, 60.6%, $P<0.05$), CAG及GPL组*H pylori*阳性患者中血浆Gas水平显著高于正常对照组($P<0.05$).

结论: *H pylori*与促胃液素在胃癌前病变中具有一定作用.

郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周. 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1766-1768
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1766.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是人类最常见的一种致病菌, 是慢性胃炎及十二指肠溃疡的主要致病因子, 与胃癌的发生亦有关[1-2]. 人群中有较高*H pylori*感染率, 但仅少部分人出现症状, 原因尚不清楚. 有人报道促胃液素(Gas)与胃癌的发生有关[3], 本文进行相关研究, 以探讨他们在胃癌前病变中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2001-01/2004-12临床病例114例, 均经胃镜下活检并由病理诊断, 其中慢性浅表性胃炎(CSG)49例, 慢性萎缩性胃炎(CAG)32例, 胃癌前病变(GPL, 包括肠上皮化生和/或不典型增生)33例, 其中男65例, 女49例, 平均年龄41±21岁. 另设正常对照组25人, 男17例, 女8例, 平均年龄35±15岁, 胃镜检查阴性, 二组年龄无显著性差异. Gas试剂盒购自北方生物技术研究所.

1.2 方法

1.2.1 内镜及病理诊断 参照全国慢性胃炎研讨会共识意见[4], 分别按部位(胃窦、胃体部)各取活检组织行HE染色及病理学检查. 慢性炎症以淋巴细胞及浆细胞浸润为特征, 活动性炎症则以中性粒细胞浸润为指标. 上皮及固有膜内无中性粒细胞浸润为正常; 固有腺体减少为萎缩. 在萎缩基础上由肠化腺体替代正常腺体诊断为化生, 出现腺体或上皮细胞排列结构紊乱、极性消失、胞核增大为不典型增生, 肠上皮化生或不典型增生均归入癌前病变.

1.2.2 *H pylori*检测 采用Warthin-Starry银染色法、血清学抗体方法、^{14}C-尿素呼气试验或活检组织快速尿素酶试验. 如果2项试验阳性则诊断*H pylori*感染.

1.2.3 Gas测定 所有病例均于清晨空腹静脉采血, 按照说明书以放射免疫法测定Gas含量.

统计学处理 计量资料采用 mean±SD表示, 均数的检验采用t检验. 计数资料采用χ^2检验, $P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

2.1 不同病变组织中*H pylori*感染情况 49例CSG中, *H pylori*阳性31例, *H pylori*阴性18例, *H pylori*

159-163
13 Lorca G, Torino MI, Font de Valdez G, Ljungh A A. *Lactobacilli* express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 206:31-37
14 Hayman EG, Engvall E, A'Hearn E, Barnes D, Pierschbacher M, Ruoslahti E. Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins. *J Cell Biol* 1982;95:20-23
15 Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthesy-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of Lactobacillus johnsonii NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 2004;72:2160-2169

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用

郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周

郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周, 汕头大学医学院第二附属医院消化科 广东省汕头市 515041
通讯作者: 吴灵飞, 515041, 广东省汕头市东厦北路69号, 汕头大学医学院第二附属医院消化科. lingfeiwu@21cn.com
电话: 0754-8915810 传真: 0754-8346543
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)和促胃液素(gastrin, Gas)在胃癌前病变中的作用.

方法: 114例患者分为三组:浅表性胃炎组(CSG, $n = 49$)、萎缩性胃炎组(CAG, $n = 32$)和胃癌前病变组(GPL, $n = 33$), 另设正常对照组25人.采用^{14}C-呼气试验、Warthin-Starry染色及血清学抗体方法检测*H pylori*, 采用放免法检测血清Gas水平.

结果: 与正常对照组*H pylori*感染率相比, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎及胃癌前病变组均明显增高(63.2%, 71.9%, 60.6%, $P<0.05$), CAG及GPL组*H pylori*阳性患者中血浆Gas水平显著高于正常对照组($P<0.05$).

结论: *H pylori*与促胃液素在胃癌前病变中具有一定作用.

郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周. 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1766-1768
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1766.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是人类最常见的一种致病菌, 是慢性胃炎及十二指肠溃疡的主要致病因子, 与胃癌的发生亦有关[1-2]. 人群中有较高*H pylori*感染率, 但仅少部分人出现症状, 原因尚不清楚. 有人报道促胃液素(Gas)与胃癌的发生有关[3], 本文进行相关研究, 以探讨他们在胃癌前病变中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2001-01/2004-12临床病例114例, 均经胃镜下活检并由病理诊断, 其中慢性浅表性胃炎(CSG)49例, 慢性萎缩性胃炎(CAG)32例, 胃癌前病变(GPL, 包括肠上皮化生和/或不典型增生)33例, 其中男65例, 女49例, 平均年龄41±21岁. 另设正常对照组25人, 男17例, 女8例, 平均年龄35±15岁, 胃镜检查阴性, 二组年龄无显著性差异. Gas试剂盒购自北方生物技术研究所.

1.2 方法

1.2.1 内镜及病理诊断 参照全国慢性胃炎研讨会共识意见[4], 分别按部位(胃窦、胃体部)各取活检组织行HE染色及病理学检查. 慢性炎症以淋巴细胞及浆细胞浸润为特征, 活动性炎症则以中性粒细胞浸润为指标. 上皮及固有膜内无中性粒细胞浸润为正常; 固有腺体减少为萎缩. 在萎缩基础上由肠化腺体替代正常腺体诊断为化生, 出现腺体或上皮细胞排列结构紊乱、极性消失、胞核增大为不典型增生, 肠上皮化生或不典型增生均归入癌前病变.

1.2.2 *H pylori*检测 采用Warthin-Starry银染色法、血清学抗体方法、^{14}C-尿素呼气试验或活检组织快速尿素酶试验. 如果2项试验阳性则诊断*H pylori*感染.

1.2.3 Gas测定 所有病例均于清晨空腹静脉采血, 按照说明书以放射免疫法测定Gas含量.

统计学处理 计量资料采用 mean±SD表示, 均数的检验采用t检验. 计数资料采用χ^2检验, $P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

2.1 不同病变组织中*H pylori*感染情况 49例CSG中, *H pylori*阳性31例, *H pylori*阴性18例, *H pylori*

感染率为63.2%;32例CAG中，*H pylori*阳性23例，*H pylori*阴性9例，*H pylori*感染率为71.9%;33例GPL中，*H pylori*阳性20例，*H pylori*阴性13例，*H pylori* 感染率为 60.6%;正常对照组25人中，均为*H pylori*阴性，*H pylori*感染率为0，与正常对照组比较，CSG、CAG和GPL组*H pylori*感染率均显著增加($P<0.01$).

2.2 不同病变组织中*H pylori*感染与Gas水平关系的比较 随着胃病从CSG→CAG→GPL的进展，*H pylori*阳性组血浆中Gas水平逐渐升高，与对照组相比，CAG及GPL均有显著性差异($P<0.05$);在同一疾病中*H pylori*阳性组与*H pylori*阴性组相比，Gas水平虽高于*H pylori*阴性组，但二者相比无统计学意义($P>0.05$)(表1).

表1 各组患者*H pylori*感染与Gas水平关系的比较(mean ± SD, pg/ml)

组别	n	*H pylori*阳性	*H pylori*阴性
Control	25		28.5 ± 11.7
CSG	49	34.3 ± 14.6	32.8 ± 12.1
CAG	32	38.9 ± 15.1[a]	33.2 ± 15.8
GPL	33	38.7 ± 14.6[a]	32.4 ± 14.0

[a]$P<0.05$ *vs*对照组.

3 讨论

自从Warren和Marshall 1982年在胃炎患者的胃黏膜中发现*H pylori*以来，学者们对*H pylori*在胃病中的作用进行了大量研究.目前，*H pylori*是慢性活动性胃炎和十二指肠溃疡的直接病因已达共识.流行病学资料表明，胃癌发生率与当地*H pylori*感染率正相关，*H pylori*感染者发生胃癌的危险性较非感染者高6倍[5]，*H pylori*导致的慢性胃炎与胃黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤增殖有关，而且根除*H pylori*可降低胃癌的发生率，WHO国际癌症研究机构已把*H pylori*列为第一类致癌危险因子.然而，*H pylori*引起胃癌的机制并不清楚.

一般认为，胃癌的发生是一个多因素参与的，复杂而漫长的过程.从慢性浅表性胃炎至萎缩性胃炎，逐渐出现肠上皮化生和不典型增生等癌前病变，最终发展成胃癌的癌变模式已被国内外大多数学者承认.胃癌前状态是指胃黏膜中较易转化成癌组织的病理学变化，和胃癌的发生直接相关.在本项研究中，无论胃炎组还是胃癌前病变组*H pylori*感染率均明显高于胃组织学正常的对照组，与大多数学者的报道相一致.目前，*H pylori*感染在胃癌发生中的作用尚不完全清楚，可能与*H pylori*致胃黏膜炎症、慢性炎症刺激致肠上皮化生、化生的上皮代替功能性壁细胞使胃酸降低、胃内酸度下降促使硝酸盐易转换为亚硝酸盐乃至亚硝胺而致癌有关[6].此外，*H pylori*含有的细胞毒素及其代谢产物和氧自由基、细胞因子等作为生物刺激物引起相关基因活化及表达异常有关[7].总之，*H pylori*感染者慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生及不典型增生的机会增加支持*H pylori*参与了胃病发生并向恶化方向转化的观点.

Gas是由胃窦部G细胞产生的一种胃肠激素，通过两条途径发挥生理功能，即直接刺激壁细胞产生胃酸和刺激肠嗜铬样细胞(ECL细胞)产生组胺，再通过组胺刺激壁细胞产生胃酸.因此，Gas的生理/病理意义之一是胃酸产生和高酸形成.文献[8]报道*H pylori*感染者胃黏膜中生长抑素含量及D细胞数量均少于无*H pylori*感染者，并引起Gas释放增加，其次*H pylori*感染患者胃黏膜屏障中尿素酶的释放和氨的产生使胃窦G细胞表面pH值升高，抑制胃酸对Gas分泌的负反馈作用，从而使胃窦部G细胞释放Gas增加.我们既往的研究[9-10]表明，*H pylori*在胃窦部感染可升高Gas水平，消化性溃疡患者根除*H pylori*后血Gas水平下降，均说明*H pylori*感染可致高Gas血症.有人报道了其与胃癌的关系.Konturek *et al*[3]检测100例胃癌患者*H pylori*感染情况及Gas水平，结果胃癌患者血清中Gas水平比对照组高3.2倍，胃液中Gas水平比对照组高15.5倍，胃癌患者中*H pylori*感染率为92%，提示*H pylori*有致胃癌的作用.本实验中，*H pylori*阴性的CAG和GPL患者血Gas水平虽有所升高，但与对照组无显著性差异，而*H pylori*阳性的CAG和GPL患者血Gas水平升高有统计学意义，说明在*H pylori*致胃癌前病变过程中Gas确实起了一定作用.晚近有人认为[11]Gas具有生长因子的作用，可刺激胃、结肠等消化道黏膜上皮的生长及分化.Gas的前体还可作为自分泌生长因子，即通过细胞自身分泌参与结肠肿瘤的发生.但是由胃窦部G细胞产生的Gas和由胃癌细胞自分泌的Gas的调节机制有何不同以及他们在胃癌发生、发展中的作用还有待进一步研究.

4 参考文献

1 Iijima K, Ohara S, Sekine H, Koike T, Kato K, Asaki S, Shimosegawa T, Toyota T. Changes in gastric acid secretion assayed by endoscopic gastrin test before and after *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 2000;46:20-26

2 甄承恩, 杨晶, 史斌. 慢性胃炎的研究进展与思考. 临床荟萃 2005;20:117-121

3 Konturek PC, Konturek SJ, Bielanski W, Karczewska E, Pierzchalski P, Duda A, Starzynska T, Marlicz K, Popiela T, Hartwich A, Hahn EG. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected humans. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:857-873

4 中华医学会消化病学分会. 全国慢性胃炎研讨会共识意见. 中华消化杂志 2000;20:199-201

5 Machida-Montani A, Sasazuki S, Inoue M, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, Hanaoka T, Tsugane S. Association of *Helicobacter pylori* infection and environmental factors in non-cardia gastric cancer in Japan. *Gastric Cancer* 2004;7:46-53

6 Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter pylori* infection in a mouse model of gastric cancer.

Gastroenterology 2000;118:36-47
7 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 陈刚, 滕小春, 何俊堂. 胃癌及胃癌前病变中幽门螺杆菌感染和 PCNA、p53、Bcl-22 的表达. 重庆医学 2003;32:1135-1137
8 Savarino V, Celle G, Vigneri S. *Helicobacter pylori* and acid secretion. *Gastroenterology* 1998;115:510-511
9 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾哲. 胃食管反流病与幽门螺杆菌相关胃炎及胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:1100-1103
10 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 李国平, 张金池. 根除幽门螺杆菌对消化性溃疡合并胃炎及胃泌素的影响. 临床消化病杂志 2004;16:250-252
11 Aly A, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:1-10

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

表皮生长因子及其受体 mRNA 在胃溃疡发生与愈合过程中的表达

谭永港, 舒 晴, 邱猛进, 张永锋

谭永港, 舒晴, 张永锋, 深圳市第二人民医院消化内科
广东省深圳市 518035
邱猛进, 深圳市龙岗区中心医院内科 广东省深圳市 518116
深圳市科技局项目, No. 200405112
通讯作者: 谭永港, 518035, 广东省深圳市笋岗西路3002号, 深圳市第二人民医院消化内科.
电话: 0755-3808552 传真: 0755-83228956
收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

摘要

目的: 探讨人胃溃疡愈合过程中表皮生长因子(EGF)含量及表皮生长因子受体(EGFR)表达的变化及其作用.

方法: 采用放免及免疫组化方法，对正常胃黏膜(10例)、胃溃疡活动期(GA组，20例)、愈合期(GH组，20例)、瘢痕期(GS组，20例)胃液EGF含量及胃黏膜组织EGFR的表达进行测定及定位观察和图像分析.

结果: 正常胃黏膜和GA组的胃液EGF的含量分别为502.6 ± 51.3、156.2 ± 46.7 ng/L，经统计学处理差异有显著性意义(P<0.05);GH和GS组胃液的EGF含量分别为386.1 ± 76.8、466.3 ± 95.4 ng/L，与GA组比较，差异有显著性意义(P<0.05). GA组胃黏膜EGFR的表达均较正常时增加，GH及GS组更加明显;GA组EGFRmRNA表达阳性密度(18.27 ± 3.95)较正常组(8.52 ± 1.18)增高(P<0.01)，而GH组(24.61 ± 4.98)和GS组(27.92 ± 5.44)又较GA组明显增高(P<0.05).

结论: 人胃溃疡愈合过程中，胃液EGF与溃疡的发生和愈合有关，胃黏膜EGFR的表达由弱到强.

谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋. 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1768-1770
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1768.asp

0 引言

表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)具有广泛的生物学作用，主要有促进表皮生长，增强正常细胞的再生能力及损伤修复作用[1];表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor，EGFR)主要分布在胃壁、十二指肠和小肠黏膜，位于上皮的基底部. 近年的研究认为，在导致溃疡发病的诸因素中，可能涉及EGF的分泌及EGFR表达低下[2]. 我们采用放免及免疫组化方法，对EGF及EGFR在正常胃黏膜、胃溃疡活动期、愈合期和瘢痕期的含量及表达情况进行了检测，以探讨EGF及EGFR在胃溃疡愈合中的变化及作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胃溃疡患者均经内镜证实，排除药物性溃疡、应激性溃疡或其他慢性病所致的溃疡患者. 胃溃疡分期采用日本学者畸田隆夫倡导的分期法，将溃疡分为活动期(active stage)、愈合期期(healing stage)和瘢痕期(scarring stage). 选择其中活动期(GA组)、愈合期(GH组)和瘢痕期(GS组)患者各20例，取胃液及胃黏膜标本，另取10例正常胃黏膜的胃液及胃窦黏膜组织作对照.

1.2 方法

1.2.1 胃液的收集 上午内镜检查前禁食12 h，禁用消泡剂，经内镜活孔以聚乙烯朔料管抽吸胃液约2-3 mL，置入试管中，立即煮沸5-10 min，-20℃保存待测. 胃黏膜组织均取自溃疡边缘，标本迅速浸入16 g/L多聚甲醛(以0.1 moL/L PBS配制，含1 mL/L DEPC，pH为7.4)中固定16 h，脱水，常规石蜡包埋，制备5 μm厚连续切片. SABC试剂盒、EGFR免疫组化试剂盒及EGFR原位杂交试剂盒均为武汉博士德生物工程公司产品，原位杂交专用盖玻片、DEPC和多聚赖氨酸均为美国Sigma公司产品.

Gastroenterology 2000;118:36-47
7 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 陈刚, 滕小春, 何俊堂. 胃癌及胃癌前病变中幽门螺杆菌感染和 PCNA、p53、Bcl-22 的表达. 重庆医学 2003;32:1135-1137
8 Savarino V, Celle G, Vigneri S. *Helicobacter pylori* and acid secretion. *Gastroenterology* 1998;115:510-511
9 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾哲. 胃食管反流病与幽门螺杆菌相关胃炎及胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:1100-1103
10 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 李国平, 张金池. 根除幽门螺杆菌对消化性溃疡合并胃炎及胃泌素的影响. 临床消化病杂志 2004;16:250-252
11 Aly A, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:1-10

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

表皮生长因子及其受体 mRNA 在胃溃疡发生与愈合过程中的表达

谭永港, 舒 晴, 邱猛进, 张永锋

谭永港, 舒晴, 张永锋, 深圳市第二人民医院消化内科
广东省深圳市 518035
邱猛进, 深圳市龙岗区中心医院内科 广东省深圳市 518116
深圳市科技局项目, No. 200405112
通讯作者: 谭永港, 518035, 广东省深圳市笋岗西路3002号, 深圳市第二人民医院消化内科.
电话: 0755-3808552 传真: 0755-83228956
收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

摘要

目的: 探讨人胃溃疡愈合过程中表皮生长因子(EGF)含量及表皮生长因子受体(EGFR)表达的变化及其作用.

方法: 采用放免及免疫组化方法，对正常胃黏膜(10例)、胃溃疡活动期(GA组，20例)、愈合期(GH组，20例)、瘢痕期(GS组，20例)胃液EGF含量及胃黏膜组织EGFR的表达进行测定及定位观察和图像分析.

结果: 正常胃黏膜和GA组的胃液EGF的含量分别为502.6 ± 51.3、156.2 ± 46.7 ng/L，经统计学处理差异有显著性意义(P<0.05);GH和GS组胃液的EGF含量分别为386.1 ± 76.8、466.3 ± 95.4 ng/L，与GA组比较，差异有显著性意义(P<0.05). GA组胃黏膜EGFR的表达均较正常时增加，GH及GS组更加明显;GA组EGFRmRNA表达阳性密度(18.27 ± 3.95)较正常组(8.52 ± 1.18)增高(P<0.01)，而GH组(24.61 ± 4.98)和GS组(27.92 ± 5.44)又较GA组明显增高(P<0.05).

结论: 人胃溃疡愈合过程中，胃液EGF与溃疡的发生和愈合有关，胃黏膜EGFR的表达由弱到强.

谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋. 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1768-1770
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1768.asp

0 引言

表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)具有广泛的生物学作用，主要有促进表皮生长，增强正常细胞的再生能力及损伤修复作用[1];表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor，EGFR)主要分布在胃壁、十二指肠和小肠黏膜，位于上皮的基底部. 近年的研究认为，在导致溃疡发病的诸因素中，可能涉及EGF的分泌及EGFR表达低下[2]. 我们采用放免及免疫组化方法，对EGF及EGFR在正常胃黏膜、胃溃疡活动期、愈合期和瘢痕期的含量及表达情况进行了检测，以探讨EGF及EGFR在胃溃疡愈合中的变化及作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胃溃疡患者均经内镜证实，排除药物性溃疡、应激性溃疡或其他慢性病所致的溃疡患者. 胃溃疡分期采用日本学者畸田隆夫倡导的分期法，将溃疡分为活动期(active stage)、愈合期期(healing stage)和瘢痕期(scarring stage). 选择其中活动期(GA组)、愈合期(GH组)和瘢痕期(GS组)患者各20例，取胃液及胃黏膜标本，另取10例正常胃黏膜的胃液及胃窦黏膜组织作对照.

1.2 方法

1.2.1 胃液的收集 上午内镜检查前禁食12 h，禁用消泡剂，经内镜活孔以聚乙烯朔料管抽吸胃液约2-3 mL，置入试管中，立即煮沸5-10 min，-20℃保存待测. 胃黏膜组织均取自溃疡边缘，标本迅速浸入16 g/L多聚甲醛(以0.1 moL/L PBS配制，含1 mL/L DEPC，pH为7.4)中固定16 h，脱水，常规石蜡包埋，制备5 μm厚连续切片. SABC试剂盒、EGFR免疫组化试剂盒及EGFR原位杂交试剂盒均为武汉博士德生物工程公司产品，原位杂交专用盖玻片、DEPC和多聚赖氨酸均为美国Sigma公司产品.

1.2.2 EGF含量的测定 按试剂盒说明操作:在平行双管中依次加入胃液0.1 mL，125I-EGF 0.1 mL(内含放射性800 cpm左右)及EGF抗血清0.3 mL，总体积为0.5 mL.同时作标准曲线(测定范围为5-4 000 ng/L).反应液经充分混匀后于4℃下放置48 h，然后加入二抗及分离剂，室温放置30 min，离心(3 000 r/min，15 min)，去上清，沉淀以γ-计数器读取cpm数.计数B/B0，在半对数纸上作出标准曲线并相应读出各管的EGF含量.

1.2.3 EGFR蛋白质检测 (1)切片常规脱蜡至水;(2)30 mL/L H_2O_2处理30 min以灭活内源性过氧化物酶;(3)复合消化液消化10 min;(4)正常山羊血清封闭20 min;(5)兔抗EGFR抗体37℃孵育60 min;(6)生物素化山羊抗兔IgG 37℃孵育20 min;(7)SABC 37℃孵育20 min;(8)DAB显色;(9)苏木素复染.分别以PBS和正常兔血清替代一抗作为阴性对照.

1.2.4 原位杂交法检测EGFRmRNA的表达 (1)所用玻片经清洗、200℃干5 h、2 mL/L氨丙基三乙氧基硅烷/丙酮液硅化、多聚赖氨酸包被处理.切片充分脱蜡至水，30 mL/L H_2O_2处理30 min，双蒸水洗2 min×3次，胃蛋白酶消化以暴露mRNA片段，0.5 mol/L PBS洗5 min×3次，双蒸水洗2 min×1次.(2)预杂交和杂交:加预杂交液(含50 g/L甲酰胺、0.2 g/L十二烷基硫酸钠、300 mg/L鲑鱼精DNA、10 g/L牛血清白蛋白、2×SSC)于40℃预杂交2 h，加20 μL含地高辛标记探针的杂交液，盖上原位杂交专用盖玻片，40℃杂交过夜.30℃的2×SSC洗涤5 min，共3次，37℃的2×SSC洗涤5 min，共3次.(3)抗原抗体反应与显色反应:50 g/L牛血清白蛋白封闭20 min;兔抗地高辛抗体37℃孵育60 min，0.5 mol/L PBS洗2 min×3次;生物素化羊抗兔IgG 37℃孵育30 min，0.5 mol/L PBS洗2 min×3次;SABC 37℃孵育30 min，0.5 mol/L PBS洗5 min×4次;DAB显色;苏木素轻度复染.以不含探针的杂交液替代EGFR寡核苷酸探针杂交液作为阴性对照.结果用计算机图像分析系统进行形态计量分析.

1.2.5 形态计量分析 光学显微镜下观察显色反应，阳性细胞胞质着色均呈棕黄色.用高分辨摄像机摄像，经计算机处理,应用图像分析专用软件,测定出阳性反应细胞密度(简称阳性密度),每例从溃疡边缘至移行区随机测试5个以上高倍视野(×400)，计算出每个视野阳性密度的均值.

统计学处理 结果以mean±SD表示，多组间比较用方差分析和q检验，组内前后比较用t检验，$P<0.05$为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 正常胃黏膜的胃液EGF的含量为502.6±51.3 ng/L，GA组胃液EGF含量为156.2±46.7 ng/L，经统计学处理差异有显著性意义($P<0.05$);而GH和GS组胃液的EGF含量分别为386.1±76.8 ng/L、466.3±95.4 ng/L，与GA组比较，差异有显著性意义($P<0.05$).表明胃溃疡患者胃液EGF含量明显降低，当溃疡愈合时，其胃液EGF含量亦明显增高，EGF与溃疡愈合、黏膜组织修复密切相关.

2.2 EGFR蛋白质的表达 免疫组织化学染色显示，EGFR表达于黏膜层,正常胃黏膜可见有少量阳性信号,主要位于增殖区的颈黏液细胞和一些壁细胞.在颈黏液细胞，EGFR定位于细胞顶膜表面,有时在腺腔中有阳性信号,此时常位于颈细胞相邻的黏液中;而在壁细胞,阳性信号则散布于整个细胞胞质.有的表达于浆膜上.GA组溃疡周边及移行区黏膜阳性信号明显增多,GH组和GS组溃疡周边及移行区黏膜阳性信号较GA组显著增强,GS组更加明显.

2.3 EGFRmRNA的表达 原位杂交技术显示，阳性细胞胞质着色呈棕黄色，正常胃黏膜可见少量较弱EGFRmRNA阳性信号，GA组溃疡周边及移行区阳性信号增加，GH组和GS组溃疡周边及移行区黏膜阳性信号则较GA组明显增强.此与免疫组织化学的结果一致.图像分析结果显示:EGFRmRNA表达阳性密度GA组(18.27±3.95)较正常组(8.52±1.18)增高($P<0.01$)，而GH组(24.61±4.98)和GS组(27.92±5.44)又较GA组明显增高($P<0.05$)，说明随着溃疡的愈合EGFR表达增强.

3 讨论

近年来的研究表明，消化性溃疡愈合质量的好坏与溃疡复发密切相关,改善溃疡愈合质量可减少溃疡复发[3].溃疡的愈合过程十分复杂,涉及到坏死物质的清除,肉芽组织的生长、新生血管的生成、纤维组织及瘢痕组织的形成、上皮的重构等过程.

溃疡表面的上皮化是溃疡愈合的重要方面,这主要依赖于EGF和EGFR的作用.EGF可抑制壁细胞分泌胃酸、促进黏膜细胞DNA、RNA及蛋白质合成.对黏膜上皮及腺体的再生起重要作用，但他必须与其受体EGFR结合，以上作用才能得到发挥[4].GEFR是一带有酪氨酸激酶活性的跨膜粘蛋白,广泛存在于人及哺乳动物的胃肠黏膜,具有促进胃肠黏膜增殖、发育及修复，减少胃酸分泌[5]等重要功能;对EGF有高度的特异性和亲和力.当GEF到达靶细胞表面时，很快与细胞质膜上EGFR结合，诱导其产生某种变构,形成二聚体,激活受体膜内区域的酪氨酸蛋白激酶,使自身的一系列酪氨酸被磷酸化，通过GrbZ和Sos最终激活$p21^{ras}$而传导信号，调节细胞生长与分化[6].

已有研究表明[7]，消化性溃疡患者胃液EGF含量明显降低.我们发现,胃溃疡患者胃液EGF的水平明显低于正常人，与文献的报道一致，提示EGF的降低可能与胃溃疡的发生有一定的关系;溃疡愈合后其胃液EGF含量亦明显增高,表明EGF在溃疡愈合中可能起作用.本研究表明正常时胃黏膜有少量EGFR表达，胃溃疡时表达增加，

随着溃疡的愈合则表达不断增强;考虑系由于此时胃液EGF含量减少,EGFR为代偿性表达增强.结果提示可通过增加EGFR的表达而促进黏膜上皮增殖,从而加速溃疡重新上皮化和增加黏膜厚度,乃至促进溃疡愈合和提高溃疡愈合质量,如有些治疗胃溃疡的中药其作用靶点是通过增加胃黏膜EGFR的表达进而提高溃疡愈合质量,从而达到抗消化性溃疡复发的目的[8].

4 参考文献

1 贺建华, 罗和生. 生长因子在消化性溃疡愈合中的作用. 国外医学·消化系统分册 2003;23:12-15

2 陈寿坡, 陆国钧, 温淑豪. 消化性溃疡患者唾液、胃液和血清中表皮生长因子含量的研究. 中华消化杂志 1994;14:15-17

3 余善强, 周福生, 崔琦珍, 王建华. 溃疡愈合质量研究进展. 华人消化杂志 1998;6:1010-1011

4 陈玲, 刘皖君. 表皮生长因子及其生物学效应. 国外医学儿科学分册 1997;24:240-243

5 Joshi V, Ray GS, Goldenring JR. Inhibition of partietal cell acid secretion is mediated by the classical epidermal growth factor receptor. *Dig Dis Sci* 1997;42:1194

6 许春娣, 陈舜年, 徐家裕. 表皮生长因子在消化性溃疡愈合中的作用. 国外医学儿科学分册 1997;24:123-126

7 肖作亮, 王雁, 黎颖哲, 马鸣一, 门子荣, 任继平, 邸霞, 袁申元. 人胃液表皮生长因子在消化性溃疡发生与愈合中的作用. 北京医学 1997;19:289-291

8 张炜宁, 张烨, 李家邦. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡患者胃黏膜表皮生长因子受体表达的影响. 中西医结合学报 2004;2:24-26

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定

温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐 铿

温志立, 杨铁一, 徐铿, 南昌市第一医院消化科 江西省南昌市 330008
谭德明, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
通讯作者: 温志立, 330008, 江西省南昌市第一医院消化科. wenzhili@126.com
电话: 0791-6768240 传真: 0791-3867593
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 检测湖南省乙型肝炎病毒(HBV)基因亚型(Bj或Ba)的分布情况, 了解基因亚型与HBV致病性的关系, 希望以此诠释相同基因型HBV导致不同病情的机制.

方法: 随机选取经多对型特异性引物巢式PCR法鉴定为B基因型HBV的血清标本50例, 包括慢性HBV携带者和慢性重型乙型肝炎患者各25例, 采用巢式PCR-RFLP法鉴定其基因亚型(Bj或Ba).

结果: 50例B基因型HBV均为Ba亚型, 没有发现Bj亚型.

结论: 湖南省B基因型HBV可能主要为Ba亚型.相同基因型HBV导致不同病情的机制可能还与其他因素(如HBV准种)有关.

温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿. 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bi和Ba基因亚型的初步鉴定. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1770-1773
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1770.asp

0 引言

已有研究表明, 东亚地区乙型肝炎病毒(HBV)的基因型以B型和C型为主[1], 且C型HBV的致病力强于B型HBV[2-11]. 虽然HBV基因型能在一定程度上解释乙型肝炎的病情程度、预后和转归, 但我们也很容易发现, 相同基因型的HBV可引起不同的临床表现.日本和中国都有B型HBV, 但日本B型HBV所致肝炎的症状一般都轻于中国B型HBV. 台湾Kao *et al*[12]发现B型的年轻患者更易发展成肝癌, 而日本Orito *et al*[13]的研究结果却恰恰相反.这种相同HBV基因型患者出现不同病情, 而不同HBV基因型患者却可出现相同病情的现象, 究竟是何原因引起, 除了患者个体差异外, 是否还有HBV基因亚型等因素的影响? 这是一个困扰HBV基因型研究者们的难题.

2002年, 日本学者Sugauchi *et al*[14]测定了70例B型HBV的基因组全序列, 根据前-C区/C区与C型HBV有无重组序列将B型HBV分为Ba和Bj两种亚型.2003年他发现在1 838位点处所有Ba亚型均为A碱基, 而所有Bj亚型为G碱基, 于是利用这点研制出一种快速简便区分两种亚型的聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法, 即在鉴定Bj亚型时将引物3'端的第4位碱基C改为A, PCR扩增后即可得到SpeI序列(ACTAGT), 经*Spe*I酶切后如能产生89 bp大小片段即可鉴定为Bj亚型HBV感染;同样将引物3'端的第3位碱基C改为T, PCR扩增后即可得到MseI序列(TTAA), 经*Mse*I酶切后如能产生89 bp大小片段即可鉴定为Ba亚型HBV感染.他用

随着溃疡的愈合则表达不断增强;考虑系由于此时胃液EGF含量减少,EGFR为代偿性表达增强.结果提示可通过增加EGFR的表达而促进黏膜上皮增殖,从而加速溃疡重新上皮化和增加黏膜厚度,乃至促进溃疡愈合和提高溃疡愈合质量,如有些治疗胃溃疡的中药其作用靶点是通过增加胃黏膜EGFR的表达进而提高溃疡愈合质量,从而达到抗消化性溃疡复发的目的[8].

4 参考文献

1 贺建华, 罗和生. 生长因子在消化性溃疡愈合中的作用. 国外医学·消化系统分册 2003;23:12-15

2 陈寿坡, 陆国钧, 温淑豪. 消化性溃疡患者唾液、胃液和血清中表皮生长因子含量的研究. 中华消化杂志 1994;14:15-17

3 余善强, 周福生, 崔琦珍, 王建华. 溃疡愈合质量研究进展. 华人消化杂志 1998;6:1010-1011

4 陈玲, 刘皖君. 表皮生长因子及其生物学效应. 国外医学儿科学分册 1997;24:240-243

5 Joshi V, Ray GS, Goldenring JR. Inhibition of partietal cell acid secretion is mediated by the classical epidermal growth factor receptor. *Dig Dis Sci* 1997;42:1194

6 许春娣, 陈舜年, 徐家裕. 表皮生长因子在消化性溃疡愈合中的作用. 国外医学儿科学分册 1997;24:123-126

7 肖作亮, 王雁, 黎颖哲, 马鸣一, 门子荣, 任继平, 邸霞, 袁申元. 人胃液表皮生长因子在消化性溃疡发生与愈合中的作用. 北京医学 1997;19:289-291

8 张炜宁, 张烨, 李家邦. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡患者胃黏膜表皮生长因子受体表达的影响. 中西医结合学报 2004;2:24-26

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定

温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐 铿

温志立, 杨铁一, 徐铿, 南昌市第一医院消化科 江西省南昌市 330008
谭德明, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
通讯作者: 温志立, 330008, 江西省南昌市第一医院消化科. wenzhili@126.com
电话: 0791-6768240 传真: 0791-3867593
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 检测湖南省乙型肝炎病毒(HBV)基因亚型(Bj或Ba)的分布情况, 了解基因亚型与HBV致病性的关系, 希望以此诠释相同基因型HBV导致不同病情的机制.

方法: 随机选取经多对型特异性引物巢式PCR法鉴定为B基因型HBV的血清标本50例, 包括慢性HBV携带者和慢性重型乙型肝炎患者各25例, 采用巢式PCR-RFLP法鉴定其基因亚型(Bj或Ba).

结果: 50例B基因型HBV均为Ba亚型, 没有发现Bj亚型.

结论: 湖南省B基因型HBV可能主要为Ba亚型.相同基因型HBV导致不同病情的机制可能还与其他因素(如HBV准种)有关.

温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿. 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bi和Ba基因亚型的初步鉴定. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1770-1773
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1770.asp

0 引言

已有研究表明, 东亚地区乙型肝炎病毒(HBV)的基因型以B型和C型为主[1], 且C型HBV的致病力强于B型HBV[2-11]. 虽然HBV基因型能在一定程度上解释乙型肝炎的病情程度、预后和转归, 但我们也很容易发现, 相同基因型的HBV可引起不同的临床表现.日本和中国都有B型HBV, 但日本B型HBV所致肝炎的症状一般都轻于中国B型HBV. 台湾Kao *et al*[12]发现B型的年轻患者更易发展成肝癌, 而日本Orito *et al*[13]的研究结果却恰恰相反.这种相同HBV基因型患者出现不同病情, 而不同HBV基因型患者却可出现相同病情的现象, 究竟是何原因引起, 除了患者个体差异外, 是否还有HBV基因亚型等因素的影响? 这是一个困扰HBV基因型研究者们的难题.

2002年, 日本学者Sugauchi *et al*[14]测定了70例B型HBV的基因组全序列, 根据前-C区/C区与C型HBV有无重组序列将B型HBV分为Ba和Bj两种亚型.2003年他发现在1 838位点处所有Ba亚型均为A碱基, 而所有Bj亚型为G碱基, 于是利用这点研制出一种快速简便区分两种亚型的聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法, 即在鉴定Bj亚型时将引物3'端的第4位碱基C改为A, PCR扩增后即可得到SpeI序列(ACTAGT), 经*Spe*I酶切后如能产生89 bp大小片段即可鉴定为Bj亚型HBV感染;同样将引物3'端的第3位碱基C改为T, PCR扩增后即可得到MseI序列(TTAA), 经*Mse*I酶切后如能产生89 bp大小片段即可鉴定为Ba亚型HBV感染.他用

此法检测了274例东亚各地区的B型HBV感染者，发现中国等地主要为Ba亚型，而日本为Bj亚型，且Ba亚型患者的HBeAg阳性率和核心启动子双位点(T1762/A1764)突变率显著高于Bj亚型，在一定程度上解答了上述问题[15].

但是，在以B基因型为主的中国湖南省[16-17]，到底以哪种基因亚型为主,是否也可从HBV基因亚型角度解释湖南省慢性乙型病毒性肝炎病情多样化、复杂化的现象，这些都不得而知. 为此本文准备从此入手，采用Sugauchi的PCR-RFLP法检测湖南省HBV基因亚型的分布情况,以期进一步了解HBV基因亚型与HBV致病性的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 血清DNA抽提试剂盒(上海申友生物公司);dNTP、PCR缓冲液、超纯型Taq Plus Polymerase、Marker(DGL2000)为北京鼎国公司产品;琼脂糖(西班牙进口,上海博亚生物公司分装);限制型内切酶*Spe*I和*Mse*I分别为日本TaKaRa公司和美国MBI公司产品;DNA循环扩增仪(486型，美国 PE公司)，紫外透光仪(日本ATTO公司产品);高速冷冻离心机(美国Beckman公司产品，型号GS-15R);稳压稳流电泳仪(上海Tanon公司产品，型号EPS-300);GIS凝胶电脑全自动图像处理仪(上海Tanon公司产品，型号为UV-2000). 试验所用血清标本采自2002-06/2003-03中南大学湘雅医院感染病科门诊和住院部的湖南籍慢性乙型肝炎患者,经感染病科临床PCR实验室荧光实时定量PCR鉴定HBV-DNA为阳性，并经多对型特异性引物巢式PCR法[17]鉴定为B基因型. 选取其中50例作为研究对象,包括慢性HBV携带者和慢性重型乙型肝炎患者各25例，其中男36例，女14例，年龄为12-58岁.

1.2 方法

1.2.1 引物设计 参照文献[15]设计了BJHBF、BAHBF、HBAS-4V、BJA-RV四条用于巢式PCR扩增的内外引物，由日本TaKaRa公司合成(表1).

1.2.2 血清DNA提取 按照试剂盒说明书中浓缩裂解法进行,略改动. 简述如下:取50 μL浓缩液到0.5 mL离心管中，再加入待测血清标本50 μL，振荡混匀后静置2 min，8 000 *g*离心5 min，弃上清. 加入10 μL裂解液，剧烈振荡至无沉淀后短暂离心，沸水浴10 min，14 000 *g*离心15 min，取上清液2 μL为模板做PCR反应.

1.2.3 巢式PCR 所有血清标本提出HBV-DNA后，均分别按照Bj和Ba检测方法进行检测. (1)Bj亚型的检测:首先用引物BJHBF和HBAS-4V作为一对外引物进行第一轮PCR扩增，PCR反应体系如下:BJHBF(50 mmol/L)1 μL，HBAS-4V(50 mmol/L)1 μL，dNTP(10 mmol/L)1 μL，Taq聚合酶(2×10^6/L)1 μL，10×PCR缓冲液5 μL，$MgCl_2$(20 mmol/L)5 μL，模板2 μL，灭菌DDW 34 μL，总体积50 μL. 混合后直接置于DNA循环扩增仪进行反应，条件为95℃预变性5 min，按94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 1 min扩增35个循环，再72℃延伸7 min. 然后以PCR扩增产物为模板，以引物BJHBF和BJA-RV作为一对内引物进行第二轮PCR扩增，反应体系同第一轮，反应条件为95℃预变性5 min，按94℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸30 s扩增32个循环，再72℃延伸7 min. 将巢式PCR扩增产物置于15 g/L琼脂糖凝胶中，90 V稳压电泳10 min后，于紫外灯下观察是否有110 bp大小的条带. (2)Ba亚型的检测:以BAHBF和HBAS-4V为外引物，以BAHBF和BJA-RV为内引物进行巢式PCR，方法同Bj亚型的检测.

1.2.4 限制性片段长度多态性(RFLP) (1)Bj亚型的检测:采用内切酶*Spe*I(10^7 U/L)进行酶切，反应体系如下:PCR产物10 μL，10×buffer 2 μL，*Spe*I(10^7 U/L)1 μL，DDW 7 μL，共20 μL. 混合均匀后置于37℃中水浴3 h，然后于30 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳，如110 bp大小的PCR产物被切成89 bp大小片段，则为Bj亚型. (2)Ba亚型的检测:采用内切酶*Mse*I进行酶切，反应体系和反应条件同上. 然后于30 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳，如110 bp大小的PCR 产物被切成89 bp大小片段，则为Ba亚型.

2 结果

2.1 巢式PCR-RFLP法鉴定Bj和Ba亚型结果 通过巢式PCR扩增出110 bp大小的片段，再经RFLP法进行酶切，可清楚辨别出Bj和Ba亚型(图1-2). 该方法操作简便,且由于人为地加入一个碱基产生特异性酶切位点，从而提高了HBV基因亚型鉴定的特异性，大大简化了过去通过DNA测序所需的繁琐步骤，可用于大批量HBV基因亚型的筛选.

2.2 鉴定结果 用该巢式PCR-RFLP法检测了B基因型的慢

表1 PCR-RFLP方法鉴定Bj和Ba基因亚型所用引物

引物名称	引物序列	位点	特性	方向
BJHBF	5'-ATG CAA CTT TTT CAC CTC TGA CTA-3'	nt1 814-1 837	Bj	正义
BAHBF	5'-ATG CAA CTT TTT CAC CTC TGC TTA-3'	nt1 814-1 837	Ba	正义
HBAS-4V	5'-ATA GGG GCA TTT GGT GGT TCT-3'	nt2 316-2 297	无	反义
BJA-RV	5'-TTC TTT ATA CGG GTC AAT GTC CAT G-3'	nt1 924-1 901	无	反义

BJHBF和BAHBF序列中划线部分为修改后碱基，目的是产生*Spe*I和*Mse*I的酶切位点.

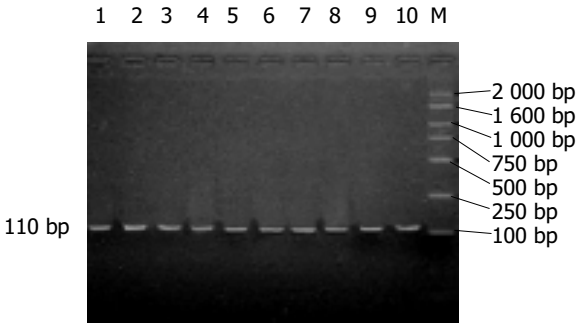


图1 Bj检测第二轮PCR产物酶切前后. 1-5为酶切前，6-10为酶切后(均未被*Spe*I切动，仍为110 bp大小片段)，M为低分子量Marker.

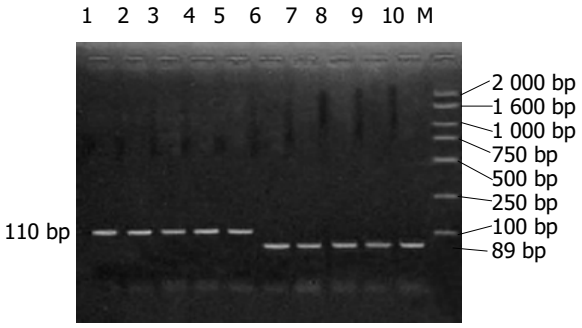


图2 Ba检测第二轮PCR产物酶切前后. 1-5为酶切前，6-10为酶切后(均被MseI切成89 bp大小片段)，M为低分子量Marker.

性HBV携带者和慢性重型乙型肝炎患者各25例，结果均为Ba亚型.

3 讨论

HBV基因型与慢性乙型病毒性肝炎的关系一直是病毒性肝炎研究领域里的热点.随着全基因分析[18]或S基因测序法[19]、PCR法[20-21]、PCR-RFLP法[22-26]、微板核酸杂交ELISA法[27-28]等HBV基因分型方法的相继建立和完善，大量研究证实了HBV基因型与慢性乙型病毒性肝炎临床表现的相关性.如西方学者[29]发现D型对HBV-DNA、HBsAg、HBeAg的清除率均比A型低，死亡率较A型高.而在流行B、C型的东亚地区，研究者们[2-11]一致认为C型可引起比B型更严重的临床表现，如ALT的升高、HBeAg阳性率的增加、重症中所占比例的增大.但是，HBV基因型有时与临床不一定完全相关，如日本B型HBV所致肝炎的症状一般都明显轻于中国B型HBV，而且在以B基因型为主的中国南方地区，慢性乙型病毒性肝炎的病情呈现多样化和复杂化，提示在同一HBV基因型中可能还存在基因亚型或准种等因素影响着乙肝病情的转归和愈后.

本研究以50例B基因型HBV感染的慢性HBV携带者和慢性重型乙型肝炎患者血清为研究对象，采用巢式PCR-RFLP法进行Ba和Bj基因亚型的鉴定，希望进一步了解基因亚型与HBV致病性的关系，从基因亚型这个角度诠释相同基因型HBV导致不同病情的机制.但50例B基因型HBV感染的血清样品经鉴定均为Ba亚型，这在一定程度上说明在湖南省内B基因型HBV主要还是Ba亚型，与Sugauchi *et al*[15]报道的“中国以Ba亚型为主，日本以Bj亚型为主”相符.虽然Sugauchi将B型HBV分为Ba和Bj两种亚型，能在一定程度上解释中国等东亚地区B型HBV所致乙型肝炎病情较日本B型HBV为重的现象，但在以Ba亚型为主的中国等地区，表现为不同病情的B型HBV感染者普遍存在.所以在HBV基因型的发病机制上，除基因亚型外可能还有其他因素的影响(如HBV准种)，是值得进一步研究的课题.

4 参考文献

1 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

2 Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. *Hepatology* 2001; 33:218-223

3 Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002;122: 1756-1762

4 Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Orito E, Mizokami M, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A, Miyagi Y. Preponderance of hepatitis B virus genotype B contributes to a better prognosis of chronic HBV infection in Okinawa, Japan. *J Med Virol* 2002;67:484-489

5 Sugauchi F, Chutaputti A, Orito E, Kato H, Suzuki S, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:671-676

6 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

7 Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003;37:19-26

8 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis be antigen-positive patients. *J Clin Microbiol* 2003;41:1277-1279

9 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

10 许军, 王齐欣, 蒋栋, 陈红松, 魏来, 王宇, 杨柳明, 赵延龙. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系. 中华肝脏病杂志 2003;11:11-13

11 温志立, 谭德明, 侯周华, 杨永峰. 型特异性巢式PCR研究HBV基因型与临床关系. 中南大学学报(医学版) 2004;29:50-53

12 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

13 Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, Okita K, Okanoue T, Iino S, Tanaka E, Suzuki K, Watanabe H, Hige S, Mizokami M. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001;34:590–594

14 Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 2002;76:5985–5992

15 Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Gish RG, Ueda R, Miyakawa

Y, Mizokami M. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 2003;124:925-932
16 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
17 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;12:332-335
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;74:1341-1348
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, 闫丽, 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, 阮丽花, 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 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
23 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
24 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
25 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
26 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
27 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
28 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
29 Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

阿霉素对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响

邢承忠, 路 平, 郭晓临, 刘 瑾, 徐惠绵, 袁 媛

邢承忠, 路平, 刘瑾, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科
辽宁省沈阳市 110001
郭晓临, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所
辽宁省沈阳市 110001
辽宁省教育厅课题资助项目, No. 202013171
通讯作者: 邢承忠, 110001, 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科. xcz1966@yahoo.com.cn
电话: 024-23256666-6227
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨阿霉素诱导胃癌细胞凋亡过程中细胞内游离 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}] i)的变化特点及意义.

方法: 选择阿霉素诱导胃癌细胞凋亡, 采用光镜、电镜、琼脂糖凝胶电泳和流式细胞仪检测凋亡;Fura-2荧光负荷技术测定[Ca^{2+}] i.

结果: 4 μg/mL阿霉素作用于胃癌细胞24 h出现典型的凋亡改变, 即光镜和电镜见凋亡小体、细胞皱缩、染色质固缩和片段化, 琼脂糖电泳观察可见DNA梯状条带, 流式细胞仪上见"凋亡峰";阿霉素诱导胃癌细胞凋亡过程中[Ca^{2+}] i于1/120(30 s), 2, 6, 12和24 h依次为191, 177, 151, 170和146 nmol/L, 均明显高于对照组127 nmol/L($P<0.01$ 或 $P<0.05$), [Ca^{2+}] i的升高以凋亡早期更为明显.

结论: 阿霉素可以通过诱导胃癌细胞凋亡发挥抗癌作用, 其诱导胃癌细胞凋亡过程中细胞内游离 Ca^{2+} 浓度表现为上调趋势.

邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛. 阿霉素对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1773-1776
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1773.asp

0 引言

肿瘤不仅是增殖和分化异常的疾病, 同时也是凋亡异常的疾病, 在我国胃癌发病率和死亡率均居所有恶性肿瘤之首位, 是威胁人类健康的最重要疾病之一, 而胃癌的

Y, Mizokami M. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 2003;124:925-932
16 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
17 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;12:332-335
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;74:1341-1348
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, 闫丽, 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, 阮丽花, 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 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
23 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
24 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
25 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
26 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
27 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
28 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
29 Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

阿霉素对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响

邢承忠, 路 平, 郭晓临, 刘 瑾, 徐惠绵, 袁 媛

邢承忠, 路平, 刘瑾, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科
辽宁省沈阳市 110001
郭晓临, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所
辽宁省沈阳市 110001
辽宁省教育厅课题资助项目, No. 202013171
通讯作者: 邢承忠, 110001, 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科. xcz1966@yahoo.com.cn
电话: 024-23256666-6227
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨阿霉素诱导胃癌细胞凋亡过程中细胞内游离 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}] i)的变化特点及意义.

方法: 选择阿霉素诱导胃癌细胞凋亡, 采用光镜、电镜、琼脂糖凝胶电泳和流式细胞仪检测凋亡;Fura-2荧光负荷技术测定[Ca^{2+}] i.

结果: 4 μg/mL阿霉素作用于胃癌细胞24 h出现典型的凋亡改变, 即光镜和电镜见凋亡小体、细胞皱缩、染色质固缩和片段化, 琼脂糖电泳观察可见DNA梯状条带, 流式细胞仪上见"凋亡峰";阿霉素诱导胃癌细胞凋亡过程中[Ca^{2+}] i于1/120(30 s), 2, 6, 12和24 h依次为191, 177, 151, 170和146 nmol/L, 均明显高于对照组127 nmol/L($P<0.01$ 或 $P<0.05$), [Ca^{2+}] i的升高以凋亡早期更为明显.

结论: 阿霉素可以通过诱导胃癌细胞凋亡发挥抗癌作用, 其诱导胃癌细胞凋亡过程中细胞内游离 Ca^{2+} 浓度表现为上调趋势.

邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛. 阿霉素对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1773-1776
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1773.asp

0 引言

肿瘤不仅是增殖和分化异常的疾病, 同时也是凋亡异常的疾病, 在我国胃癌发病率和死亡率均居所有恶性肿瘤之首位, 是威胁人类健康的最重要疾病之一, 而胃癌的

发生、发展和浸润转移也与凋亡密切相关[1-3].阿霉素是胃癌化疗的常用药物[4-5],其抗癌过程的信号调控机制尚不十分清楚，Ca^{2+}是各种生命现象信号传导中的重要信号分子[6-7]，但在阿霉素诱导的胃癌细胞凋亡中的意义，尚未见报道.关于阿霉素的抗癌作用,大多认为通过抑制胃癌细胞增殖而发挥其作用，本研究采用阿霉素诱导人胃癌细胞系BGC823凋亡，检测胃癌细胞凋亡各阶段细胞内游离Ca^{2+}浓度([Ca^{2+}] i)的变化，探讨阿霉素诱导胃癌细胞凋亡的作用以及该过程中细胞内游离Ca^{2+}浓度的变化特点及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640为美国LIFE TECH公司产品;胰蛋白酶(Trypsin)为美国Difco公司产品;钙荧光指示剂Fura-2/AM为美国Sigma公司产品;人胃癌细胞系BGC823由北京肿瘤研究所惠赠.

1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞培养和诱导凋亡检测 人胃癌细胞系BGC823复苏后培养于含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640营养液中，置于CO_2培养箱(37℃，50 mL/L的CO_2，950 mL/L的相对湿度)，2-3 d传代一次.取对数生长期细胞，加阿霉素至终浓度为4 mg/L，选择不同时间点用光镜、常规透射电镜和扫描电镜制片,观察胃癌细胞凋亡的形态学变化.收集各时间点细胞(10^6个)，提取DNA，用含溴化乙锭的15 g/L琼脂糖电泳观察DNA条带，照相;收集阿霉素处理的各个时间点细胞(10^6个)，制成细胞悬液，用流式细胞仪进行细胞周期分析，激光激发波长为488 nm.

1.2.2 细胞内游离Ca^{2+}浓度测定 胃癌细胞系BGC823加阿霉素后不同时间收集细胞，消化后，用100 mL/L的RPMI 1640洗涤2次，细胞悬液37℃预温5 min，加入终浓度5 μmol/L Fura-2/AM，37℃，恒温振荡45 min，持续通950 mL/L O_2，50 mL/L CO_2混合气，以一定量HPSS终止反应，1 000 r/min离心5 min，弃上清，再次洗涤1次(同上)，最后细胞悬液于HPSS中调整细胞数为2×10^9/L，每次测细胞内游离Ca^{2+}浓度前再以HPSS离心洗涤1次(同上)，然后37℃复温5 min，以分光光度计检测，发射光波长为510 nm，激发光波长为340及380 nm，两波长下最大荧光由加入终浓度为2 g/L Triton测得，最小荧光由加入终浓度为8 mmol/L(pH>8.5)的EGTA获得,每次测细胞内游离Ca^{2+}浓度前输入在上述两激发波下测得的细胞悬液自发荧光值及解离常数(224 nmol/L)，输入电脑软件运算可得出细胞内游离Ca^{2+}浓度.

统计学处理 用t检验，$P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

2.1 阿霉素诱导胃癌细胞系BGC823凋亡及其检测 4 μg/mL阿霉素到终浓度为诱导凋亡，加药后24 h出现典型的凋亡改变，即相差显微镜:用阿霉素处理24 h后见细胞核浓缩，细胞变圆，可见膜突起和起泡，细胞完整，见凋亡小体;透射电镜:收集阿霉素处理24 h细胞，电镜观察见典型凋亡所见，核染色质积聚边集，新月形或帽状，细胞器结构清晰，胞质浓缩或裂解成质膜包绕的碎片;扫描电镜:细胞变圆，可见胞膜突起和起泡，胞核浓缩;琼脂糖凝胶电泳:顺铂处理24 h，在电泳带上呈现有一定间隔的梯状条带,对照组无此特征;流式细胞仪:阿霉素处理24 h,见G1峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型.

2.2 细胞内游离Ca^{2+}浓度测定结果 未加阿霉素处理的对照组细胞内游离钙离子浓度波动于124-130 nmol/L，平均浓度为127 ± 3 nmol/L.加阿霉素至终浓度4 mg/L，诱导凋亡，检测处理1/120(30 s)，2，6，12和24 h后细胞内游离钙离子浓度,结果表明,细胞凋亡各阶段细胞内游离钙离子浓度明显升高($P<0.05$)，而以处理30 s时最高(表1).

表1 阿霉素诱导胃癌细胞凋亡过程中[Ca^{2+}]i变化(mean ± SD)

加药时间	[Ca^{2+}]i(nmol/L)	P
30 s	191 ± 12	<0.01
2 h	177 ± 15	<0.01
6 h	151 ± 9	<0.01
12 h	170 ± 13	<0.01
24 h	146 ± 10	<0.05
对照组	127 ± 3	

3 讨论

我国胃癌发病率和死亡率均居所有恶性肿瘤之首位.胃癌发生机制的研究表明其是多阶段、多步骤和多因素共同作用的结果，包括细胞增殖过度、分化异常和凋亡减少[8-10]，近年来对凋亡在胃癌发生过程中的作用日趋受到重视，而凋亡的信号调控机制尚不十分清楚.细胞内信号传导过程主要包括三个信使系统[11-13]:腺苷酸环化酶系统，肌醇脂质系统和钙-钙调蛋白系统，三个信使系统中的主要信号分子包括环磷酸腺苷、三磷酸肌醇、蛋白激酶C和Ca^{2+}等.从分子水平探讨肿瘤细胞发生机制的研究日趋受到学者们的重视,对其信号传导机制的研究倍受关注，近年对钙信号传导的研究涉及包括肿瘤发生在内的很多生命现象[14-15].研究[16]表明细胞内游离钙离子浓度的变化来源于细胞外Ca^{2+}通过细胞膜Ca^{2+}通道的跨膜转运和细胞内Ca^{2+}池释放共同作用的结果，细胞膜Ca^{2+}通道分为受体操纵性钙通道和电压依赖性钙通道,钙通道开放可使细胞外钙进入,导致细胞内游离钙离子浓度升高,同时可以启动Ryanodine受体(RyR)系统而触发Ca^{2+}诱导的Ca^{2+}释放(CICR机制).细胞内贮钙主要通过三磷酸肌醇受体(IP_3R)系统和RyR系统来动员，IP_3R和RyR分布于各种细胞的肌浆网(ER)膜上,当细胞外信息通过G蛋白介导激活磷脂酶C，水解磷脂酰肌醇4，5-二磷酸生成第二信使IP_3和二酰基甘油(DG)，IP_3激活ER上的IP_3R，使Ca^{2+}

释放增加(IICR机制)，细胞内游离钙离子浓度升高[17]；加之CICR机制，二者协同作用使细胞内游离钙离子浓度升高.研究[18-19]发现细胞内Ca^{2+}信号是细胞多条信号传导途径的枢纽，对钙信号的研究逐渐受到重视.正常状态下Ca^{2+}主要存在于细胞外，细胞内游离Ca^{2+}含量很低，然而正是这些含量甚微的Ca^{2+}却发挥着重要作用[20-21].因此，本研究首先选择细胞内游离Ca^{2+}作为研究阿霉素诱导的胃癌细胞凋亡的信号传导机制的突破点，应用Fura-2为结合Ca^{2+}的荧光指示剂测定阿霉素诱导的胃癌细胞凋亡各阶段细胞内游离钙离子浓度，观察其动态变化.

本研究首先用阿霉素诱导胃癌细胞凋亡，以建立凋亡模型，为下一步实验奠定基础，结果表明，加阿霉素到终浓度为4 mg/L诱导凋亡，加药后24 h出现典型的凋亡改变.关于阿霉素的抗癌作用，大多数学者[22-24]认为通过抑制胃癌细胞增殖而发挥其作用，而本研究结果显示阿霉素诱导胃癌细胞凋亡也是其抗肿瘤作用的重要机制，说明阿霉素可以通过诱导胃癌细胞凋亡发挥抗癌作用.

为进一步研究阿霉素诱导胃癌细胞凋亡的分子机制，特别是信号传导机制，本研究选择细胞内游离Ca^{2+}作为研究其信号传导机制的突破点，细胞内游离钙离子浓度的变化来源于细胞外Ca^{2+}通过细胞膜Ca^{2+}通道的跨膜转运和细胞内Ca^{2+}池释放共同作用的结果[25-26]，本研究发现对照组细胞内游离Ca^{2+}浓度为127 nmol/L，加阿霉素诱导凋亡的过程中，细胞内游离Ca^{2+}浓度波动于191-146 nmol/L，明显高于对照组，提示Ca^{2+}信号参与此凋亡过程，并作为一个重要的信号分子发挥作用.既往用其他药物诱导肿瘤细胞凋亡时，也发现细胞内游离Ca^{2+}浓度升高可激活Ca^{2+}依赖核酸内切酶引起DNA片段化和细胞凋亡[27-28].本研究证明阿霉素诱导胃癌细胞凋亡时细胞内游离Ca^{2+}浓度也升高，与其他肿瘤细胞凋亡时细胞内游离Ca^{2+}浓度变化一致，说明Ca^{2+}在阿霉素诱导胃癌细胞凋亡过程中也起重要作用.

本研究发现阿霉素诱导胃癌细胞凋亡是其抗癌作用重要机制，钙离子信号可作为一个重要的信号分子，参与阿霉素诱导胃癌细胞凋亡过程，同时，也为抗信号传导诱导胃癌细胞凋亡的研究奠定基础.

4 参考文献

1 Ma L, Xie YL, Yu Y, Zhang QN. Apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells induced by mitomycin combined with sulindac. *World J Gastroenterol* 2005;11:1829-1832

2 Yeo M, Kim DK, Kim YB, Oh TY, Lee JE, Cho SW, Kim HC, Hahm KB. Selective induction of apoptosis with proton pump inhibitor in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:8687-8696

3 Lee JH, Soung YH, Lee JW, Park WS, Kim SY, Cho YG, Kim CJ, Seo SH, Kim HS, Nam SW, Yoo NJ, Lee SH, Lee JY. Inactivating mutation of the pro-apoptotic gene BID in gastric cancer. *J Pathol* 2004;202:439-445

4 Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, Bottcher K, Siewert JR, Hofler H. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 2003;98:1521-1530

5 Lee SH, Kang WK, Park J, Kim HY, Kim JH, Lee SI, Park JO, Kim K, Jung CW, Park YS, Im YH, Lee MH, Park K. Combination chemotherapy with epirubicin, docetaxel and cisplatin (EDP) in metastatic or recurrent, unresectable gastric cancer. *Br J Cancer* 2004;91:18-22

6 Delmas P, Padilla F, Osorio N, Coste B, Raoux M, Crest M. Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:1374-1383

7 Anyatonwu GI, Ehrlich BE. Calcium signaling and polycystin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:1364-1373

8 Wang MC, Yang YM, Li XH, Dong F, Li Y. Maspin expression and its clinicopathological significance in tumorigenesis and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:634-637

9 Tu SP, Jiang XH, Lin MC, Cui JT, Yang Y, Lum CT, Zou B, Zhu YB, Jiang SH, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Kung HF, Wong BC. Suppression of survivin expression inhibits *in vivo* tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res* 2003;63:7724-7732

10 Eguchi H, Carpentier S, Kim SS, Moss SF. P27kip1 regulates the apoptotic response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*. *Gut* 2004;53:797-804

11 Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 2003;13:1259-1268

12 Lee M, Hwang JT, Lee HJ, Jung SN, Kang I, Chi SG, Kim SS, Ha J. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J Biol Chem* 2003;278:39653-39661

13 Ong DB, Colley SM, Norman MR, Kitazawa S, Tobias JH. Transcriptional regulation of a BMP-6 promoter by estrogen receptor alpha. *J Bone Miner Res* 2004;19:447-454

14 Bootman MD, Thomas D, Tovey SC, Berridge MJ, Lipp P. Nuclear calcium signalling. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:371-378

15 Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2001;4:261-267

16 Lee HC. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev* 1997;77:1133-1164

17 Zweifach A, Lewis RS. Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and-independent mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270:14445-14451

18 Fellner SK, Rybczynski R, Gilbert LI. Ca2+ signaling in prothoracicotropic hormone-stimulated prothoracic gland cells of Manduca sexta: evidence for mobilization and entry mechanisms. *Insect Biochem Mol Biol* 2005;35:263-275

19 Hansen MR, Bok J, Devaiah AK, Zha XM, Green SH. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases II and IV both promote survival but differ in their effects on axon growth in spiral ganglion neurons. *J Neurosci Res* 2003;72:169-184

20 Young KW, Nash MS, Challiss RA, Nahorski SR. Role of Ca2+ feedback on single cell inositol 1, 4, 5-trisphosphate oscillations mediated by G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2003;278:20753-20760

21 Xu HT, Yuan XB, Guan CB, Duan S, Wu CP, Feng L. Calcium signaling in chemorepellant Slit2-dependent regulation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:4296-4301

22 Obata T, Toyota M, Satoh A, Sasaki Y, Ogi K, Akino K, Suzuki H, Murai M, Kikuchi T, Mita H, Itoh F, Issa JP, Tokino T, Imai K. Identification of HRK as a target of epigenetic inactivation in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:6410-6418

23 Kang HC, Kim IJ, Park JH, Shin Y, Ku JL, Jung MS, Yoo BC, Kim HK, Park JG. Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res* 2004;10:272-284

24 Wohrer SS, Raderer M, Hejna M. Palliative chemotherapy for advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 2004;15:1585-1595

25 邢承忠,陈峻青.细胞内游离钙浓度在胃癌细胞凋亡过程中的动态变化发生机制. 中华医学杂志 1999;79:377-380
26 Takahashi E, Nagasu T. Expression pattern of voltage-dependent calcium channel alpha1 and beta subunits in adrenal gland of N-type Ca2+ channel alpha1B subunit gene-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 2005;271:91-99
27 Li W, Li J, Liu W, Altura BT, Altura BM. Alcohol-induced apoptosis of canine cerebral vascular smooth muscle cells: role of extracellular and intracellular calcium ions. *Neurosci Lett* 2004;354:221-224
28 Lang F, Gulbins E, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Huber SM, Duranton C, Lang KS, Lang PA, Wieder T. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *J Mol Recognit* 2004;17:473-480

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨

刘敬军,郑长青,潘丽丽,闻 英,胡刚正

刘敬军,郑长青,潘丽丽,闻英,胡刚正,中国医科大学第二临床学院 辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 刘敬军,110001,辽宁省沈阳市和平区北二马路92号,中国医科大学第二临床学院. shyliji@yahoo.com.cn
电话:024-23281706 传真:024-23280417
收稿日期:2005-05-08 接受日期:2005-06-08

摘要

目的: 对三硝基苯磺酸(TNBS)、葡聚糖硫酸钠(DSS)及恶唑酮三种外源性化学刺激物建立的BALB/C小鼠炎症性肠病(IBD)模型的特征加以比较探讨,以筛选合适的克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)的动物模型.

方法: 将BALB/C小鼠50只随机平均分成5组,即恶唑酮组、TNBS组、DSS组、A对照组(500 mL/L乙醇灌肠)、B对照组(自由饮用蒸馏水),每组小鼠给药后观察并记录每只小鼠一般变化,实验第8 d处死全部小鼠,留取结肠标本,行病理切片检查.

结果: 恶唑酮组、TNBS组、DSS组小鼠给药后均出现IBD的一般表现,恶唑酮组、TNBS组及DSS组小鼠DAI计分分别较A对照组及B对照组有统计学差异($P<0.05$).恶唑酮组、DSS组小鼠病理改变类似人UC病理改变,病理计分较A、B对照组有统计学差异($P<0.05$);TNBS组小鼠病理改变类似人CD病理改变,病理计分较A对照组有统计学差异($P<0.05$).

结论: BALB/C小鼠恶唑酮致敏后灌肠及自由饮用DSS能够诱导出较理想的病理改变类似于人UC的动物模型;TNBS灌肠能够诱导出较理想的病理改变类似于人CD的动物模型.

刘敬军,郑长青,潘丽丽,闻英,胡刚正. BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1776-1778
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1776.asp

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性非特异性胃肠道炎症性疾病,包括克罗恩病(Crohn disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC).本病呈世界性分布,也是严重危害我国人民健康的疾病,且近年来其发病率呈逐年上升趋势.IBD病因至今不明,发病中有免疫因素[1-3]和各种炎症递质的参与.目前临床以水杨酸制剂、皮质激素和免疫抑制剂等药物治疗为主,但疗效不够满意,且长期应用有较多副作用,因此建立理想的动物模型对阐明该病的病因、发病机制及观察药物疗效有重要意义.由于IBD的病因、发病机制复杂,所以很难建立理想的动物模型.通过外源性化学刺激物诱导鼠肠道黏膜产生免疫反应来建立IBD动物模型是一种常用的方法.本研究应用最为常见的三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)、葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)、恶唑酮(oxazolone)三种外源性化学刺激物分别建立BALB/C小鼠IBD模型,以期对该方法做一较为全面的探讨,以筛选合适的CD和UC的动物模型.

1 材料和方法

1.1 *材料* 动物选用6-8 wk SPF级BALB/C♀小鼠,体质量约20-25 g,由中国医科大学附属第二临床学院动物实验中心提供.恶唑酮、TNBS、DSS(M_r 5 000)均由Sigma公司提供.

1.2 *方法* 取50只小鼠随机分为5组,分别为恶唑酮组、TNBS组、DSS组、A对照组、B对照组,每组10只.实验前5 d 30 g/L恶唑酮无水乙醇溶液0.15 mL涂抹恶唑酮组小鼠腹部皮肤暴露部位,范围2 cm×2 cm.实验

25 邢承忠,陈峻青.细胞内游离钙浓度在胃癌细胞凋亡过程中的动态变化发生机制. 中华医学杂志 1999;79:377-380
26 Takahashi E, Nagasu T. Expression pattern of voltage-dependent calcium channel alpha1 and beta subunits in adrenal gland of N-type Ca2+ channel alpha1B subunit gene-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 2005;271:91-99
27 Li W, Li J, Liu W, Altura BT, Altura BM. Alcohol-induced apoptosis of canine cerebral vascular smooth muscle cells: role of extracellular and intracellular calcium ions. *Neurosci Lett* 2004;354:221-224
28 Lang F, Gulbins E, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Huber SM, Duranton C, Lang KS, Lang PA, Wieder T. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *J Mol Recognit* 2004;17:473-480

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨

刘敬军,郑长青,潘丽丽,闻 英,胡刚正

刘敬军,郑长青,潘丽丽,闻英,胡刚正,中国医科大学第二临床学院 辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 刘敬军,110001,辽宁省沈阳市和平区北二马路92号,中国医科大学第二临床学院. shyliji@yahoo.com.cn
电话:024-23281706 传真:024-23280417
收稿日期:2005-05-08 接受日期:2005-06-08

摘要

目的: 对三硝基苯磺酸(TNBS)、葡聚糖硫酸钠(DSS)及恶唑酮三种外源性化学刺激物建立的BALB/C小鼠炎症性肠病(IBD)模型的特征加以比较探讨,以筛选合适的克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)的动物模型.

方法: 将BALB/C小鼠50只随机平均分成5组,即恶唑酮组、TNBS组、DSS组、A对照组(500 mL/L乙醇灌肠)、B对照组(自由饮用蒸馏水),每组小鼠给药后观察并记录每只小鼠一般变化,实验第8 d处死全部小鼠,留取结肠标本,行病理切片检查.

结果: 恶唑酮组、TNBS组、DSS组小鼠给药后均出现IBD的一般表现,恶唑酮组、TNBS组及DSS组小鼠DAI计分分别较A对照组及B对照组有统计学差异($P<0.05$).恶唑酮组、DSS组小鼠病理改变类似人UC病理改变,病理计分较A、B对照组有统计学差异($P<0.05$);TNBS组小鼠病理改变类似人CD病理改变,病理计分较A对照组有统计学差异($P<0.05$).

结论: BALB/C小鼠恶唑酮致敏后灌肠及自由饮用DSS能够诱导出较理想的病理改变类似于人UC的动物模型;TNBS灌肠能够诱导出较理想的病理改变类似于人CD的动物模型.

刘敬军,郑长青,潘丽丽,闻英,胡刚正. BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1776-1778
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1776.asp

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性非特异性胃肠道炎症性疾病,包括克罗恩病(Crohn disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC).本病呈世界性分布,也是严重危害我国人民健康的疾病,且近年来其发病率呈逐年上升趋势.IBD病因至今不明,发病中有免疫因素[1-3]和各种炎症递质的参与.目前临床以水杨酸制剂、皮质激素和免疫抑制剂等药物治疗为主,但疗效不够满意,且长期应用有较多副作用,因此建立理想的动物模型对阐明该病的病因、发病机制及观察药物疗效有重要意义.由于IBD的病因、发病机制复杂,所以很难建立理想的动物模型.通过外源性化学刺激物诱导鼠肠道黏膜产生免疫反应来建立IBD动物模型是一种常用的方法.本研究应用最为常见的三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)、葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)、恶唑酮(oxazolone)三种外源性化学刺激物分别建立BALB/C小鼠IBD模型,以期对该方法做一较为全面的探讨,以筛选合适的CD和UC的动物模型.

1 材料和方法

1.1 *材料* 动物选用6-8 wk SPF级BALB/C♀小鼠,体质量约20-25 g,由中国医科大学附属第二临床学院动物实验中心提供.恶唑酮、TNBS、DSS(M_r 5 000)均由Sigma公司提供.

1.2 *方法* 取50只小鼠随机分为5组,分别为恶唑酮组、TNBS组、DSS组、A对照组、B对照组,每组10只.实验前5 d 30 g/L恶唑酮无水乙醇溶液0.15 mL涂抹恶唑酮组小鼠腹部皮肤暴露部位,范围2 cm×2 cm.实验

前24 h，恶唑酮组、TNBS组、A对照组小鼠禁食(不禁水)，先用50 g/L水合氯醛0.15 mL腹腔注射使小鼠轻度麻醉，约25 min以后用套接了小号导尿管的1 mL注射器抽吸药液，从肛门将导尿管缓慢插入约3.5 cm，然后将药液缓慢注入，停20 s后抽出导尿管，再将小鼠倒悬约30 s后放入盒中.恶唑酮组灌注10 g/L恶唑酮500 mL/L乙醇溶液0.15 mL，TNBS组灌注20 g/L TNBS 500 mL/L乙醇溶液0.1 mL，A对照组灌注500 mL/L乙醇溶液0.15 mL.DSS组、B对照组小鼠实验当天早晨开始自由饮液，DSS组小鼠饮用液体为5 g/L DSS蒸馏水溶液，B对照组小鼠饮用液体为蒸馏水，连续7 d.实验第8 d处死全部小鼠，大体观察肠壁，分离结肠，沿肠系膜缘剪开肠腔，生理盐水冲洗粪便，留取结肠标本，40 g/L甲醛固定，行病理切片，苏木精-伊红染色检查.观察指标为疾病活动指数(DAI)、病理组织学计分，评分标准见表1[4]、2[5].

表1 DAI评分标准

体质量下降(%)	大便性状	便血	计分
无	正常	隐血(-)	0
1-5	松散	隐血(+)	1
5-10			2
10-15	稀便	肉眼血便	3
>15			4

统计学处理 所有计算均用SPSS 10.0统计软件来完成，数据用mean ± SD表述，各组数据之间的比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 一般情况 恶唑酮组、TNBS组、DSS组小鼠分别于第2、3 d开始全部出现稀便及明显体质量下降，其中恶唑酮组4只小鼠出现血便，4只小鼠便潜血阳性;TNBS组7只小鼠出现血便，3只小鼠便潜血阳性;DSS组3只小鼠出现血便，5只小鼠便潜血阳性.A对照组小鼠第1 d便开始出现松散便或稀便，但第7 d大便已基本正常，其中5只小鼠体质量稍下降.B对照组小鼠仅有2只出现体质量稍下降.各组小鼠DAI评分见表3.

2.2 大体形态 恶唑酮组、DSS组小鼠黏膜病变从肛门侧自下向上连续性发展，逐渐减轻，直肠最为严重，近端结肠几乎正常，病变部黏膜呈中、重度充血水肿，散在糜烂、浅溃疡.TNBS组小鼠病变以结肠末端为主，但可达近端结肠，2只小鼠病变达末端小肠，病变部黏膜呈充血水肿，糜烂、坏死，多发溃疡，溃疡深大，坏死严重，肠腔狭窄.A、B对照组小鼠结肠黏膜基本正常.

表3 各组小鼠DAI评分(mean ± SD)

组别	n	DAI计分
恶唑酮组	10	8.60 ± 1.26[a]
TNBS组	10	9.10 ± 1.52[a]
DSS组	10	8.20 ± 1.32[c]
A对照组	10	2.70 ± 1.83
B对照组	10	0.20 ± 0.42

[a]$P<0.05$ *vs* A对照组;[c]$P<0.05$ *vs* B对照组.

2.3 光镜下病理形态 恶唑酮组、DSS组小鼠黏膜均见中、重度充血水肿，浅溃疡，仅1例恶唑酮组小鼠溃疡达肌层，恶唑酮组小鼠黏膜、黏膜下层以淋巴细胞浸润为主，而DSS组小鼠黏膜、黏膜下层以中性粒细胞浸润为主.TNBS组小鼠黏膜充血水肿，上皮脱落、坏死，溃疡形成，部分溃疡达浆膜层，黏膜、黏膜下层以中性粒细胞浸润为主.A对照组4例出现黏膜、黏膜下层轻度细胞浸润.B对照组仅2例小鼠出现黏膜、黏膜下层轻度细胞侵浸润.各组小鼠病理计分见表4.

表4 各组小鼠病理计分(mean ± SD)

组别	n	病理计分
恶唑酮组	10	13.20 ± 1.69[a]
TNBS组	10	14.00 ± 1.15[a]
DSS组	10	12.30 ± 1.64[c]
A对照组	10	1.00 ± 1.33
B对照组	10	0.60 ± 0.97

[a]$P<0.05$ *vs* A对照组;[c]$P<0.05$ *vs* B对照组.

3 讨论

IBD的许多研究成果来源于IBD动物模型，因而构建合适的IBD动物模型对IBD的研究非常重要.目前，建立IBD动物模型的方法主要有4种:第1种是某些动物可自

表2 病理组织学计分标准

上皮损伤和溃疡形成	溃疡深度	水肿	淋巴，单核，浆细胞浸润	浸润深度	中性粒细胞浸润	浸润深度	嗜酸性粒细胞浸润	浸润深度	计分
无		无	无		无		无		0
糜烂	黏膜下层	轻度	轻度	黏膜下层	轻度	黏膜下层	轻度	黏膜下层	1
溃疡	肌层	中度	中度	肌层	中度	肌层	中度	肌层	2
	浆膜层	重度	重度	浆膜层	重度	浆膜层	重度	浆膜层	3

然发生肠道黏膜炎症，此类模型的存在提示炎症性肠病的发生可能与某些基因特征有关[3-4];第2种是通过基因敲除及转基因技术诱导的模型，此模型可从基因水平阐明肠道炎症的免疫发病机制;第3种是用异体结肠黏膜等作为抗原刺激造成慢性免疫性炎症;第4种是通过外源性化学刺激物而诱发的模型，其中第4种方式应用的较为普遍，而近年来应用较多的用来诱导IBD动物模型的化学刺激物是恶唑酮、TNBS及DSS.

恶唑酮是一种半抗原，应用其诱导IBD动物模型时，通过皮肤先致敏再灌肠给药,较直接灌肠给药能更好地模拟出IBD动物模型，本实验即先予30 g/L恶唑酮无水乙醇溶液0.15 mL涂抹小鼠皮肤暴露部位，再予10 g/L恶唑酮500 mL/L乙醇溶液0.15 mL灌肠，小鼠第2 d迅速发病，临床及病理表现均与UC相似.

DSS是由蔗糖合成的一种硫酸多糖体，具有和肝素一样的抗止血和抗凝血作用，其诱导的动物模型被广泛应用于实验性IBD研究.本实验应用50 g/L DSS蒸馏水溶液，给小鼠自由饮用，连续7 d，出现远端结肠急性炎症表现，病理及临床表现与UC相似，说明DSS诱导的动物模型适合UC的研究.

TNBS诱导的IBD动物模型具有CD的特点，本实验TNBS组小鼠结肠病理可见黏膜充血水肿，糜烂、坏死，多发溃疡，溃疡深大，部分溃疡达浆膜层，坏死严重，肠腔狭窄，病变可达小肠末端.

恶唑酮、DSS及TNBS诱导IBD动物模型的机制未完全阐明.大量证据显示Th1细胞和Th2细胞的平衡失调可能与IBD的发病相关[6-9].Th1细胞主要分泌干扰素-γ(IFN-γ)、白介素-2(IL-2);Th2细胞主要分泌白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5).Th1细胞、Th2细胞通过分泌细胞因子相互调节对方的生长分化，从而维持Th1细胞、Th2细胞之间的平衡，这一平衡的破坏与IBD的发病密切相关.已有研究[10-14]表明恶唑酮诱导的结肠炎IL-4升高，IFN-γ下降，主要由Th2细胞所介导，TNBS诱导的结肠炎IL-4下降，IFN-γ升高，主要由Th1细胞所介导，而DSS诱导的结肠炎IL-4、INF-γ均升高为非典型Th1细胞和Th2细胞反应.

4 参考文献

1 Kennedy RJ, Hoper M, Deodhar K, Enwin PJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. *Br J Surg* 2000;87:1346-1351

2 Mariani P, Bachetoni A, D'Alessandro M, Lomanto D, Mazzocchi P, Speranza V. Effector Th-l cells with cytotoxic function in the intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:2029-2035

3 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002;8:567-573

4 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702

5 Ekstrom CM. Oxazolone-induced colitis in rats:effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosal cylic acid . *Scand J Gastroenterol* 1998;33:174-179

6 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002;8:567-573

7 Rocken M, Racke M, Shevach EM. IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunol Today* 1996;17:225-231

8 Hogaboam CM, Vallance BA, Kumar A, Addison CL, Graham FL, Gauldie J, Collins SM. Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997;100:2766-2776

9 Adorini L, Sinigaglia F. Pathogenesis and immunotherapy of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997;18:209-211

10 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

11 Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002;17:629-638

12 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281-1290

13 Gotsman I, Shlomai A, Alper R, Rabbani E, Engelhardt D, Ilan Y. Amelioration of immune-mediated experimental colitis: tolerance induction in the presence of preexisting immunity and surrogate antigen bystander effect. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:926-932

14 牛凤丽, 郑萍, 刘文忠. 化学性结肠炎动物模型的研究进展. 国外医学·消化系疾病分册 2002;22:31-33

编辑 王谨晖 审读 张海宁

·临床经验·

社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响

张 玫,汤 哲,汤 欣,蔡 玲,牛小羽,孙书春

张玫,汤哲,汤欣,蔡玲,牛小羽,孙书春,首都医科大学宣武医院消化科 北京市 100053
通讯作者: 张玫,10053,北京市,首都医科大学宣武医院消化科.
zhang2955@sina.com
电话:010-63013355-2438
收稿日期:2005-02-28 接受日期:2005-04-09

摘要

目的: 评价北京地区老年人群幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的血清流行率及社会因素、饮食卫生习惯对感染的影响.

方法: 采用入户问卷调查的方法,调查北京不同地区(城区、郊区、山区)60岁及以上的老人2006例,应用免疫印迹法测定血清*H pylori*-IgG抗体.

结果: 老年人群总的*H pylori*感染率为83.4%;山区高于城区和郊区($P<0.001$),重体力劳动,低文化程度者*H pylori*感染率高于脑力劳动、高文化程度者($P<0.05$);高蛋白饮食、经常喝茶者*H pylori*感染率低于素食和不喝茶者($P<0.001$),吸烟饮酒者与不吸烟饮酒者*H pylori*感染率无显著差异.

结论: *Hpylori*在北京老年人群中存在着较高的血清流行率,社会因素和饮食习惯可以对*H pylori*的感染发生影响.

张玫,汤哲,汤欣,蔡玲,牛小羽,孙书春.社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响.世界华人消化杂志 2005;13(14):1779-1780
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1779.asp

0 引言

研究发现世界上至少有半数以上的人感染了*H pyolori*,而我国属*H pyolori*高感染地区.大量的流行病学调查结果显示,不同的国家和地区*H pyolori*的感染率有很大差别.总的来说,发展中国家人群中*H pyolori*的感染率高于经济发达国家.伴随社会的老龄化,老年人群*H pyolori*感染的状况应得到重视,为了了解北京地区老年人群的*H pyolori*感染状况及与感染有关的社会影响因素,我们于2000年对北京不同地区(城区,郊区,山区)的自然老年人群进行了*H pyolori*的血清流行病学调查,以探讨老年人群的*H pyolori*感染状况和影响因素,为制定相应的防治措施提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 采用整群随机抽样方法抽取调查了北京宣武区(城区)、大兴县(郊区)、怀柔县(山区)60岁及以上的老人2 006例,平均年龄70.9岁,其中男性1 005例(50.1%),女性1 001例(49.9%);城区966例(48.2%)、郊区522例(26.0%)、山区518例(25.8%).

1.2 方法 采用入户问卷调查的方式,调查内容涉及与*H pyolori*感染有关的人口学指标,饮食和卫生习惯,经济状况等,问卷后采血2 mL,离心后取血清冷藏备用.采用免疫印迹法测定血清*H pyolori*-IgG抗体.Autoblotsysem 36专用试剂盒由深圳市伯劳特生物制品有限公司提供.

统计学处理 结果采用χ^2检验,多因素分析采用Logistic回归.

2 结果

2.1 老年人群*H pyolori*感染状况 在2006例老人中,*H pyolori*阳性1 673例,阳性率为83.4%;其中男性老人*H pyolori*阳性有851例,占84.7%,女性老人*H pyolori*阳性有822例,占82.1%,两组比较无显著差异.

2.2 居住环境与*H pyolori*感染的关系 调查山区老人518例,*H pyolori*阳性472例,感染率为91.1%;城区老人966例,*H pyolori*阳性798例,感染率为82.6%;调查郊区老人522例,*H pyolori*阳性403例,感染率为77.2%.山区和城区*H pyolori*感染率明显高于郊区($P<0.001$).

2.3 职业与*H pyolori*感染的关系 调查脑力工作者272例,*H pyolori*阳性212例,感染率为77.9%;脑力为主轻体力工作者375例,*H pyolori*阳性302例,感染率为80.5%;以体力为主重体力工作者928例,*H pylori*阳性788例,感染率为84.9%,以体力为主重体力工作者*H pyolori*感染率明显高于脑力和轻体力工作者($P<0.05$).

2.4 文化程度与*H pyolori*感染的关系 调查大专以上学历206例,*H pylori*阳性157例,感染率为76.2%;中学文化程度394例,*H pylori*阳性325例,感染率为82.4%;小学文化程度532例,*H pylori*阳性460例,感染率为86.5%;文化程度为文盲者874例,*H pylori*阳性786例,感染率为89.8%.低文化(文盲 小学 中学)程度者*H pylori*感染率明显高于高文化(大专以上学历)程度者($P<0.05$).

2.5 饮食习惯与*H pyolori*感染的关系 调查日常生活饮食中副食以鸡、鸭、鱼、蛋、肉等高蛋白饮食为主的老人1 413例,*H pylori*阳性1 149例,感染率为81.3%;以蔬菜、水果等清淡饮食为主的老人593例,*H pylori*阳性524例,感染率为88.4%;以高蛋白饮食为主(每周进食鸡鸭鱼肉蛋在3 d以上,持续1-5 a以上)的老人*H pyolori*感染率明显低于以素食为主(每周每天吃蔬菜,偶尔吃肉类,为清淡饮食或素食.持续1-5 a以上)

的老人($P<0.001$). 调查经常喝茶(几乎每天喝)的老人681例，*H pylori*阳性552例，感染率为81.1%;不经常或不喝茶的老人1 324例，*H pyolori*阳性1 121例，感染率为84.7%;不喝茶老人*H pylori*感染率明显高于喝茶老人($P<0.05$).

2.6 卫生习惯与*H pyolori*感染的关系 调查吸烟和不吸烟老人*H pylori*感染率分别为85.1%和82.8%;饮酒和不饮酒老人*H pylori*感染率分别为83.5%和82.3%.吸烟和饮酒老人与不吸烟不饮酒老人*H pylori*感染率无显著差异($P>0.05$).

2.7 多因素分析与*H pylori*感染的关系 将本次研究的多个变量进行logistic多元回归分析，结果显示在排除多个变量间的相互作用后，共有四个变量对*H pylori*的感染率产生单独作用(表1).

表1 Logistic多元回归分析

流行因素	回归系数	标准误	T值	*P*	OR值
职业	0.536	0.192	7.769	0.005	1.710
地区	0.232	0.209	1.224	0.269	1.261
文化程度	−0.365	0.178	4.198	0.040	0.694
吸烟	0.033	0.180	0.034	0.854	1.034
饮酒	0.072	0.058	1.537	0.215	1.074
高蛋白饮食	−0.601	0.173	12.036	0.001	0.549
吃素食	0.940	0.555	2.871	0.090	2.561
喝茶	−0.303	0.142	4.533	0.033	1.353

3 讨论

自从认识到*H pylori*与多种消化系统疾病密切相关，人们就已开始注意到与*H pylori*感染有关的各种决定性因素.在欧美发达国家60岁以上的人群有50%感染*H pylori*，相比之下，在大多数发展中国家成年人的感染率是80-90%[1-3].推测这种差异是由于宿主因素、细菌因素和各种环境因素相互作用的结果[4-5].大量流行病学调查资料显示，性别、烟酒嗜好、饮用水源等因素和*H pyolori*感染率无显著关系，而年龄、社会经济状况、教育程度、卫生条件、居住环境、职业等因素和感染率显著相关.贫穷、教育程度低、卫生差、居住拥挤等都是*H pylori*感染的高危因素[6].我们对北京城区、郊区和山区的调查结果也证实了，山区老年人在经济收入、居住条件、卫生条件、健康状况等均比城区和郊区的老年人差，因此，山区老年人*H pylori*的感染率显著高于城区和郊区也证实了居住环境、卫生状况与*H pylori*的易感性密切相关.

社会环境因素对*H pylori*感染的影响是一个被广泛关注的问题.我们的调查显示，文化程度高的老年人，既往多从事脑力或轻体力劳动，经济条件较好;文化程度低或文盲的老年人，既往多从事重体力劳动，经济条件相对较差.对不同文化程度和职业的老年人研究发现，文化程度越高，*H pylori*的感染率越低，从事脑力工作的老年人*H pylori*的感染率显著低于从事重体力工作的老年人.提示职业和受教育程度可以影响*H pylori*的易感性.在对老年人饮食和卫生习惯的调查中发现，以肉食为主和经常喝茶的老年人*H pylori*的感染率显著低于以素食为主和不喝茶的老年人.因此高蛋白饮食和茶是否对避免或降低*H pylori*的感染具有保护意义尚有待进一步观察和证实.在调查中我们还发现吸烟和饮酒人群与不吸烟和不饮酒人群在*H pyolori*感染上无显著差异，与文献报道一致.

多因素回归分析发现，对*H pylori*的感染有独立影响的因素是职业、受教育程度、高蛋白饮食和喝茶.因此，关注社会环境因素对*H pylori*感染的影响，改善卫生状况和居住环境，采取有针对性的预防措施，可以从多个环节降低*H pylori*的感染率.

4 参考文献

1 Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* 1989;321:1562-1566

2 Megraud F, Brassens-Rabbe MP, Denis F, Belbouri A, Hao DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol* 1989;27:1870-1873

3 Graham DY, Adam E, Reddy GT, Agarwal JP, Agarwal R, Evans DJ Jr, Malaty HM, Evans DG. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infecter in India. Comparison of developing and developed countries. *Dig Dis Sci* 1991;36:1084-1088

4 Blaser MJ. *Helicobacter pylori* phenotypes associated with peptic ulceration. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;205:S1-5

5 Graham DY, Malaty HM, Go MF. Are there susceptible hosts to *Helicobacter pylori* infection? *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;205:S6-10

6 Megraud F. Transmission of *Helicobacter pylori*: fecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmcol Ther* 1995;9(Suppl 2):85-91

编辑 张海宁

·临床经验·

口服药物致食管溃疡22例

王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳

王孟春, 中国医科大学附属第二医院内镜中心 辽宁省沈阳市 110004
张丽瑶, 沈阳市传染病院 辽宁省沈阳市 110006
钟琳琳, 中国医科大学 辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 王孟春, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院内镜中心.
电话: 024-83956947 传真: 024-23892617
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 了解口服药物方式与食管溃疡的关系.

方法: 回顾性分析经胃镜检查存在口服药物所致食管溃疡患者的临床资料、胃镜所见和病理表现.

结果: 口服药物方式不当可致食管溃疡，大多发生于食管中段，溃疡表浅，形态规则，边缘规整.

结论: 口服药物方法不当可造成食管溃疡.

王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳. 口服药物致食管溃疡22例. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1781-1782
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1781.asp

0 引言

溃疡性疾病是消化系统常见的疾病，以十二指肠及胃溃疡多见，发生于食管的溃疡较少，而因口服药物所致的食管溃疡的发生率更低，文献报道亦较少. 中国医科大学附属二院2002-01/2004-12行胃镜检查发现食管溃疡122例，其中22例有口服药物方法不当的病史，其余有恶性溃疡31例，反流性食管炎60例、原因不明9例，现将因服药方式不当引起食管溃疡情况总结分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-12/2004-12我院行胃镜检查有口服药物方法不当病史的食管溃疡22例，<20岁1例，占4.5%; 21-30岁4例，占18.2%;31-40岁8例，占36.4%;41-50岁5例，占22.7%;51-60岁3例，占13.6%;>60岁1例，占4.5%. 其中男15例，女7例. 男女之比为2.14∶1.

1.2 方法 回顾性分析经胃镜检查存在口服药物所致食管溃疡患者的临床资料、胃镜所见和病理表现.

2 结果

2.1 病因 22例患者均有明确口服药物史，服药时饮水量少于30 mL者9例，干吞药物者(未饮水)6例，卧床服药者3例，服药后立即卧床者4例. 口服片剂者7例，口服胶囊者15例. 药物种类有抗生素、维生素等.

2.2 临床表现 患者既往无明确消化道疾病，均因口服药物后出现自觉症状，病程较短，无明确反酸、烧心症状. 其中吞咽困难5例，胸骨后疼痛进食时加重14例，上腹部不规则疼痛3例. 于症状出现后3-7 d行胃镜检查.

2.3 胃镜表现 均于食管内见溃疡性病变，形态规则，呈圆形或椭圆形，面积在0.8 cm×0.8 cm-1.0 cm×1.5 cm之间，边缘规整，表面少量白苔，溃疡表浅，周边黏膜可有充血水肿. 发生单个溃疡者12例，对吻溃疡者10例. 发生于食管上段3例，食管中段17例，食管下段2例.

2.4 病理结果 全部22例患者均取组织进行病理检查，病理结果显示为不同程度的炎性渗出、少量坏死组织、肉芽组织及鳞状上皮增生，符合食管溃疡.

3 讨论

引起食管良性溃疡的病因主要有:反流性食管炎、感染性食管炎、Barrett食管、Mallory-Weiss综合征、食管Crohn病、白塞综合征、食管憩室、食管裂孔疝;贲门失驰缓症;药物源性损伤;物理或化学性损伤等. 因口服药物所致食管溃疡较少见，从本组资料分析，药物所致食管溃疡临床特点如下:既往无上消化道疾病，均有明确服药史;服药方法不当;病程较短;以青壮年为主;自觉症状以吞咽困难、胸骨后疼痛进食时加重或上腹疼痛为主，无反酸、烧心;内镜表现为发生于食管中段的表浅溃疡，形态规则，呈圆形或椭圆形，边缘规整，周边黏膜可有充血水肿，可单发，亦可为对吻溃疡. 病理回报为食管溃疡.

药物所致食管溃疡发生的原因主要与食管的解剖结构有关. 食管为一扁平的肌肉性管状器官，是消化道各段中最狭窄的部分，上端起自咽下缘，向下经过后纵隔，穿过膈肌食管裂孔，下端终止于胃贲门. 食管可分为颈段、胸段、腹段，成人食管全长约25 cm，有3个生理性狭窄区. 第一个狭窄区在咽与食管连接处，正对第六颈椎水平，距门齿15 cm;第二个狭窄区在主动脉弓水平，左主支气管跨越食管左前方处，约在第4-5胸椎之间，距门齿约25 cm;第三个狭窄区在食管穿过食管裂孔处，在第十胸椎水平，距门齿约40 cm. 食管除沿脊柱的颈曲、胸曲作前后弯曲外，在左右方向亦有轻度弯曲[1]. 食管中段主动脉弓水平处由骨骼肌和平滑肌混合组成，食管的生理性蠕动降低，常是异物嵌顿、滞留的好发部位. 本组病例溃疡的发生可能与药物大多停滞在第二狭窄处有关，此结果与Al-Mofarreh *et al*[2]报道药物源性食管溃疡发生的部位相似.

口服药物时方法不当也是导致食管溃疡的重要原因[3]. 本组病例中患者缺乏基本的医疗保健常识,未能掌握正确的服药方法. 口服药物是最常见的给药途径,合理服用是安全的. 如在口服药物时不饮水或饮少量水,卧位服药或服药后立即卧床,均可导致药物在食管内通过缓慢,在局部停滞时间较长,药物产生的机械性刺激及药物溶解后侵蚀食管黏膜,导致食管溃疡的形成. 药物源性食管溃疡主要表现为服药后出现胸骨后疼痛、吞咽困难和吞咽痛,严重时可引起纵隔穿孔、出血或致死[4].

食管良性溃疡较为少见. 因此,胃镜检查中发现食管溃疡后常规取组织活检,有的因无异常发现常常多次取材,造成溃疡难以愈合,提示内镜医生在发现食管溃疡后要追问病史,以决定取材的次数和进一步治疗的措施. 通过分析本组病例,提示服药方式不当可引起食管溃疡. 因此,建议应学会正确的服药方法,以减少药物对食管黏膜的刺激,避免食管的损伤. 有人建议口服药物时应取站立位,充分饮水(>100 mL为好),服药后最好再站立90 s,避免口服药物后立即平卧及卧位服药,以减少药物黏附于食管壁上,利于药物顺利通过食管进入胃内,防止药物源性食管损伤的发生.

4 参考文献

1 李益农, 陆星华. 消化内镜学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2004: 250-251

2 Al-Mofarreh MA, Al Mofleh IA. Esophageal ulceration complicating doxycycline therapy. *World J Gastroenterol* 2003;9: 609-611

3 Huizar JF, Podolsky I, Goldberg J. Doxycycline-induced esophageal ulcers. *Rev Gastroenterol Mex* 1998;63:101-105

4 Kikendall JW, Friedman AC, Oyewole MA, Fleischer D, Johnson LF. Pill-induced esophageal injury. Case reports and review of the medical literature. *Dig Dis Sci* 1983;28: 174-182

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用

王 庆, 秦明放, 勾承月, 李 宁, 王震宇, 邹富胜

王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜, 天津市南开医院微创外科 天津市 300100

通讯作者: 秦明放, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院微创外科. qins88@sina.com

电话: 022-27022268-3487 传真: 022-27370655

收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨经内镜乳头括约肌预切开术在困难内镜逆行性胰胆管造影(ERCP)中的应用价值, 对其安全性做回顾性评价.

方法: 385例患者在实施ERCP诊疗操作中, 当常规方法不能使胆系显示或胆道深部插管困难时, 即用拉式弓状推进刀或针状刀行乳头预切开术(PST), 观察预切开术的治疗效果和近期并发症.

结果: 全组385例患者行PST后, ERCP诊治成功362例(94.0%), 失败23例(6.0%).第一次操作成功率90.1%, 其中单纯使用推进刀成功率67.8%, 联合应用针状刀后成功率升至86.2%;完全采用针状刀切开成功率91.2%.术后并发症23例(5.9%), 包括出血6例, 轻型胰腺炎8例, 高胰酶血症4例, 穿孔1例, 急性胆囊炎4例, 无内镜相关死亡.

结论: 乳头预切开术是ERCP诊疗困难时成功进入胆道的一项重要技术手段, 是常规ERCP诊疗技术的有益补充, 具有安全、有效的特点, 在提高ERCP诊疗成功率方面具有重要地位.

王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜. 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1782-1784
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1782.asp

0 引言

内镜乳头括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)作为内镜微创治疗胆胰疾病的重要技术手段已日益受到人们的重视及认同,但其成功的前提条件是选择性胆管造影及深部插管成功. 在某些生理解剖因素及病理改变情况下, 导丝、造影管及切开刀不能插入胆管致使内镜逆行性胰胆管造影(ERCP)诊治失败,此时妥善使用乳头预切开术(precut sphincterotomy, PST)将显著提高诊治成功率. 本文对近4 a来我院实施的385例PST病例进行回顾性分析, 探讨其在困难ERCP操作中的应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2004-12, 我院共实施ERCP诊治患

口服药物时方法不当也是导致食管溃疡的重要原因[3]. 本组病例中患者缺乏基本的医疗保健常识,未能掌握正确的服药方法. 口服药物是最常见的给药途径,合理服用是安全的. 如在口服药物时不饮水或饮少量水,卧位服药或服药后立即卧床,均可导致药物在食管内通过缓慢,在局部停滞时间较长,药物产生的机械性刺激及药物溶解后侵蚀食管黏膜,导致食管溃疡的形成. 药物源性食管溃疡主要表现为服药后出现胸骨后疼痛、吞咽困难和吞咽痛,严重时可引起纵隔穿孔、出血或致死[4].

食管良性溃疡较为少见. 因此,胃镜检查中发现食管溃疡后常规取组织活检,有的因无异常发现常常多次取材,造成溃疡难以愈合,提示内镜医生在发现食管溃疡后要追问病史,以决定取材的次数和进一步治疗的措施. 通过分析本组病例,提示服药方式不当可引起食管溃疡. 因此,建议应学会正确的服药方法,以减少药物对食管黏膜的刺激,避免食管的损伤. 有人建议口服药物时应取站立位,充分饮水(>100 mL为好),服药后最好再站立90 s,避免口服药物后立即平卧及卧位服药,以减少药物黏附于食管壁上,利于药物顺利通过食管进入胃内,防止药物源性食管损伤的发生.

4 参考文献

1 李益农, 陆星华. 消化内镜学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2004: 250-251

2 Al-Mofarreh MA, Al Mofleh IA. Esophageal ulceration complicating doxycycline therapy. *World J Gastroenterol* 2003;9: 609-611

3 Huizar JF, Podolsky I, Goldberg J. Doxycycline-induced esophageal ulcers. *Rev Gastroenterol Mex* 1998;63:101-105

4 Kikendall JW, Friedman AC, Oyewole MA, Fleischer D, Johnson LF. Pill-induced esophageal injury. Case reports and review of the medical literature. *Dig Dis Sci* 1983;28: 174-182

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用

王 庆, 秦明放, 勾承月, 李 宁, 王震宇, 邹富胜

王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜, 天津市南开医院微创外科 天津市 300100

通讯作者: 秦明放, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院微创外科. qins88@sina.com

电话: 022-27022268-3487 传真: 022-27370655

收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨经内镜乳头括约肌预切开术在困难内镜逆行性胰胆管造影(ERCP)中的应用价值, 对其安全性做回顾性评价.

方法: 385例患者在实施ERCP诊疗操作中, 当常规方法不能使胆系显示或胆道深部插管困难时, 即用拉式弓状推进刀或针状刀行乳头预切开术(PST), 观察预切开术的治疗效果和近期并发症.

结果: 全组385例患者行PST后, ERCP诊治成功362例(94.0%), 失败23例(6.0%).第一次操作成功率90.1%, 其中单纯使用推进刀成功率67.8%, 联合应用针状刀后成功率升至86.2%;完全采用针状刀切开成功率91.2%.术后并发症23例(5.9%), 包括出血6例, 轻型胰腺炎8例, 高胰酶血症4例, 穿孔1例, 急性胆囊炎4例, 无内镜相关死亡.

结论: 乳头预切开术是ERCP诊疗困难时成功进入胆道的一项重要技术手段, 是常规ERCP诊疗技术的有益补充, 具有安全、有效的特点, 在提高ERCP诊疗成功率方面具有重要地位.

王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜. 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1782-1784
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1782.asp

0 引言

内镜乳头括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)作为内镜微创治疗胆胰疾病的重要技术手段已日益受到人们的重视及认同,但其成功的前提条件是选择性胆管造影及深部插管成功. 在某些生理解剖因素及病理改变情况下, 导丝、造影管及切开刀不能插入胆管致使内镜逆行性胰胆管造影(ERCP)诊治失败,此时妥善使用乳头预切开术(precut sphincterotomy, PST)将显著提高诊治成功率. 本文对近4 a来我院实施的385例PST病例进行回顾性分析, 探讨其在困难ERCP操作中的应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2004-12, 我院共实施ERCP诊治患

者4 098例，施行EST术1 920例，其中用常规方法不能完成选择性胆管造影及深部插管成功而实施PST术385例，占9.4%.本组385例中男178例，女207例;年龄25-88岁，平均年龄61.7岁.诊断Oddi括约肌狭窄合并胆总管结石156例，单纯缩窄性乳头炎58例，急性化脓性胆管炎46例，胆源性胰腺炎43例，肝门部胆管癌26例，胰头癌18例，壶腹癌13例，胆管下端癌19例，胆道蛔虫6例.采用日本FUJINON公司ED-250电子十二指肠镜;OLYMPUS公司KD-16Q-VB拉式弓型推进切开刀及KD-10Q-1针状切开刀;德国ERBE Icc80高频电发生器等.

1.2 *方法* 首先行常规ERCP，如反复性选择性胆管造影失败或虽胆管造影成功但胆管深部插管困难，则实施PST术,采用如下两种方法:(1)拉式弓型推进刀切开法:此型切开刀的特点是刀端鼻部甚短，仅约2 mm，切割钢丝长度1.5 cm.调整乳头处于视野的水平线上或稍偏下的位置，对准乳头的12点钟位，将切开刀头端部插入乳头开口处,调整切开刀使刀丝有效接触乳头开口上壁,使用纯切开电流(指数3.5-4.0)，于乳头11点钟位沿乳头长轴方向，稍微逆时针旋转身体使刀丝紧贴乳头上壁，动态抬高切开刀，在切开刀向乳头近端抬高运动中通电切开，逐步切开乳头上壁黏膜层2-3 mm.微退刀离开切开部，调整内镜并清洁乳头区，辨认乳头切开部的解剖关系,再次插刀至乳头开口起始部,逐步切开黏膜下层、乳头壶腹括约肌和前壁,若发现胆管开口或胆汁溢出,则进行插管造影,不成功病例可联合采用针状刀切开法.(2)针状刀切开法:调整乳头至内镜视野中央的理想位置,电刀出针3-5 mm，以下行方式从乳头隆起最高处或稍下方，自11点钟位向乳头开口处方向逐层切开，使用混合电流(指数2.5-3.0)，依次切开乳头黏膜、壶腹部括约肌和壶腹部前壁，电切时一旦发现管口样结构或胆汁溢出，及时采用超滑导丝试行插管.在切开的乳头前壁所形成的夹角处，胆汁流出及切开组织黄染部位插管往往容易获得成功.乳头预切开术后,可根据情况决定是否采用标准乳头切开法继续扩大切口.

2 结果

采用拉式弓型推进切开法87例，成功75例，其中联合应用针状刀切开法16例，成功率86.2%;单纯推进刀成功59例，成功率67.8%.针状刀切开法298例，成功272例，成功率91.2%.全组第一次操作成功率90.1%.在首次PST失败的38例中有25例于1 wk后待乳头水肿消退后再次尝试内镜诊治，全部采用针状刀切开法，成功15例，全组总成功例数362例，失败23例，诊治成功率94.0%.根据PST术后ERCP诊断结果进一步实施EST、乳头部活检、狭窄段胆管球囊扩张、网篮碎石、取石、取虫、鼻胆管引流及胆道内支架置入术.PST失败病例综合B超、CT、MRCP结果实施相应腹腔镜或开腹手术.术后出现并发症23例(5.9%)，其中乳头切开口处出血6例，4例经药物治疗后出血停止，2例行内镜下止血(0.1 g/L去甲肾上腺素溶液局部注射)成功，急性水肿性胰腺炎8例，高胰酶血症4例，十二指肠后壁腹膜后穿孔1例，均经中、西医结合非手术综合治疗痊愈.诱发急性胆囊炎4例，行急症腹腔镜胆囊切除术治愈，本组无内镜治疗后死亡病例(表1).

3 讨论

经过多年实践，ERCP插管技术已基本达到标准化，特别是超滑导丝的使用提高了选择性胆管插管成功率，同时又降低了注射性胰腺炎的发生率[1]，但仍有5-10%的患者选择性胆管插管失败.在生理解剖因素中如胆胰管共同管道过短或同一开口但中间有隔膜、壶腹部曲度过

表1 385例PST术诊治结果

病种	*n*	成功	失败	PST成功方法			并发症				
				推进刀	推进刀+针状刀	针状刀	出血	穿孔	胰腺炎	高胰酶血症	急性胆囊炎
Oddi氏括约肌狭窄合并胆总管结石	156	151	5	32	6	113	2	1	3	2	2
单纯缩窄性乳头炎	58	55	3	15	4	36	1	0	3	1	0
急性化脓性胆管炎	46	46	0	0	0	46	2	0	0	1	0
胆源性胰腺炎	43	42	1	2	1	39	0	0	0	0	2
肝门部胆管癌	26	23	3	5	2	16	0	0	1	0	0
胰头癌	18	14	4	1	1	12	0	0	0	0	0
胆管下端癌	19	14	5	2	1	11	0	0	0	0	0
壶腹癌	13	11	2	0	0	11	1	0	0	0	0
胆道蛔虫症	6	6	0	2	1	3	0	0	1	0	0
合计	385	362	23	59	16	287	6	1	8	4	4
		(94.0%)	(6.0%)	(16.3%)	(4.4%)	(79.3%)	(1.55%)	(0.25%)	(2.07%)	(1.03%)	(1.03%)

大、乳头开口狭小、乳头位于憩室内或憩室旁者，行选择性胆管插管往往很困难.病理情况如Oddi括约肌炎性狭窄、壶腹及乳头部肿瘤、结石嵌顿，切开刀不能准确插入胆管致使内镜诊治失败.PST技术在乳头插管困难情况下可有效切开括约肌，进一步完成ERCP诊疗程序，是常规ERCP诊疗技术的有益补充.经实践证明只要熟练掌握操作技巧，此项技术是安全、有效的，在提高ERCP诊疗成功率方面具有重要地位.本组PST诊治成功率为94.0%,与相关文献[2-3]报道相近.

采用拉式弓型推进刀切开法的前提条件是切开刀头端要准确插入乳头开口内，常用于胆管造影成功但深部插管困难病例或导丝反复进入胰管者.此术式的优点:(1)切开的深度容易控制，切线规整，层次清楚;(2)通电时间短，切开了部分乳头括约肌，避免了术后乳头水肿而导致的胰腺炎;(3)术后并发症相对较少，安全性较好.不足之处:(1)乳头开口狭小者插管较为困难，刀丝不能准确与乳头开口处相接触;(2)刀弓拉起时有时较难维持较理想的切开方向，且瞬间切开时刀丝容易偏离方位;(3)成功率偏低，本组成功率为67.8%(59/87)，仍然插管困难，可以联合应用针状刀切开法;(4)若壶腹部结石嵌顿或发现壶腹部占位病变则处理上不如针状刀方便.

综合国内外文献报道，使用针状刀完成PST术仍是当前主要的方法[2].本组针状刀切开法完成287例，占PST成功362例的79.3%.我们采用下行法分层切开方式，在动态操作过程中裸露刀丝始终位于视野中心，随着操作技艺的提高，良好的掌控乳头位于理想位置并熟练的利用抬钳器的下降较好的控制切开的方向和深度使得绝大多数PST术得以成功.本组首次针状刀切开成功率为91.2%(272/298).其优点:(1)可根据乳头不同形态调整出针长度，切开方向容易自如把握，切开时由术者控制切开速度、深度与长度，可减少因术者与助手配合不协调而导致的并发症的发生;(2)在壶腹部结石嵌顿时，针状刀切开法快速有效，可即刻清除嵌顿结石，解除胆道梗阻，及时终止急性化脓性胆管炎及胆源性胰腺炎向重症化发展.本组壶腹部结石嵌顿共51例,均治疗成功;(3)壶腹部占位病变因乳头开口下移或不清导致插管困难,针刀切开后,可即刻置管引流减轻黄疸,对黏膜下肿块型壶腹癌,可于切开后行乳头深部组织活检;(4)针状刀止血方便迅速,可经导管直接面对出血处冲注生理盐水清洁视野,电凝止血定位准确.不足之处:操作风险相对较大,尤其是切开深度不容易把握,对术者的技术要求较高.术中还应特别注意:(1)保持正确的切开方向,应与乳头隆起部的轴线方向一致,个别情况下可自10点钟位稍偏内下方切开,以增加显露胆管的机率;(2)切开速度应适当,要保持切线整齐,以防出现假道,使用混合电流,注意及时止血清洁视野;(3)一定要做到逐层切开，深度要恰当，过浅往往无法发现胆管开口，过深又容易引起穿孔，此为针状刀切开成败的关键;(4)当乳头张力不高，胆总管壶腹隆起不明显时,应避免切开刀插入位置离乳头开口过远,以防切开超过胆总管壁内段造成穿孔;(5)若反复插管均进入胰管，应考虑有解剖变异，如胆管右侧开口(胆管胰管型)，此时可在切开乳头的右侧壁寻找胆管开口.

客观地讲，实施PST术者均为ERCP困难病例，虽然多数情况下是安全的,但其毕竟属于创伤性操作,带有一定的盲目性，有时会导致治疗失败及术后并发症的发生.并发症的发生率与操作者经验及技术熟练程度密切相关，同一单位在不同时期比较并发症发生率可能会有差别,总的趋势是随着开展时间的增加,并发症发生率会逐渐下降[4].本组并发症发生率为5.9%，与相关文献[5]报道相近.分析原因一是技术性因素如切开部位、方向、长度、深度不能良好控制;二是乳头生理解剖因素如扁平乳头、憩室内、憩室旁乳头增加了PST的难度，乳头部变异血管易导致术中、术后出血;三是病理因素如瘢痕化质韧乳头切开困难，如在一部位反复切开，造成过多的组织凝固与水肿容易导致PST术后胰腺炎.结合本组资料我们认为做好如下几点对有效预防术后并发症的发生至关重要:(1)严格把握PST适应证，受术者必须具备治疗性ERCP指征，如胆道良恶性梗阻、胆管结石、oddi氏括约肌狭窄等.对实施ERCP的目的仅是为了明确诊断，当造影不成功时，一般不可贸然行PST，此时可选择MRCP等无创伤检查.胆总管下端狭窄超过2 cm也应视为PST禁忌证;(2)应由具有丰富EST操作经验的内镜医师实施操作;(3)操作过程困难、时间过长应审时度势停止操作，可待5-7 d乳头局部水肿消退后再行内镜治疗，往往能收到良好效果;(4)术后常规放置鼻胆管引流可减少术后并发症的发生，尤其是对预防急性胆管炎更有重要作用.

4 参考文献

1 Lella F, Bagnolo F, Colombo E, Bonassi U. A simple way of avoiding post-ERCP Pancreatitis. *Gastrointestinal Endoscopy* 2004;59:830-834

2 Katsinelos P, Mimidis K, Paroutoglou G, Christodoulou K, Pilpilidis I, Katsiba D, Kalomenopoulou M, Papagiannis A, Tsolkas P, Kapitsinis I, Xiarchos P, Beltsis A, Eugenidis N. Needle-knife papillotomy: a safe and effective technique in experienced hands. *Hepatogastroenterology* 2004;51:349-352

3 Larkin CJ, Huibregtse K. Precut sphincterotomy: indications, pitfalls, and complications. *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3:147-153

4 秦明放, 邹富胜, 王震宇, 范君度, 鲁焕章. 内镜十二指肠乳头电针开窗术691例分析. 中华消化内镜杂志 2001;18:95-96

5 胡冰, 周岱山, 龚彪, 王书智, 张凤梅, 王小琳. 乳头预切开术在内窥镜逆行胰胆管造影术中的应用. 世界华人消化杂志 1999;7:1052-1054

编辑 王谨晖 审读 张海宁

·临床经验·

肠镜检查肠道准备无效率的影响因素

蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜 泊

蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊, 南方医科大学南方医院消化内科研究所 广东省广州市 510515
通讯作者: 蔡文智, 510515, 广东省广州市广州大道北 1838 号, 南方医院消化内科研究所. caiwenzhi2002@hotmail.com
电话: 020-61641535 传真: 020-87280770
收稿日期: 2005-05-17 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 探讨影响肠镜检查肠道准备无效率的因素.

方法: 对年龄、心理状态、病情、饮食方式、用药方法、口服总液量、肠道准备药物和肠镜检查次数等因素进行不同水平的分组, 然后以肠道准备无效率为评价指标.

结果: 肠道准备无效率与心理状态、用药方法、口服总液量因素差异有非常显著意义($P<0.01$), 与年龄、病情、肠镜检查次数因素差异有显著意义($P<0.05$), 而与肠道准备药物、饮食方式因素差异无显著意义($P>0.05$).

结论: 肠道准备无效率受心理状态、用药方法、口服总液量、年龄、病情和肠镜检查次数因素影响.

蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊. 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1785-1787
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1785.asp

0 引言

肠镜检查是诊断肠道疾病常用的方法之一. 而肠镜检查前肠道清洁度是大肠镜检查防止漏、误诊和提高诊断阳性率的重要前提, 如果肠道准备不良将会使粪便遮蔽病变和污染镜面, 影响肠镜检查质量[1-2]. 研究影响肠道准备无效的因素为临床干预提供依据, 对提高准备有效率有积极的临床意义. 为此, 本研究对356例接受肠镜检查者进行肠道准备无效调查和多因素分析.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-07/2005-04 在我院接受肠镜检查者356例, 其中男241例, 女115例, 年龄7-89岁, 平均44.2岁. 患者伴有不同程度的腹胀、腹泻、腹痛、呕血或柏油样便和排便不规律或困难等消化道症状, 部分患者可扪及腹部包块, 出现食欲下降、乏力和体重下降.

1.2 方法

1.2.1 分组 对入选的356例患者预约肠镜检查并签发检查通知书, 告知患者肠道准备的具体方法. 检查前由专职护士对年龄(分为<15岁、16-55岁、>55岁3个年龄段)、心理状态(分为过度紧张、无所谓、平静心理状态)、病情(肠道占位性病变、慢性便秘、无异常)、饮食方式(禁食、流质、普食)、用药方法(以50 mL/min速度服用为常规组, <25 mL/min为服药速度过慢组, >200 mL/min为服药速度过快组)、口服总液量(分为>1 000、1 000-2 000、2 000 mL以上3个水平)、肠道准备药物(服用甘露醇粉、恒康正清、和爽3种药物)、肠镜检查次数(分为1次和1次以上)进行询问并记录.

1.2.2 评价标准 结肠镜检查由操作熟练、对患者分组不知情的内窥镜医师进行. 记录插镜深度和结肠镜检查诊断, 按分级标准对肠道清洁度进行评级并记录, 用奥林巴斯及富士能电子肠镜进行检查. 结果判断[3]: 根据镜检所见分为以下几个等级: (1)好: 镜检时几乎无粪水; (2)良好: 镜检时仅有少量粪水; (3)尚可: 有部分粪水, 通过改变体位可顺利插镜; (4)差: 不能顺利进镜. 所有结果均由肠镜检查操作者盲法判断和记录. 其中好、良好和尚可为有效, 差为无效.

统计学处理 采用SPSS 12.0统计软件进行统计学分析, $P<0.01$ 为有统计学意义.

2 结果

肠道准备无效率与心理状态、用药方法、口服总液量因素差异有非常显著意义($P<0.01$), 与年龄、病情、肠镜检查次数因素差异有显著意义($P<0.05$), 而与肠道准备药物、饮食方式因素差异无显著意义($P>0.05$). 影响肠道准备无效率因素年龄<15岁明显高于16-55岁和>55岁; 无所谓心理状态高于紧张和平静状态; 肠道占位性病变明显高于慢性便秘和无异常; 服用速度过快明显高于服用速度过慢和常规方法; 口服液量<1 000 mL明显高于>2 000 mL和1 000-2 000 mL和2 000 mL以上肠镜检查第1次明显高于2次以上; 而与肠道准备药物、饮食因素无统计学意义.

3 讨论

肠道的清洁直接决定肠镜检查的成败. 肠镜检查对肠道准备要求也越来越高, 而传统的肠道准备既费时又麻烦. 目前口服药进行肠道准备的方法已取得了较大进展, 但受到诸多因素制约. 本研究结果显示清洁的肠道不仅取决于口服清泻液量的多少和口服药物的方法, 而且与心理状态、年龄、肠镜检查次数有关. 患者对接受肠镜检查有不同程度的焦虑, 可使大脑皮层过度兴奋, 影响患者的休息、重要器官的功能, 并降低机体检查的耐受力[4].

表1 不同因素对肠镜检查中肠道准备无效的比较

影响因素		有效(*n*)	无效(*n*)	无效率(%)	χ^2值	*P*值
年龄	<15岁	15	3	16.67	7.806	0.020
	16–55岁	225	7	3.02		
	>55岁	101	5	4.72		
心理状态	过度紧张	91	7	7.69	11.793	0.003
	无所谓	19	2	10.53		
	平静	231	6	0.42		
病情	肠道占位性病变	13	3	18.75	8.848	0.012
	慢性便秘	76	10	11.63		
	无异常	252	2	0.79		
饮食方式	禁食	25	1	3.85	0.561	0.775
	半流质	77	3	3.75		
	普食	180	11	5.76		
用药方法	服用速度过快	62	10	13.89	19.595	0.000
	服用速度过慢	101	4	3.81		
	常规方法	152	1	0.65		
口服总液量	>1 000 mL	28	10	26.32	47.310	0.000
	1 000 –2 000 mL	99	3	2.94		
	2 000 mL以上	189	2	1.05		
肠道准备药物	甘露醇粉	257	14	4.67	1.569	0.456
	恒康正清	19	0	0.00		
	和爽	40	1	2.50		
肠镜检查次数	第1次	219	14	6.39	5.384	0.020
	2次以上	122	1	1.06		

另外，存在无所谓心理的患者，不愿意与医护人员沟通，不认真听取检查前的宣教，也是患者肠道准备无效的原因之一. 由表1可见失效率无所谓心理占10.53%，精神紧张占7.69%;年龄小者合作性差;有肠镜检查经验者肠道准备失败率较低. 所以，护士要热情主动关心患者，讲解有关检查知识，耐心回答患者提出的问题，介绍肠镜检查目的、方法、过程，使其有充分的思想准备. 对年纪小者要加强督促. 其次，要求服用速度为50 mL/min，不宜过快或过慢. 当服用速度过快时，短时间内胃突然扩张，胃内压力增高，反射性地引起恶心、呕吐. 当服用速度过慢时，液体被小肠吸收，刺激肠壁的蠕动减弱，达不到清洁肠道的目的. 再者，通过从病史采集中所获得的患者信息，有针对性地采取不同的心理疏导使患者首先从心理上认同并取得主动配合，提高患者克服检查时和大剂量口服药液所带来的不适，使之能达到预期的目标.

目前国内、外结肠镜检查最常用的肠道准备方法主要是通过短时间大量饮入电解质溶液，超过肠道的吸收能力，达到稀释粪便、机械“冲洗”肠腔的目的，其效果肯定而安全，无需限制饮食，但对便秘患者效果不佳[1, 5]. 慢性便秘患者的肠道准备无效率为11.63%，而肠道占位性病变为18.75%. 有研究[6]认为联合使用西沙必利，通过选择性增加肠肌间神经丛中胆碱能递质释放，增加全消化道平滑肌的推进性动力，从而加速胃肠排空，可与渗透性泻药起协同作用，增强肠道的清洁效果，且可消除单纯口服甘露醇后出现一些恶心、呕吐等消化道症状. 对长期便秘者和体检中可扪及腹部包块，出现食欲下降、乏力、体重下降，年老体弱的患者，可用肠道深部灌洗肠道水疗仪[7]，分段灌洗配合按摩手法调节肠蠕动，使清水充分快速软化结肠沉积物，从而达到全结肠清洁的目的.

总之，首选制定肠镜检查肠道准备简易评估表和流程表，筛选高危因素，针对性干预，同时注意在执行这项操作过程中的规范性和标准性的把握，随时观察患者的全身情况和胃肠道反应，及时查看患者的排出物性质，一旦发现不能达标，在患者能配合的情况下进行灌肠，直至取得满意的效果.

4 参考文献

1 Zhou PH, Yao LQ, Zhong YS, He GJ, Xu MD, Qin XY. Role of endoscopic miniprobe ultrasonography in diagnosis of submucosal tumor of large intestine. *World J Gastroenterol* 2004;10:2444-2446

2 Brown AR, DiPalma JA. Bowel preparation for gastrointestinal procedures. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:395-401

3 季代金, 冯福才, 郭敬宪, 余宁, 周殿元. 大肠镜检查前口服比沙可定清洁肠道的研究. 中华消化内镜杂志 1999;16:56

4 Kim LS, Koch J, Yee J, Halvorsen R, Cello JP, Rockey DC. Comparison of patients' experiences during imaging tests of the colon. *Gastrointest Endosc* 2001;54:67-74
5 El Sayed AM, Kanafani ZA, Mourad FH, Soweid AM, Barada KA, Adorian CS, Nasreddine WA, Sharara AI. A randomized single-blind trial of whole versus split-dose polyethylene glycol-electrolyte solution for colonoscopy preparation. *Gastrointest Endosc* 2003;58:36-40
6 张秋生, 吴子刚, 彭侠彪, 崔惠敏, 容恩妮, 全华斌. 西沙必利在肠镜检查肠道准备中的作用. 中国内镜杂志 2002;7:28-31
7 郑婵美, 欧阳庆宜, 曾月金. 结肠深部灌洗用于结肠镜检查前肠道准备的效果观察. 大肠肛门病外科杂志 2003;9:52-53

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

中国人与非洲黑人*H pylori*相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析

廖常奎, Geojanna GA

廖常奎, 四川省妇幼保健院, 妇女儿童医院内科 四川省成都市 610031
GA Geojanna, All Nigeria Foundation Diagnostic Centre. Kaduna, Nigeria, West Africa
通讯作者: 廖常奎, 610031, 四川省成都市金牛区抚琴西路338号, 四川省妇幼保健院, 妇女儿童医院内科. ckliao2004@126.com
电话: 028-87738249 传真: 028-87735539
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 研究比较中国人与非洲黑人*H pylori*感染及相关胃十二指肠发病情况的差异，提高对防治*H pylori*相关胃十二指肠疾病发生、发展的认识.

方法: 对有上消化道基本症状的两组患者(中国人组$n = 365$，黑人组$n = 148$)进行胃镜检查、*H pylori*检测，通过对不同的*H pylori*感染率及胃镜下球部溃疡(DU)、胃溃疡(GU)、复合溃疡(CU)、胃黏膜浅表糜烂(ES)、十二指肠炎(DI)、胃黏膜隆起性病变(SCL)、胃癌(GC)等病变的发生情况进行对照比较，分析两组患者*H pylori*相关性胃十二指肠疾病发生情况的差异.

结果: 黑人组的*H pylori*感染率、相关胃十二指肠疾病发生率及病灶中的*H pylori*检出率明显增高，有高度显著性差异($\chi_1^2 = 16.73$，$\chi_2^2 = 16.95$，$P<0.01$)，其病变程度也较重.

结论: *H pylori*感染及其相关性胃十二指肠疾病的发病不仅与*H pylori*基因不同有关，更与宿主的种族基因背景、不同的经济状况、社会文化和生活环境、生活方式等因素密切相关.

廖常奎, Geojanna GA. 中国人与非洲黑人*H pylori*相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1787-1789
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1787.asp

0 引言

人类胃黏膜普遍存在对*H pylori*的易感性，不同国家、地区及人种*H pylori*感染相关性病变的发生率、病变程度及临床结局存在着很大的差别.*H pylori*感染与许多胃十二指肠疾病关系密切，影响致病过程的不同因素可导致不一致的结果.有关中国人与非洲黑人*H pylori*感染相关胃十二指肠病变差异性的文献报道较少，本文试在做一些探索性工作以比较研究此类疾病的发生、发展因种族不同而出现的差异性.对此，笔者根据在尼日利亚工作期间收集的资料与国内资料作了对照，整理如下.

1 材料和方法

1.1 材料 收集胃镜检查中国患者365例，男213例，平均年龄(51.5±12.5)岁(20-70岁)；女139例，平均年龄(48.9±15.0)岁(18-78岁)，病程2-12 a.西非尼日利亚黑人患者148例，男110例，平均年龄(33.6±18.3)岁(19-77岁)；女38例，平均年龄(41.8±13.6)岁(25-70岁)，病程6 mo-18 a.基本症状：(1)胃酸相关性症状：饥饿疼痛、夜间疼痛、反酸嗳气；(2)胃窦潴留型症状：上腹部不适，胃区饱胀、嗳气、膈逆；(3)胆道型症状：剑下、右上腹痛，伴饭后向背部牵涉；(4)混合型症状：以上症状的混合表现；伴随症状可有便血、贫血、消瘦、乏力和发热等.

1.2 方法 胃镜检查：均使用日产Olympus GIFXQ240电子纤维胃镜，中国人组均由消化专业医生(四川省科学城医院)按同一方法、标准检查，黑人组由笔者按相同方法、标准操作检查.胃镜的共同表现有球部溃疡(DU)、胃溃疡(GU)、复合溃疡(CU)、胃黏膜浅表糜烂(ES)、十二指肠炎(DI)、胃黏膜隆起性病变(SCL)、胃癌(GC)等病变，黑人组还有幽门管溃疡病变.溃疡面积>2.0 cm者视为巨大溃疡，病变有出血、梗阻者视为并发症.GC诊断：中国人组GC确诊依靠病理检查；黑人组因当地病理检查不便诊

4 Kim LS, Koch J, Yee J, Halvorsen R, Cello JP, Rockey DC. Comparison of patients' experiences during imaging tests of the colon. *Gastrointest Endosc* 2001;54:67-74
5 El Sayed AM, Kanafani ZA, Mourad FH, Soweid AM, Barada KA, Adorian CS, Nasreddine WA, Sharara AI. A randomized single-blind trial of whole versus split-dose polyethylene glycol-electrolyte solution for colonoscopy preparation. *Gastrointest Endosc* 2003;58:36-40
6 张秋生, 吴子刚, 彭侠彪, 崔惠敏, 容恩妮, 全华斌. 西沙必利在肠镜检查肠道准备中的作用. 中国内镜杂志 2002;7:28-31
7 郑婵美, 欧阳庆宜, 曾月金. 结肠深部灌洗用于结肠镜检查前肠道准备的效果观察. 大肠肛门病外科杂志 2003;9:52-53

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

中国人与非洲黑人*H pylori*相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析

廖常奎, Geojanna GA

廖常奎, 四川省妇幼保健院, 妇女儿童医院内科 四川省成都市 610031
GA Geojanna, All Nigeria Foundation Diagnostic Centre. Kaduna, Nigeria, West Africa
通讯作者: 廖常奎, 610031, 四川省成都市金牛区抚琴西路338号, 四川省妇幼保健院, 妇女儿童医院内科. ckliao2004@126.com
电话: 028-87738249 传真: 028-87735539
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 研究比较中国人与非洲黑人*H pylori*感染及相关胃十二指肠发病情况的差异，提高对防治*H pylori*相关胃十二指肠疾病发生、发展的认识.

方法: 对有上消化道基本症状的两组患者(中国人组$n = 365$，黑人组$n = 148$)进行胃镜检查、*H pylori*检测，通过对不同的*H pylori*感染率及胃镜下球部溃疡(DU)、胃溃疡(GU)、复合溃疡(CU)、胃黏膜浅表糜烂(ES)、十二指肠炎(DI)、胃黏膜隆起性病变(SCL)、胃癌(GC)等病变的发生情况进行对照比较，分析两组患者*H pylori*相关性胃十二指肠疾病发生情况的差异.

结果: 黑人组的*H pylori*感染率、相关胃十二指肠疾病发生率及病灶中的*H pylori*检出率明显增高，有高度显著性差异($\chi_1^2 = 16.73$，$\chi_2^2 = 16.95$，$P<0.01$)，其病变程度也较重.

结论: *H pylori*感染及其相关性胃十二指肠疾病的发病不仅与*H pylori*基因不同有关，更与宿主的种族基因背景、不同的经济状况、社会文化和生活环境、生活方式等因素密切相关.

廖常奎, Geojanna GA. 中国人与非洲黑人*H pylori*相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1787-1789
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1787.asp

0 引言

人类胃黏膜普遍存在对*H pylori*的易感性，不同国家、地区及人种*H pylori*感染相关性病变的发生率、病变程度及临床结局存在着很大的差别.*H pylori*感染与许多胃十二指肠疾病关系密切，影响致病过程的不同因素可导致不一致的结果.有关中国人与非洲黑人*H pylori*感染相关胃十二指肠病变差异性的文献报道较少，本文试在做一些探索性工作以比较研究此类疾病的发生、发展因种族不同而出现的差异性.对此，笔者根据在尼日利亚工作期间收集的资料与国内资料作了对照，整理如下.

1 材料和方法

1.1 材料 收集胃镜检查中国患者365例，男213例，平均年龄(51.5±12.5)岁(20-70岁)；女139例，平均年龄(48.9±15.0)岁(18-78岁)，病程2-12 a.西非尼日利亚黑人患者148例，男110例，平均年龄(33.6±18.3)岁(19-77岁)；女38例，平均年龄(41.8±13.6)岁(25-70岁)，病程6 mo-18 a.基本症状：(1)胃酸相关性症状：饥饿疼痛、夜间疼痛、反酸嗳气；(2)胃窦潴留型症状：上腹部不适，胃区饱胀、嗳气、膈逆；(3)胆道型症状：剑下、右上腹痛，伴饭后向背部牵涉；(4)混合型症状：以上症状的混合表现；伴随症状可有便血、贫血、消瘦、乏力和发热等.

1.2 方法 胃镜检查：均使用日产Olympus GIFXQ240电子纤维胃镜，中国人组均由消化专业医生(四川省科学城医院)按同一方法、标准检查，黑人组由笔者按相同方法、标准操作检查.胃镜的共同表现有球部溃疡(DU)、胃溃疡(GU)、复合溃疡(CU)、胃黏膜浅表糜烂(ES)、十二指肠炎(DI)、胃黏膜隆起性病变(SCL)、胃癌(GC)等病变，黑人组还有幽门管溃疡病变.溃疡面积>2.0 cm者视为巨大溃疡，病变有出血、梗阻者视为并发症.GC诊断：中国人组GC确诊依靠病理检查；黑人组因当地病理检查不便诊

断依靠胃镜肉眼诊断，对病灶有局部黏膜发红、糜烂、出血、粗糙及僵硬感视为GC.*H pylori*检测:按悉尼标准在胃窦部活检取样,采用福建三强生化有限公司生产的*H pylori*诊断试剂盒检测，标本1 min内呈阳性者视为*H pylori*感染.

统计学处理 感染率用百分数(%)表示，以均数±标准差对资料进行描述.组间计数资料比较采用χ^2检验，$P<0.05$认为差异有显著性.

2 结果

2.1 *发病年龄及性别差异* 受检者平均年龄男性中国人组大于黑人组17.9岁，女性大于黑人组7.1岁.中国人组消化性溃疡(PU)年龄21-78岁，平均48.6岁，男45例，女12例，男女之比3.75∶1，其中巨大溃疡6例，男5例，女1例，位于胃角和体部小弯;GC年龄52-64岁，平均59岁，男5例，女3例.黑人组PU年龄19-66岁，平均37岁，男 40例，女6例，男女之比6.7∶1，其中巨大溃疡8例，均为男性，位于胃角、体部小弯和幽门管;GC年龄32-50岁，平均42.5岁，男5例，女2例.

2.2 *病程差异* 中国人组PU 2-6 a，平均28 mo;GC 5-12 a，平均6.8 a.黑人组PU 6 mo-5 a，平均18 mo;GC8-18 a，平均12.5 a.

2.3 *各组病种检出率* DU、GU、ES、CU、DI、SCL、GC病例数中国人组各为29，19，12，6，44，22和8例，检出率各占7.9%，5.2%，3.3%，1.6%，12.1%，6.0%，2.2%;其中PU57例，占15.6%;黑人组各为16，18，24，8，32，6和7例，另有幽门管溃疡4例，检出率各占10.8%，12.2%，16.2%，5.4%，21.6%，4.1%，4.7%和2.7%，PU共46例，占31.2%.

2.4 *两组H pylori感染率及相关性胃十二指肠疾病发生率* 两组*H pylori*感染相关性胃十二指肠疾病发生率有显著性差异(χ^2 = 16.73，$P<0.01$)，黑人组明显高于国人组(表1).

表1 中国人与黑人*H pylori*感染率及相关性胃十二指肠疾病发生率(%)

组别	*n*	*H pylori*感染	DU	GU	ES	CU	DI	SCL	GC
国人	365	51.8	7.9	5.2	3.3	1.6	12.1	6.0	2.2
黑人[b]	148	74.3	10.8	12.2	16.2	5.4	16.2	4.1	4.7

[b]$P<0.01$ *vs* 国人组.

2.5 *两组胃镜下胃十二指肠疾病H pylori感染检出率* 两组胃十二指肠疾病*H pylori*感染率有高度显著性差异(χ^2 = 16.95，$P<0.01$)，黑人组明显高于国人组(表2).

2.6 *两组胃镜下发现出血和幽门梗阻的并发症* 中国人组分别为15例和2例，各占4%和0.6%;黑人组为12例和10例，各占8%和6.8%.黑人组的并发症高于国人组，但无统计学意义(χ^2 = 1.61，$P > 0.05$).

表2 中国人与黑人胃镜下胃十二指肠疾病*H pylori*感染检出率(%)

组别	DU	GU	ES	CU	DI	SCL	GC
国人	69.2	72.4	69.5	80.0	78.0	67.5	74.0
黑人[b]	83.3	82.0	85.0	92.0	90.0	94.5	92.5

[b]$P<0.01$ *vs* 国人组.

3 讨论

本文胃镜所检*H pylori*感染率、相关胃十二指肠疾病发病及病灶*H pylori*检出率黑人组均明显高于中国人组($P<0.01$).检出率高的仍然是PU伴随胃十二指肠黏膜活动性炎症，这与在非洲某些人群中*H pylori*感染率很高，PU发生率却很低[1]的报道不一致，而且黑人组巨大溃疡发生率、出血和幽门梗阻等并发症也较高.由此可见两组在*H pylori*感染率、相关胃十二指肠疾病发生、发展及临床结局上存在明显差异.

根据有关资料和笔者的认识可以将影响上述结果差异的相关因素作以下排列和分析:(1)*H pylori*感染率与较低的社会经济水平、人口密集、公共卫生条件差以及水源供应有较密切关系，已经证实人群的生活居住密度高和密切接触可增加*H pylori*感染机会，使*H pylori*感染呈明显的家庭聚集现象[2].尼日利亚黑人的生活环境和生活方式包括人口居住密度较高、生活条件较差及文化、饮食习惯等因素显然可造成*H pylori*感染率增加.(2)*H pylori*菌株的毒力存在着地理分布上的差异，这种差异可以导致不同的临床结局.有学者[3-4]报道*H pylori* vacA的基因型在我国广州、日本、中美、南美等国和北美有不同亚型，我国*H pylori* vacA和cagA的基因结构与欧美菌株相比也存在着差异[5];van Doorn *et al*[6]认为*H pylori* vacA基因型的分布可能反映某些国家或地区在文化、社会经济上的渊源，即历史上某一地区的人群向另一地区的迁途可使这两个地区存在相似的*H pylori* vacA基因亚型.非洲大陆是人类最早祖先的诞生地之一，以后的地理和社会历史变迁是否造成*H pylori*基因的同源及以后的差异目前还无论证，但本文资料至少可以说明中国人与黑人在*H pylori*相关胃十二指肠疾病发病学起源上有相似之处.(3)感染者种族和基因背景不同也与发病有关.Azuma *et al*[7]认为人类白细胞抗原(HLA)类型与*H pylori*感染结局有关，HLA-DQA1者不易发生萎缩性胃炎和胃癌;*H pylori*感染引起低酸的人多带IL-1B-31T或IL-1RN*2等位基因(38%)[8]，高酸分泌的人尚不清楚由何种基因决定，有报道肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor TNF)及淋巴毒素α(lymphotoxin-alpha LTα)的多态性与发展成GU或DU有关[9].(4)社会文化、生活环境、饮食习惯和卫生条件也有较大影响.尼日利亚黑人多信奉伊斯兰教，食物较粗糙，木薯和生食较多，动物蛋白较少，斋月中白天不进食，*H pylori*感染后容易发生相关性上胃肠道病变，

癌变率也明显增加.Wang [10]对多种模型组胃癌患者的调查结果表明，发生胃癌的危险因素与高发区长期的低质量生活水平、低动物蛋白饮食、高甜薯和罐装鱼餐、每餐进食过多及精神创伤等因素有关.(5)感染*H pylori*时的年龄可能与临床结局有关，即成年后感染者发生DU危险性增加，儿童期感染发生萎缩性胃炎、GU和GC的危险性增加[11].本资料显示黑人组感染*H pylori*的年龄较早，并且PU平均年龄较国人组小11.6岁，平均病程短10 mo;GC平均年龄较国人组小16.5岁，平均病程短5.7 a,这一情况符合该推论.(6)巨大溃疡的产生与年龄、伴随疾病、胃黏膜血循环、营养状况及常服非甾体抗炎药(NASIDs)等因素有关，本资料黑人组受这些因素影响较小，为何发生率多于中国人组原因尚不明确.

我们工作中还发现，黑人在发病初期上消化道症状一般较轻，可能与食物成分中木薯较多，pH值偏碱性有关，造成发病后尤其酸相关性症状不明显.多数患者因为有出血、幽门梗阻等并发症才就诊，胃镜检查时病灶已经较重;此外，因经济和就医条件等原因受检时间一般也较晚，这些因素也可能导致本文出现的黑人较中国人*H pylori*相关性胃十二指肠疾病发生率明显增高.再者，非洲男性地位高，就诊率多于女性，可能是男性发病率高于女性的原因之一.

由于黑人的受检率和受检面有限，本文资料不能全面反映尼日利亚黑人*H pylori*相关性胃十二指肠疾病的发病率和病变情况，因而在一定程度上存在着局限性，但影响两个种族发病、病变过程和不同临床结局的有关因素肯定是有所差别的.

因此，除去*H pylori*菌株毒力不同的因素外，宿主包括自身的免疫反应和社会文化背景、生活环境和生活方式等原因也起到相当重要的作用，这与非*H pylori*因素即宿主遗传因素及经济水平、文化差异在*H pylori*感染后的反应差别可导致多样性临床结局的事实一致.可见，分析研究中国人与非洲黑人这些*H pylori*相关性胃十二指肠疾病发病情况的差异，对于*H pylori*感染相关胃十二指肠疾病发生、发展及预后的判断认识，加强对此类疾病的临床防治有重要意义.

4 参考文献

1 张德中, 李小波, 陈紫暄. 消化性溃疡的内科治疗进展. 萧树东. 胃肠病学和肝病学－基础理论与临床进展. 第1版. 上海: 世界图书出版公司, 2004:399-406

2 Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sherman PM. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 1990;322:359-363

3 徐肇敏, 李运红, 史伟. 幽门螺杆菌感染治疗的现状与展望. 临床内科杂志 2003;20:66-68

4 何瑶, 胡品津, 何兴祥, 曾志荣, 崔毅, 李初俊. 幽门螺杆菌cag A、vac A 基因的调查及其临床意义. 中华内科杂志 2000;39:818-820

5 纪徐淮, Burroni D, 许国铭, Pagliaccia C, Reyrat JM, 屠振兴, 丁华, 杜奕奇, Rappuoli R, Telford JL. 中国幽门螺杆菌vacA基因的等位变异. 中华消化杂志 2000;20:151-154

6 Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, Carneiro F, Vanderborght B, Pegado MD, Sanna R, De Boer W, Schneeberger PM, Correa P, Ng EK, Atherton J, Blaser MJ, Quint WG. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999;116:823-830

7 Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998;82:1013-1018

8 El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398-402

9 Lanas A, Garcia-Gonzalez MA, Santolaria S, Crusius JB, Serrano MT, Benito R, Pena AS. TNF and LTA gene polymorphisms reveal different risk in gastric and duodenal ulcer patients. *Genes Immun* 2001;2:415-421

10 Wang R. The epidemiological study of subtype risk factors of gastric cancer. *Zhonghua Liuxing Bingxue Zazhi* 1993;14:295-299

11 萧树东, 刘文忠. 重视对幽门螺杆菌感染临床结局多样性的认识. 中华内科杂志 1999;38:437-438

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

广东中西医结合、中医消化病学术会议

本刊讯 广东中西医结合、中医消化病学术会议定于2005-11在广州召开，现将征稿通知公布如下：

1 稿件要求及截稿日期

全文、结构式摘要（800字左右）各一份，电脑打印（附软盘），2005-09-30截稿.

2 联系方式

广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化科 智发朝 教授，电话：020-65641531.

·临床经验·

大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究

张思奋,罗湛滨,吴文江,何 晶,范小华

张思奋,罗湛滨,吴文江,何晶,范小华,广州中医药大学第二临床医学院肛肠中心 广东省广州市 510120
通讯作者:张思奋,510120,广东省广州市大德路111号,广州中医药大学第二临床医学院肛肠中心. nzhangsf@163.com
电话:020-88187233-33729
收稿日期:2005-05-23 接受日期:2005-06-13

摘要

目的:观察时辰化疗联合中医时间医学治疗对减轻大肠癌术后化疗副反应的疗效.

方法:将30例大肠癌术后患者随机分成治疗组(时辰化疗+中医择时用药)和对照组(常规化疗+中医非择时用药),每组各15例,观察其毒副反应.

结果:治疗组的化疗毒副反应比对照组明显减少,差异有显著性($P<0.05$).

结论:时辰化疗加中医时间医学治疗可减少大肠癌术后化疗的副反应.

张思奋,罗湛滨,吴文江,何晶,范小华.大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究.世界华人消化杂志 2005;13(14):1790-1791
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1790.asp

0 引言

随着生物调节基因的发现,近年来时辰化疗成了研究热点;而中医时间医学也有悠久的历史,为探讨二者结合的疗效,我们于2003-04/2005-03对30例肠癌根治切除术后的患者应用时辰化疗的同时联合中药择时服药治疗,现将结果报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-04/2005-03我院肛肠中心大肠癌根治切除术后患者30例,男17例,女13例;年龄22-78岁,平均年龄51.2岁.结肠癌根治切除术后9例,直肠癌根治切除术后21例;病理分期中分化腺癌25例,高分化腺癌2例,低分化腺癌3例;Dukes分期B期7例,C期21例,D期2例.体力情况:Karnofsky评分均≥60分.所有患者均符合中医脾胃虚弱型.上述患者随机分为二组,时辰化疗+中医择时用药组(A组)15例,常规化疗+中医非择时用药组(B组)15例,二组患者临床资料比较见表1.

1.2 方法 常规化疗组:CF 200 mg/m^2,静脉点滴,第1-5 d;5-FU 400 mg/m^2,静脉点滴,第1-5 d;艾恒(奥沙利铂)130 mg/m^2,静脉点滴,第1 d.用药时间安排在正常上班时间(8:00-17:00).时辰化疗组:CF 200 mg/m^2,静脉点滴,22:00-24:00,第1-5 d;5-FU 400 mg/m^2,静脉点滴,24:00-10:00,其中75%的剂量在03:00-05:00内滴入,第1-5 d;艾恒(奥沙利铂)20 mg/m^2,静脉点滴,10:00-22:00,其中75%的剂量于15:00-17:00内滴入,第1-5 d.二组均给自拟益气健脾止呕方(党参15 g、白术15 g、云苓15 g、法夏12 g、陈皮12 g、广木香15 g、鱼古30 g、救必应15 g、枳实15 g、甘草6 g)每天一剂口服,但时辰化疗组中药服药时间固定在每天10:00.所有患者均未用止呕药物治疗.二组均为每3 wk重复为一周期,完成二周期以上者作评价病例,治疗前后详细记录临床症状及不良反应,并进行血常规、肝、肾功能、心电图、X线、B超等检查.毒副作用按WHO抗癌药物毒性反应标准判定,分0-IV级.

统计学处理 采用χ^2检验,$P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

时辰化疗组感觉神经异常、腹泻、恶心呕吐的发生率分别为33.3%、6.6%和20.0%,与常规化疗组的53.3%、20.0%和53.3%比较,有显著性差异($P<0.05$).二组化疗近期毒副反应详细比较见表2.

3 讨论

大肠癌是我国常见病和多发病,大肠癌的治疗目前依然首选手术治疗,并配合放疗、化疗、免疫、中医药等综合治疗.试图通过手术大幅提高肠癌疗效已很困难,所

表1 二组患者临床资料比较

临床资料	A组	B组
性别		
男	9	8
女	6	7
平均年龄(岁)	50.3	51.1
病理类型		
低分化腺癌	2	1
中分化腺癌	12	13
高分化腺癌	1	1
Dukes分期		
B期	3	4
C期	11	10
D期	1	1

表2 二组患者化疗近期毒副反应发生率(%)

毒副反应	时辰化疗组 +中医择时用药	常规化疗组 +中医非择时用药	P值
感觉神经异常	33.3(5/15)	53.3(8/15)	<0.05
白细胞下降	13.3(2/15)	40.0(6/15)	>0.05
恶心、呕吐	20.0(3/15)	53.3(8/15)	>0.05
腹泻	6.6(1/15)	20.0(3/15)	<0.05
口腔溃疡	26.7(4/15)	46.7(7/15)	<0.05

以综合治疗尤显重要.化疗是提高疗效的有效方法,研究证实含L-OHP、CF、5-FU的FORFOX各种化疗方案，对大肠癌患者有肯定疗效，已成为结直肠癌化疗的金标准[1].但上述化疗方案带来的各种毒副反应却严重制约了化疗的顺利实施，并影响到化疗的疗效，时辰化疗是减少上述副反应的一种有效方法.

哺乳动物由9个特异基因(per1，per2，per3，cry1，cry2，tim，clock，bmal1和ckI)相互作用以调节细胞的昼夜活动.细胞周期的昼夜波动反过来又调节其他基因的转录和转录后程序,从而形成细胞生物学24 h的周期变化,即“昼夜节律”.细胞的昼夜节律调节着抗癌药物的代谢动力学,使抗癌药物随给药时间的不同而使不良反应及抗癌活性产生差异.可以在提高药物疗效的同时减少药物的毒性,即“时辰化疗”[2].5-FU及铂类药物是时辰化疗研究最多的药物，研究结果显示，5-FU时辰化疗的最佳时间是22:00-10:00连续12 h用药，给药高峰在04:00;5-FU的代谢限速酶即二氧嘧啶脱氢酶(DPD)活性的昼夜规律起决定作用，其昼夜差达40%以上[3].铂类药的昼夜节律则与还原型谷胱甘肽(GSH)的昼夜节律有关，同一个体的GSH的昼夜分泌有1-5倍的差异，高峰期常在下午，其最佳给药时间为10:00-22:00连续12 h用药.我们遵循上述规律给药，结果显示时辰化疗副反应少于常规化疗.

恶性肿瘤在化疗后易损伤人体正气,使机体免疫功能下降,我们通过临床研究总结出大肠癌术后化疗以脾胃虚弱型最多,所以我们用自拟的益气健脾止呕方来治疗脾胃虚弱型患者的化疗副反应.脾胃虚弱型的病理基础是化疗药损伤脾胃，使脾失健运、胃失和降、胃气上逆而引起恶心呕吐,治疗应以调理脾胃为主.另一方面,中医时间医学有几千年的历史,中医时辰用药可根据药物的性质、方剂的类型和子午流注纳支法等来择时用药.子午流注纳支法认为在某经脉处于功能活动的“旺时”,是其驱除本脏腑外邪最有利及最有效之时，此时服药最有效[4]，所以我们选择10:00时脾经“旺时”为服药时间以补其脾胃不足.

本研究结果显示:时辰化疗联合益气健脾止呕中药择时服药，可起到优势互补的作用，相比于常规化疗，能明显减少其化疗毒副反应,但是否能提高其生存率尚待进一步研究.

4 参考文献

1 Garufi C, Brienza S, Pugliese P, Aschelter AM, Bensmaine, Bertheault-Cvikovic F, Nisstico C, Giunta S, Caterino M, Giannarelli D, Cosimeli M, Levi F, Terzoli E. Overcoming resistance to chronomodulated 5-fluorouracil and folinic acid by the addition of chronomodulated oxaliplatin in advanced Colorectal Cancer patients. *Anticancer Drugs* 2000;11:495-501

2 郭灵, 林焕新, 冼励坚. 恶性肿瘤时辰化疗的基础理论及实践. 中国肿瘤临床 2004;31:56-59

3 Harris BE, Song R, Soong SJ, Diasio RB. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res* 1990; 50:197-201

4 董振咏, 黄慧咏. 中医药物治疗的时间学. 河北医药 2004;26:53

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议

本刊讯 全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议定于2005-10在深圳召开，现将征稿通知公布如下：

1 稿件要求及截稿日期

结构式摘要（800-1000字）一份，电脑打印（附软盘），2005-08-31截稿.

2 联系方式

北京市东城区美术馆后街23号北京市中医研究所 郭培元 收（邮编：100010），电话：010-84023593.

·临床经验·

幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例

阮 鹏,阮浩然

阮鹏,成都医学院 四川省成都市 610081
阮浩然,四一〇医院 四川省广元市 628200
通讯作者:阮鹏,610081,四川省成都市,成都医学院.
jizhe8106@yahoo.com.cn
传真:028-865790253
收稿日期:2005-05-17 接受日期:2005-06-18

摘要

目的:观察幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎的疗效.

方法:将106例患者随机分为幽默疗法治疗组和对照治疗组各53例,均使用胃康宁治疗(每次四粒,一日三次),1 wk为一疗程,共十二个疗程.对照组不使用幽默疗法,两组皆运用胃镜和活检评定疗效.

结果:幽默疗法明显改善了患者的心理症状,患者在躯体化、抑郁、焦虑、精神病性四个项目上与治疗前具有显著差异(t = 4.57,P = 0.007<0.01),强迫症状与治疗前比有显著差异(t = 3.24,P = 0.02<0.05).幽默疗法结合中医治疗结果显示:治疗组病理有效率为56.60%,总有效率为83.02%,治疗前后差异显著(t = 3.15,P = 0.02<0.05);对照组病理总有效率为35.85%,总有效率为69.81%,治疗前后具有显著性差异(t = 2.98,P = 0.03<0.05);组间比较,总有效率和痊愈率具有统计学意义(t = 3.06,P = 0.03<0.05).

结论:幽默疗法可有效改善患者心理症状与胃肠功能,促进病理症状的改善,从而提高药物疗效.

阮鹏,阮浩然.幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例.世界华人消化杂志 2005;13(14):1792-1794
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1792.asp

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis,CAG)是临床消化系统常见、难治疾病之一,是胃黏膜的一种慢性炎症性病变,以淋巴细胞和浆细胞浸润为主,更以黏膜固有腺体萎缩和肠上皮化生为特征,其临床表现与一般性胃炎大致相同,一般可见上腹部饱胀不适或胃脘轻微隐痛,食欲减退或恶心,嗳气,口苦口干,少酸或无酸,部分患者可有脘痛连胁,夜寐不佳,形体消瘦等.1978年世界卫生组织将慢性萎缩性胃炎列为胃癌的癌前疾病或癌前状态之一.CAG在我国发病率约为7.5%,而胃癌在癌症发病率与死亡率中均列第一位,所以积极治疗相当重要.新近研究[1-2]表明胃肠疾病患者容易出现明显的心理症状,如抑郁、焦虑、强迫、神经病性等,我们的调查也证明了这点.治疗上,一般认为该病西医疗效并不理想,而临床实践[3-5]表明中医具有独特的疗效和广阔的前景.针对上述情况,我们运用幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎,取得令人满意的效果,现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 CAG患者共106例,随机分为幽默疗法组(A组)与对照治疗组(B组),各53例.A组男34例,女19例;平均年龄52.3±13.4;病程0.6-18 a,平均8.32±4.85 a.B组男36例,女17例;平均年龄53.3±4.35;病程0.5-19 a,平均6.67±5.54 a.A、B两组性别、年龄、病程等比较均无显著性差异(P>0.05).诊断标准:参照《慢性萎缩性胃炎纤维镜及病理诊断标准和慢性胃炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准》[6].排除标准:(1)经过病理诊断疑似癌变患者;(2)伴随肝、肾、心、脑、血液等严重疾病患者;(3)未按规定服药,未坚持治疗或无法判定疗效的患者.主要观察内容:痞满、胃痛、纳差、嘈杂、舌脉淤阻等项.按照发病的轻、中、重情况,分别作1,2,3分统计(表1).在治疗前7 d内做纤维镜与病理切片诊断.腺体萎缩、肠上皮化生和异常增生低于1/3者为轻度,1/3-2/3为中度,2/3以上为重度,分别作1,2,3分统计(表2).心理症状诊断标准:采用症状自评量表(SCL-90问卷),该量表内容涉及感觉、情绪、思维、意识、行为、生活习惯、睡眠等,被公认为具有容量大、反映症状丰富、能准确刻画自觉症状等优点.量表采用5级计分制:1无,无该项症状问题;2轻度,自觉有该症状,但发生不频繁、不严重;3中度,自觉有该项症状,其程度为轻度到中度;4相当严重,自觉常有该项症状,其程度为中度到严重;5严重,自觉常有该项症状,频繁出现,程度也十分严重.两组治疗前主要心理症状得分无

表1 两组治疗前主要症状分布

	n	痞满			胃痛			纳差			嘈杂			舌脉淤阻		
		轻	中	重	轻	中	重	轻	中	重	轻	中	重	轻	中	重
A组	53	17	24	6	11	21	5	13	20	7	14	25	6	6	10	2
B组	53	14	27	5	13	18	5	7	22	8	12	21	5	9	11	2

表2 两组治疗前胃镜与病理活检情况

	n	萎缩			肠化			异常增生		
		轻	中	重	轻	中	重	轻	中	重
A组	53	29	19	5	23	18	3	9	11	2
B组	53	26	21	6	21	20	2	9	9	2

显著差异，$P>0.05$.

1.2 方法 A、B两组皆用胃康宁(黑龙江葵花药业股份有限公司生产)治疗，每日三次，每次4粒，1 wk为一疗程，共十二个疗程.治疗期间不再使用其他药物，并注意避免感冒等其他疾病.其中A组同时使用幽默疗法以辅助治疗，方法是每日上午、下午和晚间各组织观看幽默影片一部，提供幽默与笑话类期刊，同时要求医护人员积极采用“微笑服务”.B组为对照组，不使用幽默疗法，也嘱其尽量避免幽默信息刺激.

统计学处理 采用SPSS 11.0软件进行统计学分析，$P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

2.1 症状疗效评定 治疗痊愈:主要症状消失或基本消失，总积分减少80%以上;显效:主要症状明显改善，总积分减少61-81%;有效:主要症状有所改善，总积分减少30-60%;无效:症状无明显改善或症状加重的(表3).

表3 两组临床症状积分改善情况比较(mean ± SD)

	A组			B组		
	n	治疗前	治疗后	n	治疗前	治疗后
痞满	47	1.86±0.55	0.21±0.43[b]	46	1.95±0.64	0.63±0.57[a]
胃痛	37	1.94±0.47	0.25±0.50[b]	36	1.85±0.53	0.44±0.46[a]
纳差	40	1.86±0.52	0.34±0.46[b]	37	1.83±0.45	0.75±0.64[a]
嘈杂	45	1.83±0.44	0.25±0.52[b]	38	1.84±0.57	0.82±0.64[a]
舌脉淤阻	18	1.81±0.57	0.19±0.51[b]	22	1.67±0.53	0.76±0.54[a]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs*治疗前.

2.2 胃镜与病理活检疗效评定 在治疗后1 wk内以胃镜与病理切片活检复查证实.近期痊愈:腺体萎缩、肠上皮化生和异常增生恢复正常或基本消失，总积分减少90%以上;显效:总积分减少60%以上;有效:总积分减少30%以上;无效:未达到有效标准或症状加重者(表4).

表4 治疗前两组胃镜与病理活检积分比较(mean ± SD)

	n	A组		n	B组	
		治疗前	治疗后		治疗前	治疗后
萎缩	53	1.54±0.60	0.23±0.56[b]	53	1.55±0.49	0.88±0.65[a]
肠化	44	1.61±0.57	0.35±0.61[b]	43	1.51±0.62	0.94±0.79[a]
异常增生	22	1.69±0.63	0.40±0.53[b]	20	1.66±0.58	1.12±0.76

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs*治疗前.

2.3 心理症状诊断 治疗前A、B两组在躯体化、强迫症状、抑郁、焦虑、精神病性表现均为阳性.治疗后A组呈阳性的因子均转阴($P<0.05$或$P<0.01$)，而对照组B组仅在躯体化上具有明显改善，$P<0.05$(表5).

2.4 总疗效比较见表6.

表5 两组治疗前后心理症状比较(mean ± SD)

因子项目	A组		B组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
躯体化	1.77±0.32	1.37±0.34[b]	1.74±0.35	1.56±0.35[a]
强迫症状	1.85±0.53	1.64±0.55[a]	1.89±0.63	1.79±0.47
人际敏感	1.63±0.49	1.63±0.42	1.64±0.61	1.65±0.54
抑郁	2.11±0.43	1.56±0.34[b]	1.99±0.44	1.84±0.43
焦虑	1.90±0.44	1.48±0.46[b]	1.93±0.48	1.76±0.57
敌对	1.62±0.42	1.57±0.46	1.52±0.49	1.50±0.41
恐怖	1.63±0.42	1.34±0.43	1.34±0.43	1.33±0.39
偏执	1.51±0.55	1.52±.061	1.49±0.57	1.52±0.44
精神病性	1.82±0.37	1.36±0.36[b]	1.82±0.42	1.69±0.51

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs*治疗前.

表6 两组总疗效比较

	n	痊愈	显效	有效	无效	病理有效率	总有效率
A组	53	8[b]	22[a]	14	9[b]	56.60%[a]	83.02%[a]
B组	53	3	16	18	16	35.85%	69.81%

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* B组.

3 讨论

本研究结果表明:幽默疗法治疗慢性萎缩性胃炎患者在同等治疗情况下药物的疗效得到显著提高.使用幽默疗法组心理与病理症状改善明显，提示药物疗效与患者心理健康有密切联系，心理症状的改善降低了对生理的负面影响，从而可使药效明显.

中医认为本病主要由情志郁结、饮食失调、气血失和等所致.有关治疗清代李中梓《症治汇补·痞满》认为:“本病的治疗，初宜舒郁”.现代心身疾病学也认为胃肠疾病可导致明显的心理症状，而心理症状也可引发一系列生理反应，二者可形成生理-心理症状的恶性循环.而肠胃功能性疾病中，神经心理因素往往占有重要地位.精神压力可以影响胃肠动力，降低内脏痛阈值[7]，而精神放松、愉悦可明显改善胃肠功能.故而，治疗慢性萎缩性胃炎应给予患者足够心理治疗考虑.由于此类疾病出现的抑郁症状最为突出，故以幽默疗法为主进行治疗，而不宜使用抗抑郁类抗精神病药物，以免患者厌倦服药产生不良心理，同时也节省了治疗成本，符合患者的经济考虑.焦虑往往与抑郁相伴而生，故抑郁症状改善

的同时焦虑也得到了明显的改善. 中医《内经》认为: "喜"可胜"忧、悲". 故而使患者情绪愉悦可有效对抗病理症状引起的消极情绪. 幽默疗法起源于1950和1960年, 近几年幽默疗法在临床实践中发挥着独特的治疗作用. 新近研究[8-11]认为, 幽默体验、大笑可刺激大脑中枢对脑啡肽的释放, 脑啡肽具有改善情绪、提高免疫力、镇静和镇痛等作用. 这表明幽默疗法可从提高患者自身免疫能力等入手, 促进疾病的康复. 临床研究[12]也表明中药治疗可逆转肠上皮化生, 其主要是通过改善免疫功能, 对胃黏膜起到修复作用从而改善泌酸功能, 调节胃动力, 以达到病理症状的改善. 而幽默疗法促进脑啡肽释放, 提高患者免疫能力, 无疑协同了中药, 加强了胃功能的改善, 进一步促进了病理症状的改善.

4 参考文献

1 高鼎良, 陶家泳, 邵云弟. 盐酸帕罗西汀治疗胃肠疾病433例分析. 中华消化杂志 1999;19:357-358
2 王伟岸, 潘国忠, 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;82:308-311
3 章敏. 中医药对慢性萎缩性胃炎癌前病变的研究进展. 山东中医杂志 1994;13:330-332
4 陈昙庆, 刘国普. 慢性萎缩性胃炎的中医药研究概况. 山东中医杂志 2001;20:506-508
5 孙洁. 中西医结合辨治慢性萎缩性胃炎的思路. 陕西中医 2004;25:815-816
6 中国中西医结合研究会消化系统疾病专业委员会. 慢性胃炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准(试行方案). 中西医结合杂志 1990;10:318-319
7 张海燕, 李延青. 肠易激综合征发病机制的研究进展. 中国综合临床 2004;20:1145-1147
8 王国祥. 幽默疗法探析. 医学与社会 2004;7:19-21
9 钱会南. 论情志因素对体质及发病的影响. 北京中医药大学学报 2004;27:11-13
10 王玉秀, 童昭岗, 胡海青. 内源性阿片肽系统免疫调节功能的研究进展. 中国临床康复 2003;10:1558-1559
11 Bennett HJ. Humor in medicine. *South Med J* 2003;96:1257
12 李荣华, 王士昌, 遇俊清, 丁明发, 董建琪, 冯忠军. 中药胃病灵治疗慢性萎缩性胃炎的研究. 世界华人消化杂志 1998;6:951-954

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义

谭永港, 刘 俊, 丁世华, 刘新民

谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民, 深圳市第二人民医院消化内科
广东省深圳市 518035
通讯作者: 谭永港, 518035, 广东省深圳市笋岗西路3002号, 深圳市第二人民医院.
电话: 0755-83808552 传真: 0755-83228956

收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

摘要

目的: 探讨血清白介素(IL)-10、IL-18在肝炎肝硬化发病机制中的作用.

方法: 肝炎肝硬化患者62例, 根据child-pugh分级法分A、B、C级三组, 采用ELISA法检测血清IL-10、IL-18水平, 对照组(NC)为20名健康献血员.

结果: 血清IL-18含量由高到低依次为child-C级、B级、A级、NC组, 方差分析有显著差异($P<0.01$), 各组间两两比较均有统计学意义($P<0.05$).IL-10含量child-A级组略高于NC组, 无统计学意义($P>0.05$), B、C组均低于NC组, 两两比较均有统计学意义($P<0.05$), B级与C级组比较有统计学意义($P<0.01$).血清IL-18含量由高到低依次为有腹水组、无腹水组、NC组, 方差分析有显著差异($P<0.01$), 各组间两两比较有统计学意义($P<0.01$).血清IL-10有腹水组低于无腹水组、NC组, 无腹水组略高于NC组, 有腹水组与NC组、无腹水比较均有统计学意义($P<0.01$), 无腹水组与NC组比较无统计学意义($P>0.05$).血清IL-10与总胆红素呈负相关($r = -0.339$, $P<0.01$), 与凝血酶原活动度呈正相关($r = 0.506$, $P<0.01$), 与血清白蛋白水平呈正相关($r = 0.566$, $P<0.01$);血清IL-18与总胆红素呈正相关($r = 0.667$, $P<0.01$), 与凝血酶原活动度呈负相关($r = -0.463$, $P<0.01$), 与白蛋白水平呈负相关($r = -0.315$, $P<0.01$).血清IL-10与IL-18水平呈负相关($r = -0.51$, $P<0.01$).

结论: IL-10、IL-18在肝炎肝硬化的发病机制中起一定作用, 其水平与肝损害的程度密切相关.

谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民. 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1794-1797
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1794.asp

0 引言

近年研究表明, 在乙型肝炎病毒(HBV)的作用下, 肝脏发生炎性反应和相继的纤维化. 在此过程中有两类细胞因

的同时焦虑也得到了明显的改善. 中医《内经》认为: “喜”可胜“忧、悲”. 故而使患者情绪愉悦可有效对抗病理症状引起的消极情绪. 幽默疗法起源于1950和1960年, 近几年幽默疗法在临床实践中发挥着独特的治疗作用. 新近研究[8-11]认为, 幽默体验、大笑可刺激大脑中枢对脑啡肽的释放, 脑啡肽具有改善情绪、提高免疫力、镇静和镇痛等作用. 这表明幽默疗法可从提高患者自身免疫能力等入手, 促进疾病的康复. 临床研究[12]也表明中药治疗可逆转肠上皮化生, 其主要是通过改善免疫功能, 对胃黏膜起到修复作用从而改善泌酸功能, 调节胃动力, 以达到病理症状的改善. 而幽默疗法促进脑啡肽释放, 提高患者免疫能力, 无疑协同了中药, 加强了胃功能的改善, 进一步促进了病理症状的改善.

4 参考文献

1 高鼎良, 陶家泳, 邵云弟. 盐酸帕罗西汀治疗胃肠疾病433例分析. 中华消化杂志 1999;19:357-358
2 王伟岸, 潘国忠, 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;82:308-311
3 章敏. 中医药对慢性萎缩性胃炎癌前病变的研究进展. 山东中医杂志 1994;13:330-332
4 陈昙庆, 刘国普. 慢性萎缩性胃炎的中医药研究概况. 山东中医杂志 2001;20:506-508
5 孙洁. 中西医结合辨治慢性萎缩性胃炎的思路. 陕西中医 2004;25:815-816
6 中国中西医结合研究会消化系统疾病专业委员会. 慢性胃炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准(试行方案). 中西医结合杂志 1990;10:318-319
7 张海燕, 李延青. 肠易激综合征发病机制的研究进展. 中国综合临床 2004;20:1145-1147
8 王国祥. 幽默疗法探析. 医学与社会 2004;7:19-21
9 钱会南. 论情志因素对体质及发病的影响. 北京中医药大学学报 2004;27:11-13
10 王玉秀, 童昭岗, 胡海青. 内源性阿片肽系统免疫调节功能的研究进展. 中国临床康复 2003;10:1558-1559
11 Bennett HJ. Humor in medicine. *South Med J* 2003;96:1257
12 李荣华, 王士昌, 遇俊清, 丁明发, 董建琪, 冯忠军. 中药胃病灵治疗慢性萎缩性胃炎的研究. 世界华人消化杂志 1998;6:951-954

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义

谭永港, 刘 俊, 丁世华, 刘新民

谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民, 深圳市第二人民医院消化内科
广东省深圳市 518035
通讯作者: 谭永港, 518035, 广东省深圳市笋岗西路3002号, 深圳市第二人民医院.
电话: 0755-83808552 传真: 0755-83228956

收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

摘要

目的: 探讨血清白介素(IL)-10、IL-18在肝炎肝硬化发病机制中的作用.

方法: 肝炎肝硬化患者62例, 根据child-pugh分级法分A、B、C级三组, 采用ELISA法检测血清IL-10、IL-18水平, 对照组(NC)为20名健康献血员.

结果: 血清IL-18含量由高到低依次为child-C级、B级、A级、NC组, 方差分析有显著差异($P<0.01$), 各组间两两比较均有统计学意义($P<0.05$).IL-10含量child-A级组略高于NC组, 无统计学意义($P>0.05$), B、C组均低于NC组, 两两比较均有统计学意义($P<0.05$), B级与C级组比较有统计学意义($P<0.01$).血清IL-18含量由高到低依次为有腹水组、无腹水组、NC组, 方差分析有显著差异($P<0.01$), 各组间两两比较有统计学意义($P<0.01$).血清IL-10有腹水组低于无腹水组、NC组, 无腹水组略高于NC组, 有腹水组与NC组、无腹水比较均有统计学意义($P<0.01$), 无腹水组与NC组比较无统计学意义($P>0.05$).血清IL-10与总胆红素呈负相关($r = -0.339$, $P<0.01$), 与凝血酶原活动度呈正相关($r = 0.506$, $P<0.01$), 与血清白蛋白水平呈正相关($r = 0.566$, $P<0.01$);血清IL-18与总胆红素呈正相关($r = 0.667$, $P<0.01$), 与凝血酶原活动度呈负相关($r = -0.463$, $P<0.01$), 与白蛋白水平呈负相关($r = -0.315$, $P<0.01$).血清IL-10与IL-18水平呈负相关($r = -0.51$, $P<0.01$).

结论: IL-10、IL-18在肝炎肝硬化的发病机制中起一定作用, 其水平与肝损害的程度密切相关.

谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民. 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1794-1797
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1794.asp

0 引言

近年研究表明, 在乙型肝炎病毒(HBV)的作用下, 肝脏发生炎性反应和相继的纤维化. 在此过程中有两类细胞因

子起作用，一类为促炎和促纤维化因子，如肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)-1、IL-6等，另一类为抑制炎症与抗纤维化的细胞因子，如IL-10、IL-4、IL-13.为此我们检测了62例肝炎肝硬化患者外周血IL-10、IL-18的水平，旨在探讨二者在肝炎肝硬化中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 肝炎肝硬化患者62例，男35例，女17例，年龄20-78岁，平均年龄45.34 ± 12.27岁.按照child-pugh分级，A级19例，B级23例，C级20例.诊断均符合2000年(西安)中华医学会传染病与寄生虫分会，肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准，并排除上消化道出血、严重感染、原发性肝癌、心肺脑疾病及1 wk内使用抗生素的病例.对照组(NC)为20名健康献血员.IL-10试剂盒由深圳晶美生物有限公司提供，IL-18试剂盒由北京岳泰科技有限责任公司提供.

1.2 方法 取患者清晨空腹外周静脉血2-3 mL，3 000 r/min离心10 min，取上清液按每次用量分装于标本瓶中，置-20℃保存待测，血清色泽应为黄色.采用ELISA法检测血清IL-10、IL-18水平.

统计学处理 数据以mean ± SD表示，用SPSS11.0统计软件进行方差分析和直线相关分析;$P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

2.1 肝硬化严重程度不同的患者与IL-10、IL-18水平的关系 血清IL-18含量由高到底依次为child-C级、B级、A级、NC组，方差分析有显著差异($P<0.01$)，各组间两两比较均有统计学意义($P<0.05$).IL-10含量child-A级组略高于NC组，无统计学意义($P>0.05$)，B、C级组均低于NC组，两两比较均有统计学意义($P<0.05$)，B级与C级组比较有统计学意义($P<0.01$).血清IL-10与IL-18水平呈负相关($r = -0.51$，$P<0.01$)(表1).

表1 不同严重程度肝炎肝硬化患者IL-10、IL-18水平(mean ± SD，pg/mL)

	n	IL-10	IL-18
A	19	38.44 ± 12.11	197.78 ± 102.85[a]
B	23	24.72 ± 8.66[ac]	365.64 ± 146.65[ac]
C	20	11.81 ± 4.80[ace]	701.21 ± 399.37[ace]
NC	20	35.73 ± 15.41	72.81 ± 38.18

[a]$P<0.05$ vs NC组;[c]$P<0.05$ vs A级组;[e]$P<0.05$ vs B级组.

2.2 肝炎肝硬化有无腹水与IL-10、IL-18含量变化的关系 血清IL-18含量由高到低依次为有腹水、无腹水组、NC组，方差分析有显著差异($P<0.01$)，各组间两两比较均有统计学意义($P<0.01$).血清IL-10有腹水组低于无腹水、NC组，无腹水组略高于NC组，有腹水组与NC组、无腹水组比较均有统计学意义($P<0.01$)，无腹水组与NC组比较无统计学意义($P>0.05$)(表2).

表2 肝炎肝硬化有无腹水与IL-10、IL-18水平的关系(mean ± SD，pg/mL)

	n	IL-10	IL-18
无腹水	22	36.89 ± 12.31	244.27 ± 144.21[a]
有腹水	40	18.09 ± 9.39[ac]	514.70 ± 352.07[ac]
NC	20	35.73 ± 15.41	72.81 ± 38.18

[a]$P<0.05$ vs NC组;[c]$P<0.05$ vs 无腹水组.

2.3 肝炎肝硬化白蛋白降低与IL-10、IL-18含量变化的关系 血清IL-18含量由高到低依次为<28 g/L、>28 g/L、NC组，方差分析有显著差异($P<0.01$)，各组间两两比较，有统计学意义($P<0.01$)，IL-10含量由高到低依次为NC、>28 g/L、<28 g/L组，NC组与>28 g/L组比较无统计学意义($P>0.05$)，NC与<28 g/L组比较有统计学意义($P<0.01$)，>28 g/L与<28 g/L组比较有统计学意义($P<0.001$).血清白蛋白水平与IL-10水平呈正相关($r = 0.566$，$P<0.01$)，与IL-18水平呈负相关($r = -0.315$，$P<0.01$)(表3).

表3 肝炎肝硬化患者白蛋白水平与IL-10、IL-18的关系(mean ± SD，pg/mL)

	n	IL-10	IL-18
白蛋白>28 g/L	24	34.25 ± 13.45	273.16 ± 159.75[a]
白蛋白<28 g/L	38	18.78 ± 10.26[ac]	510.69 ± 363.62[ac]
NC	20	35.73 ± 15.41	72.81 ± 38.18

[a]$P<0.05$ vs NC组;[c]$P<0.05$ vs >28 g/L组.

2.4 肝炎肝硬化凝血酶原活动度(PTA)与IL-10、IL-18含量变化的关系 血清IL-18含量由高到低依次为<40%、40-80%、>80%、NC组，方差分析有显著差异($P<0.001$).IL-18含量>80%与40-80%组比较无统计学意义($P>0.05$)，>80%、40-80%、<40%组与NC组比较均有统计学意义($P<0.05$)，>80%与<40%组比较有统计学意义($P<0.001$)，40-80%与<40%比较有统计学意义($P<0.05$).IL-10含量由高到低依次为NC组、>80%、40-80%、<40%组，方差分析有显著差异($P<0.05$)，>80%、40-80%组与NC比较均无统计学意义($P>0.05$)，<40%与NC级比较有统计学意义($P<0.01$)，>80%与40-80%比较无统计学意义($P>0.05$)，>80%与<40%组比较有统计学意义($P<0.01$)，40-80%与<40%组比较有统计学意义($P<0.01$).血清PTA与血清IL-10水平呈正相关($r = 0.506$，$P<0.01$)，与血清IL-8水平呈负相关($r = -0.463$，$P<0.01$)(表4).

表4 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平与PTA的关系(mean ± SD, pg/mL)

	n	IL-10	IL-18
PTA>80%	16	32.61 ± 12.33	237.18 ± 113.17[a]
PTA(80-40%)	28	28.02 ± 13.58	363.48 ± 260.25[a]
PTA<40%	18	12.71 ± 5.51[ace]	660.08 ± 389.13[ace]
NC	20	35.73 ± 15.41	72.81 ± 38.18

[a]$P<0.05$ *vs* NC组; [c]$P<0.05$ *vs* >80%组; [e]$P<0.05$ *vs* 40-80%组.

2.5 肝炎肝硬化总胆红素升高与IL-10、IL-18含量变化的关系 血清IL-18含量由高到低依次为>85.5 μmol/L、<85.5 μmol/L、NC组方差分析有显著差异($P<0.001$)，各组间两两比较均有统计学意义($P<0.001$). IL-10含量由高到低依次为NC组、<85.5 μmol/L、>85.5 μmmol/L组. NC组与<85.5 μmol/L比较无统计学意义($P>0.05$)，NC组与>85.5 μmmol/L组比较有统计学意义($P<0.01$)，>85.5 μmol/L与<85.5 μmol/L组比较有统计学意义($P<0.01$). 血清总胆红素水平与IL-18水平呈正相关($r = 0.677$，$P<0.01$)，与IL-10水平呈负相关($r = -0.339$，$P<0.01$)(表5).

表5 肝炎肝硬化血清IL-10、IL-18水平与总胆红素的关系(mean ± SD, pg/mL)

	n	IL-10	IL-18
TBIL<85.5 μmol/L	48	27.70 ± 14.02	320.39 ± 213.96[a]
TBIL>85.5 μmol/L	14	14.70 ± 6.58[ac]	755.92 ± 402.06[ac]
NC	20	35.73 ± 15.41	72.8 ± 38.18

[a]$P<0.05$ *vs* NC组; [c]$P<0.05$ *vs* <85.5 μmol/L组.

3 讨论

IL-10是由辅助T细胞亚群Th2细胞、单核细胞、巨噬细胞、B细胞、以及角质细胞、基质细胞等在各种免疫活化状态下产生的一种重要的细胞因子. 研究[1-2]表明IL-10具有抗炎、抗纤维化作用. 本实验中肝炎肝硬化患者血清IL-10水平明显低于正常人，且随child-pugh评分的升高而呈进行性下降. IL-10降低的原因可能是:(1)在肝硬化期炎症反应减轻，淋巴细胞浸润减少，使IL-10产生亦减少. (2)肝硬化时干扰素-γ(INF-γ)增高，促进脂多糖诱导产生TNF-α，而TNF-α是很强的IL-10抑制剂. 本实验亦显示肝炎肝硬化血清IL-10水平与凝血酶原活动度呈正相关，与总胆红素水平呈负相关，有腹水组显著低于无腹水组，与白蛋白水平呈正相关. 提示IL-10水平的绝对或相对不足不能有效抑制促炎和促纤维化因子合成与表达，导致肝细胞损害加重，病情恶化，门脉压力升高，间接证明IL-10对肝炎肝硬化细胞损害具有保护作用;而且血清IL-10水平可能与其损害程度密切相关.

IL-18主要由活化的巨噬细胞和肝脏枯否氏细胞产生，通过受体介导发挥其生物学作用. IL-18的主要生物学功能有:(1)诱导免疫细胞产生INF-γ和激活自然杀伤(NK)细胞;(2)刺激T细胞增殖，增强淋巴细胞的细胞毒性作用;(3)诱导Th1类细胞产生相应的细胞因子，主要包括IFN-γ、IL-2等;(4)增强细胞间黏附分子(ICAM-1)及FasL的表达作用. 动物实验证实IL-18是内毒素诱导肝损害的重要递质，IL-18、INF-γ、TNF-α等细胞因子可互相调节、相互诱生，形成恶性循环，导致肝脏严重受损[3]. 亦有报道[4]酒精性肝硬化患者外周单个核细胞IL-18的表达水平明显高于正常人，且随child-pugh评分的上升而上调，与血浆脂多糖(LPS)水平呈正相关. 文维群 *et al*[5]研究表明IL-18参与了宿主HBV的免疫应答，并与肝脏的炎症程度相关. 迄今为止未见IL-18与肝炎肝硬化关系的报道. 本实验中肝硬化患者IL-18水平显著增高，且随child-pugh评分升高而呈进行性上升，与总胆红素呈正相关，与凝血酶原活动度呈负相关，且血清IL-18在白蛋白低下患者显著升高，与白蛋白水平呈负相关，有腹水组显著高于无腹水组. 表明IL-18参与了肝炎肝硬化发生、发展的病理生理过程，而且其水平与病情的严重程度密切相关.

总之，HBV对肝细胞无直接损害作用，肝细胞的损害是由于人体免疫系统被HBV致敏后，产生相应体液和细胞免疫反应，其在清除病毒的同时也攻击表面有HBV的肝细胞，致其损害坏死，HBV在体内大量复制，激活巨噬细胞和肝脏枯否氏细胞大量分泌IL-18，导致IL-18水平升高. IL-18诱导免疫细胞产生INF-γ，诱导Th1类细胞产生响应的细胞因子，使Th1/Th2平衡向Th1方向移动，INF-γ及Th1类细胞因子在消除病毒的同时杀伤被感染的肝细胞，使肝细胞被破坏，症状加重. 肝炎肝硬化患者往往伴有肠源性内毒素血症，IL-18还可能通过内毒素诱导的TNF-α为核心的细胞因子和炎症递质网络参与了肝炎肝硬化肝细胞损害过程，导致病情进一步加重.

本实验中血清IL-10与IL-18水平呈负相关，提示抗炎、抗纤维化因子IL-10与促炎、促纤维化因子IL-18二者相互制约，共同影响肝炎肝硬化的发生发展. 血清IL-10、IL-18水平的高低在一定程度上反映了肝细胞的损害程度和肝纤维化的严重程度，可为临床估计病情、判断预后、制订治疗方案提供参考指标.

4 参考文献

1 Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by in vitro and vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998;273:302-308

2 Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998;28:1597-1606

3 Tsutsui H, Matsui K, Kawada N, Hyodo Y, Hayashi N, Okamura H, Higasshino K, Nakanishi K. IL-18 accounts for

both TNF-alpha and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol* 1997;159:3961-3967
4 Yumoto E, Hgashi T, Nouso K, Nakatsukasa H, Fujiwara K, Hanafusa T, Yumoto Y, Tanimoto T, Kurimoto M, Tanaka N, Tsuji T. Serum gamma-interferon-inducing factor (IL-18) and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:285-294
5 文维群, 章廉, 肖红, 胡章勇, 张明霞, 骆抗先. 乙型肝炎病毒感染者IL-18基因的转录及表达. 中华医学杂志 2001;81:655-658

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例

孙早喜, 孙诚谊

孙早喜, 孙诚谊, 贵阳医学院附属医院急救中心 贵州省贵阳市 550004
通讯作者: 孙早喜, 570102, 现工作于海南省海口市, 海南医学院附院急诊科.
收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨联合静脉导管、血液滤过和中药(如大黄等)对暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的治疗作用.

方法: 2001-08/2005-01共收治暴发性胰腺炎98例.将患者随机分成联合血液滤过、胃肠中药清洗、中心静脉导管腹腔引流和腹内压检测组(组Ⅰ, 40例)和对照组(组Ⅱ, 58例), 对照组患者采用常规保守治疗.观察两组患者的疗效, 监测腹腔引流和腹内压情况、APACHE Ⅱ评分并分析.

结果: 治疗后第2 d、第5 d, 组Ⅰ、Ⅱ患者的APACHE Ⅱ评分在统计学上有显著性差异(P<0.01).组Ⅰ、Ⅱ患者的疗效比较(腹痛、腹胀缓解时间、住院时间)有显著性差异(P<0.05);组Ⅰ与组Ⅱ患者的囊肿发生率有显著性差异(P<0.01).组Ⅰ、Ⅱ患者的死亡率分别是10.0%、20.7%.组Ⅰ患者的腹腔引流量与腹内压、腹内压与住院时间及APACHE Ⅱ评分均呈正相关(r = 0.552、0.748、0.923, P<0.01).

结论: 联合中心静脉导管引流、多次短时血液滤过和胃肠道中药清洗对暴发性胰腺时腹腔室隔综合征有重要的防治作用.

孙早喜, 孙诚谊. 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1797-1799
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1797.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的治疗基本有章可循, 但死亡率仍在20%.SAP患者约11%并发腹腔室隔综合征(abdominal compartment syndrome, ACS), 而SAP患者中约25%为暴发性胰腺炎(fulminant acute pancreatitis, FAP), FAP时ACS发生率更高, 其死亡率高达60%, 并且治疗无章可循[1-3].在FAP时采用联合多次短时血滤(short veno-venous hemofiltration, SVVH)、胃肠道中药清洗和腹腔中心静脉导管引流并检测腹腔内压以治疗和预测病情变化未见报道.本文就此进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-08/2005-01贵阳医学院附属医院急救中心和肝胆外科收治98例FAP患者[4], 98例FAP患者入院时CT严重指数(CTSI)积分7.85±1.10分、APACHE Ⅱ积分17.51±4.51分、SAP Ⅱ级.随机分为组Ⅰ、组Ⅱ(患者或患者家属选择治疗方案).两组患者性别、年龄及入院时CTSI积分、APACHE Ⅱ积分均无显著性差异(P>0.05).

1.2 方法 98例患者随机分成多次短时血液滤过、胃肠道中药清洗联合中心静脉导管腹腔引流、腹内压检测组(组Ⅰ, 40例)和对照组(组Ⅱ, 58例).组Ⅱ患者进行SAP常规非手术治疗措施.组Ⅰ患者于入院的当天行右侧腹区, 或双侧腹区穿刺, 置入中心静脉导管进行持续引流(记录每天引流量), 并于置管后的当天、第2 d、第5 d监测腹内压(并记录);血液滤过时机依全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的指标而定;大黄或清胰汤于入院当天开始胃管注入或肛滴(3次/d).临床疗效观察:观察组Ⅰ、Ⅱ腹痛、腹胀时间及住院时间, 治疗结果;观察治疗组腹腔引流、腹内压变化情况;观察组Ⅰ、Ⅱ治疗前、治疗后第2 d、第5 d APACHE Ⅱ积分.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 用SPSS12.0进行统计学分析, P<0.05为有统计学意义.

both TNF-alpha and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol* 1997;159:3961-3967
4 Yumoto E, Hgashi T, Nouso K, Nakatsukasa H, Fujiwara K, Hanafusa T, Yumoto Y, Tanimoto T, Kurimoto M, Tanaka N, Tsuji T. Serum gamma-interferon-inducing factor (IL-18) and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:285-294
5 文维群, 章廉, 肖红, 胡章勇, 张明霞, 骆抗先. 乙型肝炎病毒感染者IL-18基因的转录及表达. 中华医学杂志 2001;81:655-658

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例

孙早喜, 孙诚谊

孙早喜, 孙诚谊, 贵阳医学院附属医院急救中心 贵州省贵阳市 550004
通讯作者: 孙早喜, 570102, 现工作于海南省海口市, 海南医学院附院急诊科.
收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨联合静脉导管、血液滤过和中药(如大黄等)对暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的治疗作用.

方法: 2001-08/2005-01共收治暴发性胰腺炎98例.将患者随机分成联合血液滤过、胃肠中药清洗、中心静脉导管腹腔引流和腹内压检测组(组Ⅰ, 40例)和对照组(组Ⅱ, 58例), 对照组患者采用常规保守治疗.观察两组患者的疗效, 监测腹腔引流和腹内压情况、APACHE Ⅱ评分并分析.

结果: 治疗后第2 d、第5 d, 组Ⅰ、Ⅱ患者的APACHE Ⅱ评分在统计学上有显著性差异(P<0.01).组Ⅰ、Ⅱ患者的疗效比较(腹痛、腹胀缓解时间、住院时间)有显著性差异(P<0.05);组Ⅰ与组Ⅱ患者的囊肿发生率有显著性差异(P<0.01).组Ⅰ、Ⅱ患者的死亡率分别是10.0%、20.7%.组Ⅰ患者的腹腔引流量与腹内压、腹内压与住院时间及APACHE Ⅱ评分均呈正相关(r = 0.552、0.748、0.923, P<0.01).

结论: 联合中心静脉导管引流、多次短时血液滤过和胃肠道中药清洗对暴发性胰腺时腹腔室隔综合征有重要的防治作用.

孙早喜, 孙诚谊. 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1797-1799
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1797.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的治疗基本有章可循, 但死亡率仍在20%.SAP患者约11%并发腹腔室隔综合征(abdominal compartment syndrome, ACS), 而SAP患者中约25%为暴发性胰腺炎(fulminant acute pancreatitis, FAP), FAP时ACS发生率更高, 其死亡率高达60%, 并且治疗无章可循[1-3].在FAP时采用联合多次短时血滤(short veno-venous hemofiltration, SVVH)、胃肠道中药清洗和腹腔中心静脉导管引流并检测腹腔内压以治疗和预测病情变化未见报道.本文就此进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-08/2005-01贵阳医学院附属医院急救中心和肝胆外科收治98例FAP患者[4], 98例FAP患者入院时CT严重指数(CTSI)积分7.85±1.10分、APACHE Ⅱ积分17.51±4.51分、SAP Ⅱ级.随机分为组Ⅰ、组Ⅱ(患者或患者家属选择治疗方案).两组患者性别、年龄及入院时CTSI积分、APACHE Ⅱ积分均无显著性差异(P>0.05).

1.2 方法 98例患者随机分成多次短时血液滤过、胃肠道中药清洗联合中心静脉导管腹腔引流、腹内压检测组(组Ⅰ, 40例)和对照组(组Ⅱ, 58例).组Ⅱ患者进行SAP常规非手术治疗措施.组Ⅰ患者于入院的当天行右侧腹区, 或双侧腹区穿刺, 置入中心静脉导管进行持续引流(记录每天引流量), 并于置管后的当天、第2 d、第5 d监测腹内压(并记录);血液滤过时机依全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的指标而定;大黄或清胰汤于入院当天开始胃管注入或肛滴(3次/d).临床疗效观察:观察组Ⅰ、Ⅱ腹痛、腹胀时间及住院时间, 治疗结果;观察治疗组腹腔引流、腹内压变化情况;观察组Ⅰ、Ⅱ治疗前、治疗后第2 d、第5 d APACHE Ⅱ积分.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 用SPSS12.0进行统计学分析, P<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 入院时及治疗过程中病情 入院时CTSI积分及APACHE Ⅱ积分，二组比较无显著性差异.治疗后第2 d、第5 d时，联合静脉导管腹腔引流、中药胃肠清洗和多次短时血滤组与对照组比较，APACHE Ⅱ积分均明显低于对照组($P<0.01$)；与治疗前比较，APACHE Ⅱ积分均明显降低($P<0.01$，表1).

表1 病情变化情况(mean ± SD)

组别	入院时病情		治疗过程中APACHEII变化情况	
	CTSI积分	APACHEII积分	治疗后第2 d	治疗后第5 d
组Ⅰ	7.61 ± 0.67	16.44 ± 2.28	9.66 ± 1.88[bd]	4.63 ± 1.46[bd]
组Ⅱ	7.59 ± 0.86	15.74 ± 1.91	13.46 ± 1.93[d]	10.78 ± 2.01[d]

[b]$P<0.01$ *vs*组Ⅱ，[d]$P<0.01$ *vs*治疗前.

2.2 腹腔引流及腹腔内压情况 组Ⅰ40例患者引流物均为暗红色血性液体.引流时间3.5 ± 0.85 d，引流量与腹腔内压呈正相关($r = 0.552$，$P<0.01$)，腹腔内压与住院时间呈正相关($r = 0.748$，$P<0.01$)，腹腔内压与APACHE Ⅱ积分呈正相关($r = 0.748$，$P<0.01$，表2).

表2 腹腔引流及腹腔内压情况(mean ± SD)

	首次	第2次	第3次	*P*值
引流量(mL)	1 817.07 ± 639.10	814.63 ± 422.82	85.49 ± 39.78	<0.01
腹腔内压(cmH_2O)	29.29 ± 5.53	13.95 ± 4.05	6.71 ± 1.68	<0.01
APACHE Ⅱ积分	16.44 ± 2.28	9.66 ± 1.88	4.63 ± 1.46	<0.01

2.3 腹痛消失、腹胀缓解时间和治疗结果情况 组Ⅰ患者的腹痛消失、腹胀缓解和住院时间较组Ⅱ明显缩短($P<0.01$).组Ⅰ的死亡率及囊肿发生率较组Ⅱ明显降低，两组比较，死亡率无显著性差异，囊肿发生率有显著性差异($P<0.01$，表3).

表3 局部症状变化及治疗结果(mean ± SD)

组别	腹部症状变化情况		治疗结果		
	腹痛消失时间(d)	腹胀缓解时间(d)	住院时间(d)	死亡率	囊肿发生率(%)
组Ⅰ	3.27 ± 0.87[b]	6.90 ± 1.18[b]	15.59 ± 3.89[b]	10	8.9[b]
组Ⅱ	14.13 ± 2.14	23.36 ± 3.76	28.28 ± 4.61	20.7	37.9

[b]$P<0.01$ *vs*组Ⅱ.

3 讨论

最近几年，不少学者提出了FAP新亚型、ACS、重症胰腺炎时细胞因子变化及血液滤过、腹膜透析、坏死性胰腺炎的微创治疗等新观点、新概念，并对其进行了研究[3, 5-6]. FAP的显著特点是病情发展迅速，早期出现多器官(特别是胰腺和胃肠道)功能障碍；ACS发生率高；治疗无章可循，死亡率高.

3.1 暴发性胰腺炎时ACS分型与分级 有人[7-9]将FAP时ACS分两型，一型为腹腔积液，系膜、网膜及后腹膜水肿型，另一型为肠麻痹、胃肠道积气、积液型.腹腔内压力如大于15 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)，同时伴有心输出量减少或进行性少尿，在气道峰值压正常或增高的情况下出现缺氧，即可明确ACS的诊断.根据腹腔内压力可将ACS分为四级：一级10-14 cmH_2O，二级15-24 cmH_2O，三级25-35 cmH_2O，四级>35 cmH_2O.本实验组Ⅰ40例患者的腹腔内压是29.29 ± 5.53 cmH_2O，临床上诊断为ACS.

3.2 暴发性胰腺炎时ACS的监测与预防 目前ACS的监测主要是通过膀胱测压方法间接反应腹腔内压力以监测ACS[10]. 在预防ACS时有人[11]主张剖腹减压并术后暂时用肠外营养的3L袋、多网孔物暂时关闭腹腔.由于膀胱测压方法只是间接地反应腹腔内压力，并有一定干扰因素，所以，我们采用中心静脉导管腹腔置管直接监测腹内压，由于导管的引流，对腹腔积液型ACS起到了预防作用，并避免了手术对腹腔内的干扰，省去了剖腹手及腹腔手术时麻醉对肝脏及全身多器官(特别是胃肠道)的影响，从而达到预防ACS的作用[12].

3.3 暴发性胰腺炎时ACS的治疗 有人认为腹腔手术减压是治疗ACS的唯一方法，有人对腹腔积液，系膜、网膜及后腹膜水肿型ACS，早期经腹腔镜给予腹腔冲洗、引流，或充分敞开腹腔，以降低腹腔内高压，稀释及引流有胰液及炎性递质的腹腔渗出液，减轻全身炎症反应；也有人行栽葱式引流，或在腹腔镜下腹腔穿刺灌洗、置管引流及坏死组织清除，但术后死亡率可高达71%[6, 13].本文针对FAP的病因、病理生理及临床特点和FAP时ACS的病理生理和病变类型、特点，采用腹腔中心静脉导管引流、SVVH和胃肠道中药清洗对FAP时的ACS进行治疗.结果显示，引流量与腹内压呈正相关，腹内压与住院时间、APACHE Ⅱ积分呈正相关；从疗效(腹痛消失时间、腹胀缓解时间、住院时间、死亡率、囊肿发生率)上对比，治疗组患者的疗效明显优于对照组患者的疗效.这种效果的原因和机制是：(1)中心静脉导管引流，消除了因腹腔积液引起的ACS；(2)血滤或引流大大地减少了多种炎性细胞因子、炎症递质、各种酶及坏死物质(包括大、中、小分子量物质)对胃肠的麻痹作用，减轻了上述因素对组织器官的损害而产生的水肿(系膜、网膜、胃肠道及后腹膜水肿)型ACS；(3)消除了腹腔镜手术或剖腹手术及麻醉对腹腔干扰和对全身多器官(特别是胃肠道)的影响；(4)大黄等中药能有效减少肠道内毒素和细菌移位，减轻肠黏膜损伤，保护肠黏膜功能，促进胃肠道运动及排空[5-6, 12-19].

总之，联合多次短时血液滤过、胃肠道中药清洗和

中心静脉导管腹腔引流、腹内压监测能有效预防和治疗FAP时的ACS.但存在静脉导管腹腔引流速度慢的问题.

4 参考文献

1 Isenmann R, Rau B, Beger HG. Early severe acute pancreatitis: Characteristics of a new subgroup. *Pancreas* 2001;22:274-278
2 Bosscha K, Hulstaert PF, Hennipman A, Visser MR, Gooszen HG, van Vroonhoven TJ, vd Werken C. Fulminant acute pancreatitis and infected necrosis: results of open management of the abdomen and "planned" reoperations. *J Am Coll Surg* 1998;187:255-262
3 张圣道, 雷若庆. 重症急性胰腺炎的诊治方案及发展趋势. 中华肝胆外科杂志 2004;10:219-220
4 中华医学会外科学分会胰腺学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准(1996年第二次方案). 中华外科杂志 1997;35:773-774
5 封光华, 蔡阳, 贾鹏辉, 杨棋俊, 贾忠, 张健, 张喜平. 联合血液滤过和腹膜透析治疗急性重症胰腺炎. 中华外科杂志 2004;42:272-275
6 Cuschieri A. Pancreatic necrosis: pathogenesis and endoscopic management. *Semin Laparosc Surg* 2002;9:54-63
7 孙家邦, 朱斌. 暴发性胰腺炎的诊断及治疗. 中国实用外科杂志 2004;24:23-24
8 Fietsam R, Villalba M, Glover JL, Gooszen HG. Intra-abdominal compartment syndrome as a complication of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Am Surg* 1989;55:396-402
9 Mauricio FL, Ernesto CG, Benjamin GA, Michael A, Jeff MD. Hipertension intra-abdominal Y sindrome compartamental abdomina en pacientes con pancreatitis aguda. *Cir Ciru* 2003;71:107-111
10 Cheatam ML, Safcsak K. Intraabdominal pressure: a revised method for measurement. *Am Coll Surg* 1998;186:594-595
11 Ciresi DL, Cali RF, Sengore AJ. Abdominal closure using non-absorbable mesh after massive resuscitation prevents abdominal compartment syndrome and gastrointestinal fistula. *Am Surg* 1999;65:720-725
12 Appelros S, Lindgren S, Borgstrom A. Short and long term outcome of severe acute pancreatitis. *Eur J Surg* 2001;167:281-286
13 杨朝晖, 杨军, 汪勇俊. 连续性血液滤过对重症急性胰腺炎诱发组织器官损害的保护作用. 中国危重病急救医学 2004;16:232-234
14 Schein M, Wittmann DH, Aprahamian CC, Condou RE. The abdominal compartment syndrome: the physiological and clinical consiquences of elevated intra-abdominal pressure. *J Am Coll Surg* 1995;180:745-753
15 Ertel W, Oberholzer A, Platz A, Stocker R, Trentz O. Incidence and clinical pattern of the abdominal compartment syndrome after "damge-control"laparotomy in 311 patients with severe abdominal and/or pelvic trauma. *Crit Care Med* 2000;28:1747-1753
16 Gecelter G, Fahoum B, Gardezi S, Schein M. Abdominal compartment syndrome in severe acute pancreatitis: An indication for a decompressing laparotomy? *Dig Surg* 2002;19:402-405
17 Morken J, Michael A, West MD. Abdominal compartment syndrome in the intensive care unit. *Current Opinion in Critical Care* 2001;7:267-274
18 吴承堂, 黎游良. 中药清胰汤对犬急性坏死性胰腺炎肠黏膜损伤修复的影响. 中国普外基础与临床杂志 1998;5:326-328
19 陈晓理, 冉瑞图. 大黄治疗坏死性胰腺炎的机理探讨. 华西医科大学学报 1996;27:418-421

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 由周刊出版发行

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* 由世界胃肠病学杂志社和Elsevier共同出版. 2005-01-01起改为周刊发行，每月7、14、21、28日出版. 语言编辑有Elsevier出版公司香港医学部负责培训和管理. 语言编辑由印度国际出版工业编辑服务有限公司的6位语言编辑组成，并由他们来完成文章语言方面的处理工作. 印刷版国际发行2005年开始由Elsevier全球独家发行.

*WJG*编委会由517位国际一流胃肠病学和肝病学专家组成，分布在51个国家和地区，其中中国有50位（9.67%）. 我们对所有来稿均进行同行评议. 采用匿名方式，通常每篇文章邀请3位专家进行审稿. 至少二位审稿人通过为录用，否则为退稿. 每期的最后一页致谢本期所有的审稿人（包括退稿）. 每篇文章从审稿开始至出版由2位科学编辑和2位语言编辑负责处理. 印刷版和电子版最后一页致谢本期同行评审专家的姓名和机构.

WJG 采用开放存取出版模式(OAP)，从2003-04-15/2005-06-29电子版的点击次数为4963364，平均每天点击次数为6050次.

WJG 2004-08-09/2005-05-31 ，共收到国内外来稿1861篇，其中中国733篇（39.38%），国外来稿1128篇（60.61%），退稿690篇（37.07%），审稿中350篇. 已发表2760文章被美国国立医学图书馆医学索引收录，其中1524篇被SCI 收录的期刊引用（1999-2005-03-30），占55.21%. SCI收录期刊引用*WJG*发表的文章，包括Nature Medicine, Cell, Nature Reviews Neuroscience, Nature Cell Biology , Genes & Development, Lancet), Nature Neuroscience, Neuron), Nature Reviews Cancer, Gastroenterology, Hepatology, 等国际顶级期刊. 各项基金论文数占所有发表论文的百分比为1998年59.6%，1999年58.9%，2000年55.7%，2001年63.6%，2002年60.6%，2003年54.9%，2004年56.0%.

WJG 1998-2005年摘要被*Index Medicus*, MEDLINE, PubMed, Chemical Abstracts, EMBASE, Abstracts Journals, *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, CAB Abstracts and Global Health 收录.

WJG 2000-2003年影响因子ISI JCR分别为0.993, 1.445, 2.532 和3.318 .

WJG 2001年入选中国期刊方阵"双百"期刊. 2002年10月11日第一次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. 2003年荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊. 2003年度获第二届中国百种杰出学术期刊. 2004年度第二次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：30424812），资助期限2年，资助强度为每年12万元. 2005年荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊.

WJG 2006年由北京报刊发行局发行，国内统一刊号CN 14 1219/R ，邮发代号82-261, 页码160, 月价200.00. （世界胃肠病学杂志社2005-06-29）

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿)，我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力，提高了《世界华人消化杂志》的学术质量，在此表示衷心感谢！

陈红松 副研究员
北京大学肝病研究所
陈立波 副教授
武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院外科
陈蔚文 教授
广州中医药大学脾胃研究所
谷俊朝 副教授
首都医科大学附属北京友谊医院普外科
匡安仁 教授
四川大学华西医院
来茂德 教授
浙江大学医学院病理学教研室
李靖 副教授
中国人民解放军第三军医大学新桥医院肝胆外科
吕宁
副主任医师 中国医学科学院协和医科大学中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物与分子生物学实验室
吕毅 教授
西安交通大学第一医院普通外科
罗和生 教授
武汉大学人民医院消化内科
毛青 教授
中国人民解放军第三军医大学第一附属医院全军感染病研究所
梅林 教授
北京大学医学部生理学与病理生理学系
聂青和 副教授
中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科全军感染病治疗中心
牛建昭 教授
北京中医药大学
彭吉润 副教授
北京大学人民医院肝胆外科中心
戚中田 教授
中国人民解放军第二军医大学微生物教研室
王鲁 副主任医师
上海复旦大学附属中山医院肝外科肝癌研究所
王庆国 教授
北京中医药大学
王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科
魏来 教授
北京大学人民医院肝病研究所
吴梧桐 教授
中国药科大学生物制药学院
徐克成 教授
深圳市养和医疗中心
徐小元 教授
北大医院感染料
许洪卫 教授
上海同济大学附属铁路医院普通外科
严律南 教授
华西医科大学附属第一医院
杨东亮 教授
武汉华中科技大学同济医学院附属同济医院
杨思凤 教授
中国人民解放军第222医院沈阳军区溃疡病治疗中心
杨希山 教授
广东省中医药局
于颖彦 教授
上海第二医科大学附属瑞金医院消化外科研究所
喻荣彬 副教授
南京医科大学流行病与卫生统计学系
张吉翔 教授
江西医学院第二附属医院
章国良 教授
北京大学医学部基础医学院药理学系