

# SELDI 蛋白指纹技术在肿瘤早期诊断中的应用

张建中, 郑燕华, 冯 凯, 邹德威

张建中, 郑燕华, 冯凯, 邹德威, 中国人民解放军 306 医院 北京市 100101  
全军十五科研基金课题资助项目, No. 01MA071  
项目负责人: 张建中, 100101, 北京市安翔北路 9 号, 中国人民解放军 306  
医院. zhangjz55@sina.com  
电话: 010-66356237 传真: 010-64871261  
收稿日期: 2004-12-01 接受日期: 2004-12-10

## 摘要

血清蛋白组学模式诊断技术是一种新型的蛋白组学平台, 在此平台上通过高维质谱所获得的蛋白指纹图谱可用做疾病的诊断标准. 此技术在早期肿瘤的检测中具有巨大应用前景. 目前发现通过 SELDI 蛋白指纹技术所获得的生物标记物, 大多数是在特异性肿瘤微环境中所产生的低分子质量蛋白碎片. 通过多种肿瘤的检测表明, 其敏感性和特异性均优于传统的肿瘤标记物, 对某些肿瘤的敏感性已达 100%, 特异性也超过 95%, 因而在肿瘤早期诊断和早期预警中具有重要临床应用价值.

张建中, 郑燕华, 冯凯, 邹德威. SELDI 蛋白指纹技术在肿瘤早期诊断中的应用 世界华人消化杂志 2004;12(12):2773-2777  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2773.asp>

## 0 引言

肿瘤早期诊断急需有意义的生物标记物, 但目前能用于临床的此类标记物的敏感性和特异性均达不到早期诊断的要求. 血清蛋白组中低分子质量(<15 ku)蛋白可能包含有大量生物标记物. 在疾病过程中一系列酶解或蛋白水解切割产生了大量蛋白片段, 其中大部分通过肾脏排除, 因此血液中所携带的血清标记物丰度很低, 常规蛋白检测技术很难发现<sup>[1-2]</sup>. SELDI 蛋白指纹技术的出现为癌症早期生物标记物的检测提供了重要工具, 目前已用于多种肿瘤的早期检测和早期诊断研究<sup>[3-11]</sup>, 其敏感性和特异性均在 80% 以上, 其中对卵巢癌的敏感性达 100%(已获美国 FDA 批准用于临床)<sup>[12]</sup>, 远远超过目前任何一种血清学诊断方法, 可能具有广阔的临床应用前景.

## 1 SELDI 蛋白指纹技术的基本原理

SELDI 蛋白指纹技术, 是表面增强激光解吸电离飞行时间质谱分析(surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)的俗称. 所谓“蛋白指纹技术(protein fingerprinting)”是一种形象比喻, 指的是就像每个人的指纹不同于他人一样, 每种疾病发生发展过程中所形成的特定蛋白质组或其

降解产物也不一样, 因此构成了该疾病特征性“蛋白指纹”模式(pattern). 通过这种模式识别, 可达到疾病诊断的目的.

识别和鉴定人类蛋白质组的技术有很多<sup>[13]</sup>, 例如传统的酶联免疫吸附实验(ELISA)、双向电泳技术(2D-PAGE)、激光捕获微切割技术(LCM)、Western blotting 和荧光差异凝胶电泳(differential cell electrophoresis, DIGE)等, 这些技术在蛋白质检测中起到了不同作用, 为基础研究和临床诊断提供了各种有用的指标. 但是此类技术均具有某些缺点和不足, 例如需要大量标本和复杂的蛋白纯化过程. 另外, 有些检测还需要进行染色(如 DIGE), 有的不能将低丰度小分子质量的蛋白区分开(如 2D-PAGE, Western blotting), 从而大大限制了其临床应用范围. SELDI 飞行时间质谱仪的问世为临床蛋白组学开展提供了强有力的工具, 可以克服上述技术所固有的缺陷.

飞行时间质谱仪由蛋白芯片和质谱阅读器及其分析软件组成. 早期的飞行时间质谱为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI 技术), 基质先被分析的蛋白质离子化, 然后再进行质谱分析. SELDI 技术把基质改为以色谱原理设计的蛋白芯片, 增强了分离能力. 我们知道, 蛋白质与 DNA 不同, 前者是三维结构, 制作蛋白芯片最困难的是在不损害其功能和不增加背景的条件下, 在芯片表面通过固定某些蛋白起分离作用. 传统技术很难解决这一问题, 在飞行质谱的检测系统中, 芯片表面经化学(阳离子、阴离子、疏水、亲水和重离子螯合等)或生物化学(抗体、受体、核酸等)处理, 特异性地与被测标本中蛋白结合, 再通过选择性清洗, 获得高分辨率的保留蛋白谱(第一次分离). 当加入能量吸收分子后, 芯片上保留的蛋白形成晶体. 在特异的激光照射下, 晶体发生解离作用, 带电分子在通过电场时加速, 检测仪记录飞行时间的长短. 质量越轻, 相对所带电荷越多, 质荷比(M/Z)越小, 飞行时间越短, 就会被最先地检测到. 信号由高速的模拟数字转换器转换并记录下来, 被测定蛋白质以一系列峰值的形式呈现. 这些特异性波峰即构成了该疾病特有的指纹图谱. SELDI 蛋白指纹图谱中横轴表示蛋白类型, 而纵轴蛋白质的强度和丰度. 单个蛋白在图谱上的位置取决于飞行时间(图1).

因此, SELDI 蛋白指纹技术在吸收传统质谱技术的基础上, 克服了常规蛋白检测技术的一些缺点, 增加了特异性蛋白芯片阅读系统和生物信息学分析软件, 能快速处理、分析大量信息, 至少具有以下特点: (1)

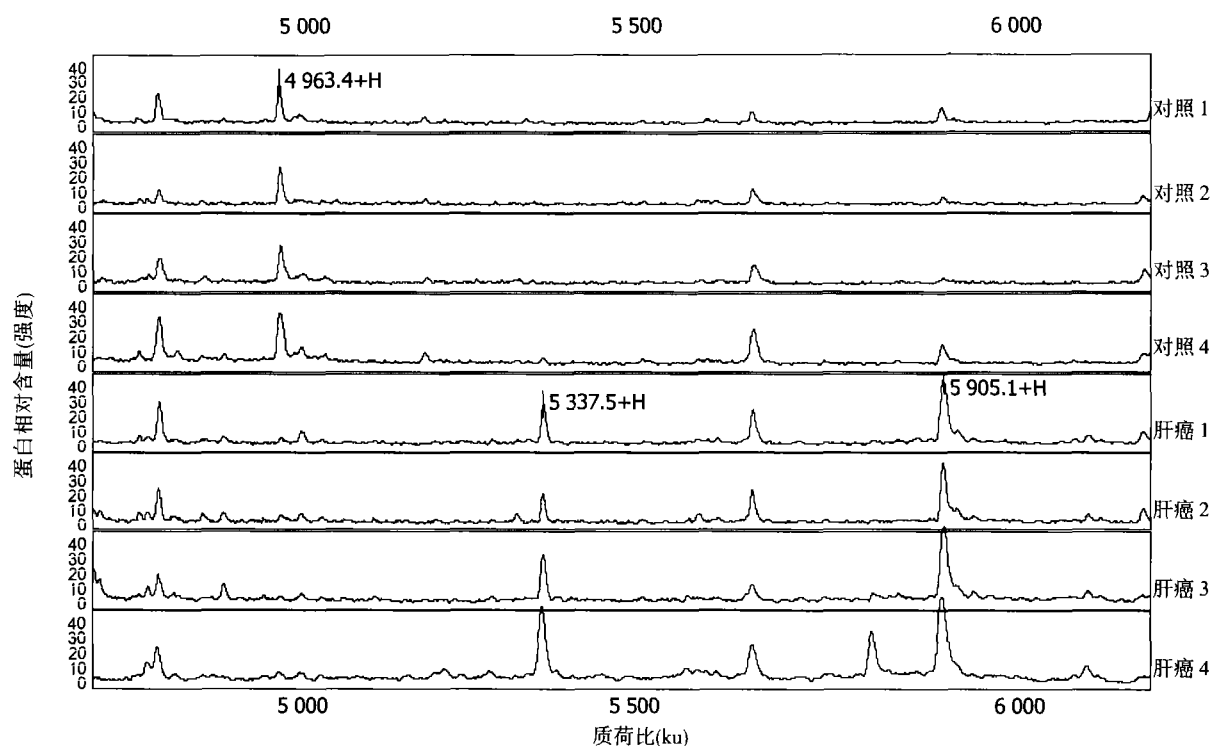


图1 SELDI技术检测肝细胞性肝癌患者血清肿瘤标记物. 图中可以看到正常人对照中4 963.4 u蛋白峰在肝癌中下调或消失, 而肝癌患者中5 337.5 u和5 905.1 u蛋白较正常对照明显上调

待测样本来源广, 不需要特殊处理, 可以直接点样检测, 如血清、尿、组织液等; (2)检测样本用量小且范围广(0.5–400  $\mu$ L)、敏感性高(<1 fmole); (3)小型实验或高通量检测可自由选择, 一次可测8、16、96或192个样品, 可满足临床检测、普查或大样本筛查之需要; (4)可检测蛋白质分子质量范围大(0–500 ku); (5)应用范围广, 如肿瘤的早期诊断、疗效监测、复发早期预警及患者预后评估, 发病机制的探讨, 药物毒理学研究和毒物检测、蛋白质纯化及功能鉴定, 抗原、抗体、受体、配体、底物等检测, DNA、RNA及蛋白质调控研究, 蛋白质甲基化、磷酸化、糖基化研究等; (6)检测快速, 可重复性较好; (7)检测敏感性和特异性较高, 对常见肿瘤的诊断达80–90%以上, 目前其他方法无法比拟. 因此, SELDI蛋白指纹技术在肿瘤等疾病的早期诊断等研究中具有广阔的应用前景.

## 2 SELDI蛋白指纹技术的临床应用

Adam *et al*<sup>[11]</sup>应用SELDI蛋白指纹技术发现前列腺癌患者早在可检测到PSA出现升高的5 a前, 血清中就已检测到前列腺癌特异性蛋白指纹图谱. 自此以来, 人们对该技术在癌症早期诊断和早期预警的应用价值产生了极大的兴趣, 吸引了众多研究者的关注<sup>[14]</sup>. 我们知道, 目前临床上常用的肿瘤标记物均为单一的指标, 而肿瘤是由多基因突变、多步骤发生的异质性非常明显的病变, 单一指标诊断的敏感性和特异性不高是可想而知的; 而SELDI蛋白指纹技术是以整个蛋白质组作为检测对象, 是一种显示疾病过程中多重蛋白质变化的复合图像的模式诊断方法(pattern diagnostics), 理论上其

敏感性和特异性应远远大于单指标的诊断方法, 而且实际应用中也得到了充分验证(表1).

2.1 肝癌 甲胎蛋白(AFP)是目前临床上最常用的肿瘤标记物, 但对于肝癌诊断的敏感性只有43%, 特异性46%. 我们利用SELDI技术发现肝癌患者和正常人的血清蛋白质指纹图谱之间有17个稳定的标志蛋白, 其中有6个标志蛋白在肝癌患者血清中高表达, 11个标志蛋白在肝癌患者血清中低表达(图1). 分析系统筛选出13 752 u及11 472 u标志蛋白建立起一个肝癌的诊断模型, 对肝癌的诊断特异性为97.06%, 灵敏度为91.18%, 及阳性预测率为96.88%. 此结果对肝癌的早期发现、早期治疗无疑具有重要价值. 此外, 在大样本双盲验证实验中我们还遇到个别晚期肝硬化患者亦存有某些肝癌相关性蛋白指纹改变, 此改变是否提示肝硬化癌变的早期信号, 需要进一步密切随访观察来验证.

2.2 卵巢癌 CA125是目前卵巢癌血清学诊断最常用的肿瘤标记物, 但该抗原多在晚期肿瘤患者中才能检测出来, 而I期患者阳性率仅在50%左右. 美国癌症研究所等单位应用SELDI技术对50例卵巢癌、66例非恶性肿瘤患者和63名正常人血清进行检测, 发现卵巢癌的敏感性达100%、特异性95%、阳性预测值94%<sup>[12]</sup>. 提示该技术可用于卵巢癌的早期诊断, 进而大大改善了患者5 a存活率. 在此基础上, Zhang *et al*<sup>[14]</sup>收集了美国4所肿瘤研究所的503份血清样本, 进行盲筛和交叉验证, 从中发现了3种对早期卵巢癌有意义的生物标记物并对其进行纯化鉴定. 使用这三种标记物与CA125联合进行免疫酶联检测, 特异性达97%.

2.3 前列腺癌 前列腺癌是美国男性中最常见的恶性肿

表 1 SELDI 技术检测肿瘤标记物一览表

肿瘤	生物标记物	样本	敏感性(%)	特异性(%)	作者
膀胱癌	5 (7 个蛋白簇)	尿	87	66	Ulahouet <i>et al.</i> , 2001
前列腺癌	9 种	血清	83	97	Adamet <i>et al.</i> , 2002
乳腺癌	3 种	血清	91	91	Liet <i>et al.</i> , 2002
胰腺癌	HIP/PAP-I	胰液	75	87	Rosty <i>et al.</i> , 2002
卵巢癌	8 种	血清	100	95	Petrioinet <i>et al.</i> , 2003
卵巢癌	$\alpha$ -haptoglobin	血清	84	未报	Banderaet <i>et al.</i> , 2003
大肠癌	10 种	血清	97	100	高春芳 <i>et al.</i> , 2003
大肠癌	7 种	血清	83	89	Yuet <i>et al.</i> , 2004
食管癌	12 种	血清	91	86	王英 <i>et al.</i> , 2004
子宫颈癌	7 种	组织匀浆	87	100	Wonget <i>et al.</i> , 2004
肝癌	17 个	血清	91	97	郑燕华 <i>et al.</i> , 2004

瘤之一, PSA 对于前列腺癌的特异性仅为 20–40%, 而许多前列腺肥大患者亦可出现 PSA 升高. 应用 SELDI 技术对前列腺癌患者 9 种特异性蛋白标记物的检测, 可将正常人、良性前列腺肥大和前列腺癌明确区分开, 其敏感性和特异性均在 90% 左右<sup>[9, 15]</sup>. 该技术对于早期前列腺癌的筛查将起到越来越重要的作用.

**2.4 大肠癌** 粪便潜血是最常见的大肠癌早期指征之一, 但仅有 50% 大肠癌和 30% 大肠腺瘤潜血实验阳性; 大肠癌血清标记物 CEA 的敏感性为 60%, 但特异性仅为 23%, 远远不能满足早期诊断的要求. 高春芳 *et al.*<sup>[11]</sup> 利用 SELDI 技术对 62 名正常人和 32 例大肠癌患者进行血清蛋白相对含量的分析, 发现 10 个蛋白在两组中有显著性差异, 对于大肠癌的识别的准确率为 98.3%, 敏感性和特异性分别为 97.3% 和 100%. 陈益定 *et al.*<sup>[22]</sup> 也应用血清蛋白质质谱模型对 55 例大肠癌患者和 92 名正常人进行了检测, 发现对大肠癌的检出率为 82.6%, 排除率为 91.9%. 上述结果表明该技术对于大肠癌的早期检出不论在敏感性还是在特异性均优于传统的诊断技术.

**2.5 胰腺癌** 胰腺癌是肿瘤的第 4 大死因, 在实性肿瘤中预后最差, 归其原因主要是由于早期诊断困难, 只有 10–15% 的患者在发现时是可切除的小肿瘤. 目前尚无可用于胰腺癌筛查的有效方法, 血清学肿瘤标记物 CA19-9 的敏感性和特异性尚不能满足胰腺癌早期诊断的需要. Koopmann *et al.*<sup>[16]</sup> 应用 SELDI 技术对胰腺癌、非恶性肿瘤患者和正常人各 60 例进行筛查, 发现了 2 种血清标记物对于区分胰腺癌与非肿瘤有 97% 的特异性, 明显优于目前临床上使用的任何一种肿瘤标记物. Rusty *et al.*<sup>[23]</sup> 在胰腺癌和胰腺炎患者胰液中发现一种 16 u 蛋白, 命名为肝癌-小肠-胰腺/胰腺炎相关蛋白 I (HIP/PAP-I), 继而证实该蛋白由胰腺腺泡细胞分泌, ELISA 检测发现胰腺癌血清中 HIP/PAP-I 明显增高, 胰液中的 HIP/PAP-I 是血清的 1 000 倍. 因而提示胰液中 HIP/PAP-I 的高表达对胰腺癌具有诊断意义.

**2.6 膀胱癌** Vlahou *et al.*<sup>[17]</sup> 对 94 例膀胱癌患者尿液进行

了质谱分析, 发现了 5 种有意义的差异蛋白, 对于膀胱癌的诊断敏感性为 87%, 特异性为 66%, 他明显优于传统的检测方法, 为膀胱癌的早期诊断提供了一个无创伤的技术平台. Zhang *et al.*<sup>[18]</sup> 应用 SELDI 技术对 46 例移行细胞癌、32 例良性泌尿道疾病患者和 40 名正常人的尿液进行检测, 发现对泌尿道移行细胞癌诊断的敏感性为 84.8%, 而特异性达 91.7%. 因此, 该技术可用于高危人群中膀胱癌的大规模筛查.

**2.7 乳腺癌** Paweletz *et al.*<sup>[19]</sup> 利用 SELDI 技术对乳腺癌和正常女性的乳汁进行了比较, 发现二者蛋白谱系有显著性差异. Li *et al.*<sup>[20]</sup> 在 169 例乳腺癌血清中检测到 3 种蛋白标记物, 对早期乳腺癌诊断的敏感性为 93%, 而特异性也达到 91%.

**2.8 其他肿瘤** Wong *et al.*<sup>[24]</sup> 收集了 62 例宫颈上皮细胞标本、35 例浸润性宫颈癌和 27 名年龄匹配的正常人宫颈标本进行蛋白组学模式分析, 利用在宫颈癌和正常宫颈中差异表达的 7 种蛋白, 建立分类记分系统. 应用该系统对于宫颈癌早期诊断的敏感性为 89%, 特异性 100%, 阳性预测值为 100%, 而阴性预测值为 86%, 因而对于宫颈癌的早期预警特别有价值. Yang *et al.*<sup>[25]</sup> 用 SELDI 技术在子宫内膜癌患者血清中筛查到一种特异性肿瘤标记物 -chaperonin 10, 对于该肿瘤的早期诊断具有重要意义. Wilson *et al.* 在复发性黑色素瘤 (25 例) 和无复发的黑色素瘤 (24 例) 中发现了 3 种差异蛋白表达, 用此指标对原发性黑色素瘤根治切除术后患者的早期复发预测的敏感性和特异性分别为 72% 和 75%, 具有早期预警意义. Lin *et al.*<sup>[26]</sup> 利用 SELDI 技术对滤泡性淋巴瘤组织匀浆进行了肿瘤标记物检测, 发现多种与肿瘤转化有关的蛋白改变, 其中 32.5 ku 蛋白 (cyclin D3) 上调和 11.8 ku 蛋白 (caspase 3) 下调. 因此, 该技术对于阐明肿瘤细胞转化和演进的分子机制亦具有重要价值.

### 3 存在问题与展望

SELDI 技术除在肿瘤早期诊断中的用途外, 在其他疾

病的诊断、疗效检测、发病机制探讨、新药发现和药理学研究、医学鉴定和毒物检测以及基础理论研究等方面亦具有广泛应用。但是,应当指出目前全世界 SELDI 飞行时间质谱仪实验室在质控血清建立及仪器标准化状态、自动化应用等方面存在着不统一的标准,因此,对于 SELDI 发现的生物标记物在用于临床诊断及其干预治疗之前,必须进行严格的多中心和三期临床质控验证,以最大可能的排除实验技术因素所产生的检测误差,进一步提高诊断特异性和预警可靠性。

Ciphergen 公司的高分辨率 SELDI 质谱,或称杂合四极飞行时间质谱仪(QSTAR-TOF-MS)业已投入使用,其分辨率至少可提高 50 倍以上,可将低分辨 SELDI-TOP-MS 检测的宽而顿挫的蛋白波峰分开,使每次实验所产生的信息量大大增加,为小分子质量肿瘤标记物的检测提供了更灵敏的工具,因而也对生物信息学分析软件的研发提出了更高的要求。但高分辨率 QSTAR 质谱仍不能对测出蛋白质直接定性,还需要进行常规的蛋白纯化和鉴定。另外,所获得的蛋白指纹不一定能够直接研发血清免疫检测方法,因为离子的幅度不能直接反映相应标记物的浓度。如果该标记物是一种大蛋白的裂解片段,制备只识别这种裂解片段、而不识别原完整蛋白的抗体是很困难的。可以制备多克隆抗体以结合裂解片段(肿瘤标记物)和完整蛋白,然后再质谱洗脱分离和分析鉴定。

总之,大量的研究已经证明以质谱为基础的蛋白指纹模式诊断有可能成为一种优于以抗体为基础的免疫检测技术。目前的质谱平台敏感性是在飞摩尔( $10^{-15}$ )范围,随着新技术的发展其敏感性会进一步提高。很明显,多种生物标记物组成的诊断模式比单一的标记物包含有更高水平的甄别信息,特别是对于那些异质性明显的广大患者群体更为适合。随着 SELDI 技术不断被大家接受,多家大规模参考实验室已经启动了常规临床诊断应用的探讨协作研究计划(<http://www.questdiagnostics.com>; <http://labcorp.com>)。目前,我们知道绝大多数生物标记物是与大分子循环载体蛋白一体存在的,这一发现使我们对生物标记物分析的注意力转移到了载体蛋白及其生物标记物含量。产生于微环境的蛋白组学模式可能预示着早期病变的存在,这些早期肿瘤标记物或称甄别分子(discriminatory molecules)可能是代谢产物、酶切片段、修饰蛋白、多肽或细胞因子。事实上,最重要的肿瘤标记物可能是某些正常宿主蛋白,这些蛋白发生了异常切割或丰度减低。模式分析考虑到了质谱中某些离子的丢失或获得。过去常规的肿瘤标记物的筛测方法舍弃了那些高丰度大分子“污染”蛋白,而把重点放在低分子质量蛋白上,从而漏掉了大多数具有重要诊断意义的标记物。Petricoin *et al*<sup>[2]</sup>将蛋白质组学与纳米技术结合起来发明了一种新的工具,通过纳米收集递质(nanoharvesting agents)放置在循环中或血液收集器皿中黏附和放大肿瘤标记物,这些纳米颗粒与诊断分子结合物可直接被质谱仪

检出,从而有利于发现那些低分子质量肿瘤标记物的蛋白指纹图谱。

#### 4 参考文献

- 1 Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:1096-1103
- 2 Pitricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOP-based serum proteomic pattern diagnosis for early detection of cancer. *Cur Opin Biotechnol* 2004;15:24-30
- 3 Grizzle WE, Semmes OJ, Basler J, Izbicka E, Feng Z, Kagan J, Adam BL, Troyer D, Srivastava S, Thornquist M, Zhang Z, Thompson IM. The early detection research network surface-enhanced laser desorption and ionization prostate cancer detection study: a study in biomarker validation in genitourinary oncology. *Urol Oncol* 2004;22:337-343
- 4 Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, Rosenzweig JM, Cameron B, Wang YY, Meng XY, Berchuck A, Van Haaften-Day C, Hacker NF, de Bruijn HW, van der Zee AG, Jacobs IJ, Fung ET, Chan DW. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64:5882-5890
- 5 Conrads TP, Hood BL, Issaq HJ, Veenstra TD. Proteomic patterns as a diagnostic tool for early-stage cancer: A review of its progress to a clinically relevant tool. *Mol Diagn* 2004;8:77-85
- 6 Wilson LL, Tran L, Morton DL, Hoon DS. Detection of differentially expressed proteins in early-stage melanoma patients using SELDI-TOF mass spectrometry. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:317-322
- 7 Wang VW, Chan CS, Ng TB, Chung TK, Mok SC. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Lett* 2004;211:227-234
- 8 Fowler LJ, Lovell MO, Izbicka E. Fine-needle aspiration in PreservCyt: a novel and reproducible method for possible ancillary proteomic pattern expression of breast neoplasms by SELDI-TOF. *Mod Pathol* 2004;17:1012-1020
- 9 Cazares LH, Adam BL, Ward MD, Nasim S, Schellhammer PF, Semmes OJ, Wright GL Jr. Normal, benign, preneoplastic and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2002;8:2541-2552
- 10 Menon U, Jacobs I. Screening of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16:469-482
- 11 Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002;62:3609-3614
- 12 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-577
- 13 邹雄. 飞行时间质谱技术的研究趋势及临床应用前景. *中华检验医学杂志* 2004;27:212-214
- 14 赵实诚, 许扬. 蛋白指纹技术在临床医学是应用与研究进展. *中华检验医学杂志* 2004;27:706-709
- 15 Meehan KL, Holand JW, Dawkins HJ. Proteomic analysis of normal and malignant prostate tissue to identify novel proteins lost in cancer. *Prostate* 2002;50:54-63
- 16 Koopmann J, Zhang Z, White N, Ruzenzweig J, Fedarko N, Jagannath S, Canto ML, Yeo CJ, Chan DW, Goggins M. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004;10:860-868
- 17 Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr GL Jr. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001;158:1491-1502
- 18 Zhang YF, Wu DL, Guan M, Liu WW, Wu Z, Chen YM, Zhang

- WZ, Lu Y. Tree analysis of mass spectral urine profiles discriminates transitional cell carcinoma of the bladder from noncancer patient. *Clin Biochem* 2004;37:772-779
- 19 Paweletz CP, Trock B, Pennanen M, Tsangaris T, Magnant C, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Proteomics patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis Marker* 2001;17:301-307
- 20 Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002;48:1296-1304
- 21 高春芳, 赵光, 宋国英, 李冬晖, 王秀丽, 许扬, 马龙华. 用飞行时间质谱仪筛选界直肠癌患者中特异性生物标记物的临床意义. *中华检验医学杂志* 2003;26:658-661
- 22 陈益定, 郑树, 余捷凯, 胡讯. 血清蛋白质质谱模型在大肠癌诊断中的应用. *中华肿瘤杂志* 2004;26:417-420
- 23 Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002;62:1868-1875
- 24 Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Wang VW, Chan CS, Ng TB, Chung TK, Mok SC. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Lett* 2004;211:227-234
- 25 Yang EC, Guo J, Diehl G, DeSouza L, Rodrigues MJ, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW. Protein expression profiling of endometrial malignancies reveals a new tumor marker: chaperonin 10. *J Proteome Res* 2004;3:636-643
- 26 Lin Z, Jenson SD, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. Application of SELDI-TOF mass spectrometry for the identification of differentially expressed proteins in transformed follicular lymphoma. *Mod Pathol* 2004;17:670-678

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

• 封面故事 •

## 中国人民解放军 306 医院肝癌早期诊断课题组简介

2004 年 2 月 306 医院引进美国 Ciphergen 公司生产的 SELDI 飞行时间质谱仪, 开展了肝癌蛋白组学研究, 旨在发现肝细胞性肝癌早期的特异性蛋白组学改变, 为该肿瘤的早期诊断和早期预警提供依据. 目前已经初步建立了肝癌诊断的蛋白组学模型, 并得到较大样本的盲筛验证, 同时对航天员锻炼员模拟失重状态下蛋白组学改变等方面进行了有益的尝试并取得预期结果. 该课题组由院长邹德威少将亲自负责, 由中心实验室组织实施. 目前该实验室有主任医师 1 名、副主任医师 2 名, 博士 2 名、硕士 3 名. 配备有先进的分子生物学、细胞生物学、免疫化学、组织病理学等设备, 承担全军“九五”、“十五”科研课题 4 项, 总装卫生局课题 3 项, 院管课题多项. 近年来发表论文 100 多篇, 获得全军科技成果奖 15 项.

图片说明 中国人民解放军 306 医院早期肝癌蛋白质组学检测课题组.

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

• 消息 •

## 《中国生物学文摘》收录 2009 和世界华人消化杂志

**本刊讯** 经专家评估和遴选, *World Journal of Gastroenterology*(WJG)和世界华人消化杂志被《中国生物学文摘》和中国生物文献数据库收录. 中国生物文献数据库在期刊的基础上开发建设, 数据量已达 20 万多条, 并形成了期刊、光盘、网络版系列产品.《中国生物学文摘》1998 年获得第六次全国科技期刊文献检索出版物评比一等奖.(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)

# 细胞因子基因多态性与肝炎病毒感染的关系

王小众, 陈立

王小众, 陈立, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001  
王小众, 男, 1962-08-13 生, 山东省文登市人, 汉族, 北京大学医学博士, 纽约大学医学院访问医师, 教授, 主任医师, 博士生导师. 现为福建医科大学附属医院和医院副院长, 消化内科主任, 福建省消化系病研究所所长, 《世界华人消化杂志》编委. 主要从事消化系病临床与实验研究.

项目负责人: 王小众, 350001, 福州市新权路 29 号, 福建医科大学附属协和医院消化内科. drwangxz@pub6.fj.cn

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-11-29

## 摘要

细胞因子在抗病毒免疫中发挥重要作用. 细胞因子的基因多态性将影响个体间细胞因子水平的差异, 从而引发个体间对于肝炎病毒感染免疫应答的差异, 最终影响感染后的发病趋势与转归. 本文主要评述肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、转化生长因子  $\beta 1$ 、白介素 -10、白介素 -6、干扰素 - $\gamma$  基因多态性与肝炎病毒感染及预后的关系.

王小众, 陈立. 细胞因子基因多态性与肝炎病毒感染的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2778-2781

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2778.asp>

## 0 引言

肝炎病毒感染临床表现的多样性和复杂性, 除了与病毒因素有关, 还与宿主的遗传因素密切相关<sup>[1]</sup>. 细胞因子在宿主清除病毒的免疫应答当中发挥了重要的作用, 而细胞因子的基因多态性影响了细胞因子的整个转录、翻译和分泌过程, 导致不同人群中细胞因子水平的多样性, 从而导致宿主免疫功能的差异. 现将几种主要的细胞因子多态性与肝炎病毒感染的关系评述如下.

## 1 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 基因多态性与肝炎病毒感染

肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 是一种重要的细胞因子, 具有强有力的多功能免疫调节作用. TNF- $\alpha$  主要由脂多糖 (LPS) 激活的单核巨噬细胞产生, 也可以由 T 细胞、NK 细胞和肥大细胞产生, 可以刺激炎症细胞杀灭病原体, 在病毒感染的发病过程和抗病毒免疫中发挥重要作用. TNF- $\alpha$  基因位于人类第 6 号染色体 HLA-III 类基因区, 介于 HLA-B 和 HLA-DR 之间. TNF- $\alpha$  基因启动子区共有 7 个多态性位点, 分别为 -1031(T/C), -863(C/A), -857(C/T), -376(G/A), -308(G/A), -238(G/A) 和 -163(G/A)<sup>[2-3]</sup>. TNF- $\alpha$  的表达受转录和转录后水平控制. TNF- $\alpha$  基因启动子区 -308 位点 G  $\rightarrow$  A 的转换与 TNF- $\alpha$  的转录水平升高相关<sup>[4]</sup>, 而 -863 位点 C  $\rightarrow$  A 的转换则与 TNF- $\alpha$  的转录水平的降低和低水平的血清 TNF- $\alpha$  相

关<sup>[5]</sup>. Kim *et al*<sup>[6]</sup> 研究发现 TNF- $\alpha$  基因启动子区 -308 位点 A 等位基因的出现或 -863 位点 A 等位基因的缺失与 HBV 感染的结局密切相关. -308 位点 A 等位基因的出现与 HBV 清除和保护性抗体的出现显著相关, 慢性 HBV 感染者 -863 位点 A 等位基因的出现频率显著高于自发性 HBV 清除者. 已有研究表明 HLA-DRB1\*13 与 HBV 感染后的病毒清除相关<sup>[7-8]</sup>. TNF- $\alpha$  基因 -863 C 等位基因并不与 HLA-DRB1\*13 连锁不平衡, 提示 TNF- $\alpha$ -863 C 等位基因的保护作用不是由 HLA-DRB1\*13 引起的; 而 TNF- $\alpha$  基因 -308 位点 A 等位基因则与 HLA-DRB1\*13 存在连锁不平衡, 因此究竟是 TNF- $\alpha$ -308 A 还是 HLA-DRB1\*13 起保护作用还不清楚, 可能二者都对 HBV 感染的结局起独立作用. 单元型也与病毒清除显著相关, 单元型 1[-1031T/-863C/-857C/-308G/-238G/-163G] 与保护性抗体产生相关; 单元型 2[-1031C/-863A/-857C/-308G/-238G/-163G] 则与持续性 HBV 感染相关. Hohler *et al*<sup>[9]</sup> 研究分析了 71 个慢性 HBV 感染患者, 32 例急性自限性感染患者和 99 名健康对照者. 结果发现慢性 HBV 感染患者中 18 个 -238 位点出现 A 变异 (18/71, 25%) 而急性自限性感染患者中有 2 个 (2/32, 6%) ( $P < 0.04$ ), 健康对照组只有 7 个 (7/99, 7%) ( $P < 0.003$ ). 而 -308 位点的变异在各组中相似. 这种差异无法用 HLA-B 或 DRB-1 等位基因连锁不平衡来解释, 提示在 TNF- $\alpha$ -238 位点的多态性与慢性 HBV 感染的发展相关. 这个启动子变异似乎与病毒清除缺陷相关. Lu *et al*<sup>[10]</sup> 研究却发现汉族慢性 HBV 感染患者 TNF- $\alpha$ -238 G 等位基因频率显著高于自限性 HBV 感染者. 出现二者结论的矛盾可能是由种族差异造成的. Thio *et al*<sup>[11]</sup> 研究发现在美国黑人中 TNF- $\alpha$  基因 -863 位点的单核苷酸多态性 (SNP) 与病毒清除相关, -863A/-308G 单元型与病毒的持续感染相关. Rosen *et al*<sup>[12]</sup> 研究发现慢性 HCV 感染者中带有 -238A 等位基因的患者在治疗前的病毒载量  $[(7.2 \pm 4.2) \times 10^9 \text{ copies/L}]$  高于带有 -238G 等位基因的患者  $[(3.8 \pm 0.34) \times 10^9 \text{ copies/L}]$  ( $P = 0.03$ ). 顾绍庆 *et al*<sup>[13]</sup> 研究发现 TNF- $\alpha$  基因 -238 位点 A 等位基因与 HBV 宫内感染的易感性相关, HBV 宫内感染组 TNF- $\alpha$  基因 -238 位点 A 等位基因频率显著高于 HBV 宫内未感染组和对照组, HBV 宫内未感染组和对照组之间无显著差异. 多数研究并未发现慢性 HCV 感染者与健康对照者之间在 TNF- $\alpha$  基因 -238 和 -308 位点等位基因突变的频率有显著的差异<sup>[6, 14-16]</sup>. 研究并未发现 TNF- $\alpha$  基因多态性与肝脏疾病的严重程度之间存在相关性<sup>[12]</sup>. 但 Yee *et al*<sup>[17]</sup>

研究发现TNF- $\alpha$ 基因-238位点和-308位点发生变异者(G $\rightarrow$ A)发生肝硬化的危险分别是未发生变异者的3.2倍和5.1倍. 多数研究并未发现在TNF- $\alpha$ 基因多态性与干扰素或干扰素和利巴韦林联合的治疗应答存在相关<sup>[12, 15-16]</sup>.

## 2 转化生长因子 $\beta_1$ 基因多态性与肝炎病毒感染

转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )由抗原激活的T细胞和LPS激活的单核巨噬细胞分泌, 可引起肝星状细胞激活和细胞外基质沉积, 在肝纤维化过程中发挥重要作用. 人的TGF- $\beta_1$ 基因位于染色体19q13, 具有多个多态性位点, 包括启动子区-988, -800和-509位点、非翻译区+72位点以及编码区密码子10, 25位点<sup>[12]</sup>. 密码子25位点的变异导致其编码的氨基酸由精氨酸(Arg)转换为脯氨酸(Pro), 而密码子10位点的变异导致其编码的氨基酸由亮氨酸(Leu)转换为脯氨酸(Pro). 体外实验表明TGF- $\beta_1$ 的产量与TGF- $\beta_1$ 基因多态性相关, 在体外刺激外周血单个核细胞(PBMC)后, TGF- $\beta_1$ 基因密码子25位点Arg/Arg纯合子基因型的患者TGF- $\beta_1$ 的产量高于Arg/Pro基因型的患者<sup>[18]</sup>. Powell *et al*<sup>[19]</sup>研究发现TGF- $\beta_1$ 密码子25的基因多态性与肝纤维化程度显著相关. 密码子25位点Arg/Arg纯合子基因型的患者肝纤维化程度高于带有Arg/Pro或Pro/Pro基因型的患者. Gewaltig *et al*<sup>[20]</sup>研究显示TGF- $\beta_1$ 基因多态性与HCV感染所致肝纤维化进展速度相关. 密码子10和/或25出现Pro显著加快肝纤维化进展速度. 密码子25位点Arg/Pro基因型者比Arg/Arg基因型者纤维化进展显著加快, 密码子10位点Leu/Pro和Pro/Pro基因型者发生纤维化的速度也比Leu/Leu基因型者快3倍. 密码子25位点Arg/Pro基因型者纤维化的等级高于Arg/Arg基因型者, 同样密码子10位点Leu/Pro基因型者的平均纤维化等级也高于Leu/Leu基因型者. 肝纤维化者密码子25位点Arg/Pro基因型频率比对照组高3倍, 而Arg/Arg基因型低于对照组. Tag *et al*<sup>[21]</sup>研究也发现在慢性HCV感染患者中, 严重纤维化患者密码子25位点Pro的出现频率比中度纤维化患者频率高2倍. TGF- $\beta_1$ 基因多态性还与慢性HBV感染患者发生肝癌的风险相关. Kim *et al*<sup>[22]</sup>研究发现TGF- $\beta_1$ -509位点T/T或C/T基因型者发生肝癌的风险低于C/C基因型者, 密码子10位点Pro/Pro或Leu/Pro基因型者发生肝癌的风险低于Leu/Leu基因型者, TGF- $\beta_1$ [-509C/T; Leu10Pro]单元型者发生肝癌的可能性降低.

## 3 白介素-10基因多态性与肝炎病毒感染

白介素-10(IL-10)是一种很强的抗炎症细胞因子, 主要由巨噬细胞产生, 能抑制前炎症因子(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12)的产生和单核/巨噬细胞的抗原递呈功能, 是细胞免疫的潜在抑制者<sup>[23]</sup>. 人IL-10基因位于第1号染色体, IL-10基因启动子区具有高度多态性, 包括3个突变位点-1082(G/A), -819(C/T),

-592(C/A)以及2个微卫星重复序列IL-10.G和IL-10.R, 并产生3种不同的单元型GCC, ATA, ACC<sup>[23]</sup>. IL-10启动子区多态性与IL-10的产量有关. 体外实验表明, PBMC经刀豆蛋白A(ConA)刺激后, 带有GCC/GCC单元型者IL-10的产量最高, 带有GCC/ACC、ACC/ATA基因型者其次, 而带有ATA/ATA、ACC/ATA、ACC/ACC单元型者IL-10产量最低<sup>[24]</sup>.

Knapp *et al*<sup>[25]</sup>研究发现HCV自限性感染与IL-10(-592A/A)基因型相关, 而持续性感染则与IL-10(-1082G/G)基因型相关. Mangia *et al*<sup>[26]</sup>研究发现IL-10 ATA单元型在HCV自发性清除患者中的频率(36.0%)高于持续性感染患者(23%). Miyazoe *et al*<sup>[27]</sup>研究发现IL-10基因启动子区-819T和-592A等位基因以及-1082/-819/-592位点ATA单元型在慢性无症状HBV感染者中的频率显著高于慢性进展性肝病患者, GCC单元型在慢性无症状HBV感染者中的频率显著低于慢性进展性肝病患者. 提示IL-10高产量者发生慢性肝病进展的机会更大, 这似乎与IL-10具有抗炎症和抗纤维化的作用相反. 高IL-10产量将抑制细胞免疫功能, 导致病毒复制活跃. 多数研究并未发现慢性HBV或HCV感染者IL-10-1082, -819, -592位点等位基因的分布频率与正常人之间有显著差别<sup>[19, 28-30]</sup>. 提示IL-10基因多态性对肝炎病毒感染的影响主要是以基因型或单元型的方式出现, 而不是单核苷酸多态性. IL-10基因多态性可以作为抗病毒治疗效果的预测因子. Edward-Smith *et al*<sup>[24]</sup>研究发现IL-10启动子-592A和-819T等位基因或ATA单元型与干扰素治疗应答显著相关, GCC单元型与干扰素治疗无应答显著相关. Yee *et al*<sup>[31]</sup>研究发现IL-10-592A和-819T单核苷酸多态性和-592A/A和-819T/T基因型频率在干扰素- $\alpha$ 和利巴韦林联合抗病毒治疗持久应答组显著高于无应答组, -592A/A和-819T/T纯合子基因型与持久应答显著相关. 但Knapp *et al*<sup>[25]</sup>的研究却发现对干扰素的持续应答与IL-10(-1082)GG基因型和GCC单元型相关. 与Edward-Smith的结论矛盾可能是由于样本数不同引起的, Edward-Smith的研究样本较小( $n=53$ ), 发生II类错误的机会增加. IL-10基因多态性也与肝癌发生相关. Shin *et al*<sup>[32]</sup>研究发现IL10单元型之一, IL-h2(-1082A/-819C/-592C/+117T), 以剂量依赖的方式与肝细胞癌发生密切相关. 在肝癌患者中易感的IL-h2频率增高, 在从慢乙肝进展到肝硬化、肝癌的易感乙肝患者中, IL-h2的频率显著增高. 另外, 生存分析清晰的显示, 在携带IL10-h2基因的慢性乙型肝炎患者中发生肝细胞癌的年龄提早. IL10-h2基因介导IL-10产量增加提示IL-10的上调可加快慢性HBV感染的进展, 特别是肝细胞癌的进展.

## 4 白介素-6基因多态性与肝炎病毒感染

白介素-6(IL-6)主要由单核巨噬细胞、血管内皮细胞和T细胞(主要是Th2细胞)产生, 是炎症反应的重要因



子,可作为急性期反应因子,参与肝组织免疫病理反应和炎症过程,导致肝组织损伤。IL-6基因位于第7号染色体,IL-6基因启动子区具有4个多态性位点,分别(-597G/A, -572G/C, -373A/Tn, -174G/C),并组成8种不同的单元型(AG8/12C, GG10/11G, GG9/11G, GG10/10G, GC10/10G, AG8/12G, GG10/11G, GG9/11C)<sup>[33]</sup>。IL-6的基因转录受到启动子区多态性位点单元型的影响<sup>[33]</sup>。-174位点G/G和G/C基因型者血清IL-6水平显著高于C/C基因型者<sup>[34]</sup>。Barrett *et al*<sup>[30]</sup>研究发现IL-6基因多态性与HCV感染结局相关。HCV感染的清除与低IL-6产量(-174C/C基因型)相关,而HCV持续性感染则与高IL-6产量(-174G/G或G/C基因型)相关。而Park *et al*<sup>[35]</sup>研究发现IL-6基因多态性并不影响慢性HBV感染向肝硬化和肝癌的进展。在慢性乙型肝炎患者与肝硬化者之间以及HBV感染所致的肝癌患者与慢性HBV感染的非肝癌患者间,IL-6基因-572 G/C基因型分布频率没有差别。

## 5 干扰素- $\gamma$ 基因多态性与肝炎病毒感染

干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )由活化的T细胞和NK细胞产生,具有抗病毒和免疫调节功能。IFN- $\gamma$ 基因位于人类第12号染色体,含4个外显子和3个内含子。IFN- $\gamma$ 基因具有6个多态性位点,分别位于启动子区-183和-155位点<sup>[36]</sup>,内含子1 +874位点<sup>[37]</sup>,内含子3 +2109和+3810位点以及3'端非翻译区+5134位点<sup>[38]</sup>。IFN- $\gamma$ 基因多态性位点通过改变转录因子结合位点影响IFN- $\gamma$ 表达<sup>[37-38]</sup>。体外实验表明,IFN- $\gamma$ 的产量与+874位点T/A等位基因多态性相关。A/A基因型者IFN- $\gamma$ 产量显著低于A/T或T/T基因型者<sup>[39]</sup>。Ben-Ari *et al*<sup>[28]</sup>研究发现IFN- $\gamma$ 基因+874位点分布频率在慢性HBV感染患者与对照组之间有显著差别。大多数慢性HBV感染患者(65.2%)显示了产生低水平IFN- $\gamma$ 的能力(A/A基因型),对照组只有37.5%,而急性HBV感染后恢复的健康个体的IFN- $\gamma$ 基因多态性分布与健康对照组相似。在HBV低水平和高水平复制的慢性HBV感染患者之间以及代偿和失代偿慢性HBV感染患者之间,IFN- $\gamma$ 的产量没有差别。提示产生低水平IFN- $\gamma$ 的遗传能力与慢性HBV感染的易感性相关。Ben-Ari *et al*<sup>[40]</sup>研究还发现IFN- $\gamma$ 基因多态性与肝移植后丙肝复发相关。80%的未复发患者具有产生高水平IFN- $\gamma$ 的能力(T/T基因型),20%具有产生中等水平的IFN- $\gamma$ 的能力,没有产生低水平IFN- $\gamma$ 者(A/A基因型)。相反,在复发HCV感染者中,只有3.3%可以产生高水平的IFN- $\gamma$ ,而多数产生低水平的IFN- $\gamma$ (41.9%)和中等水平的IFN- $\gamma$ (54.8%)。在早期复发者(<12 mo)和晚期复发者之间IFN- $\gamma$ 基因多态性分布也有显著差别(可能与样本大小有关)。早期复发者中47.6%的患者具有产生低和中等水平IFN- $\gamma$ 的能力。而在晚期复发者中60%具有产生中等水平IFN- $\gamma$ 能力,10%具有产生高水平IFN- $\gamma$ 能力。俞蕙 *et al*<sup>[41]</sup>研究发现IFN- $\gamma$ +874基因多态性与宫内

HBV感染有关。宫内HBV感染组IFN- $\gamma$ +874A/A、A/T和T/T基因型分布频率分别为67.4%、19.6%和13.0%;正常免疫组A/A、A/T和T/T基因型分布频率分别为45.2%、30.1%和24.7%。两组IFN- $\gamma$ +874基因型的分布频率差异有显著性( $\chi^2=5.102$ ,  $P<0.05$ )。宫内HBV感染儿童IFN- $\gamma$ +874A/A基因型占优势。提示IFN- $\gamma$ +874基因多态性可能在决定个体宫内HBV感染遗传易感性方面有一定意义。

目前基因多态性研究已经成为肝病研究领域的热点,对于从遗传学角度和分子水平研究肝炎病毒感染的发病机制、疾病易感性、病毒感染谱的多样性以及制定肝病个体化治疗方案等方面有重要意义。进行基因多态性研究必须注意到所研究基因多态性分布的种族和地域差异以及等位基因连锁不平衡现象,才能更全面地评价基因多态性的作用。

## 6 参考文献

- 1 Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:641-644
- 2 Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, Itoh K. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51:605-612
- 3 Juszczynski P, Kalinka E, Bienvenu J, Woszczek G, Borowiec M, Robak T, Kowalski M, Lech-Maranda E, Basseggio L, Coiffier B, Salles G, Warzocha K. Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. *Blood* 2002;100:3037-3040
- 4 Kroeger KM, Carville KS, Abraham TJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-399
- 5 Skoog T, van't Hooft FM, Kallini B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphisms (C  $\rightarrow$  A substitution at position -863) in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum Mol Genet* 1999;8:1443-1449
- 6 Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of TNF- $\alpha$  promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet* 2003;12:2541-2546
- 7 Thursz M. Genetic susceptibility in chronic viral hepatitis. *Antiviral Res* 2001;52:113-116
- 8 Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. HLA-DRB1\*1301 and \*1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997;26:503-507
- 9 Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998;111:579-582
- 10 Lu LP, Li XW, Liu Y, Sun GC, Wang XP, Zhu XL, Hu QY, Li H. Association of -238G/A polymorphism of tumor necrosis factor-alpha gene promoter region with outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *World J Gastroenterol* 2004;10:1810-1814
- 11 Thio CL, Goedert JJ, Mosbrugger T, Vlahov D, Strathdee SA, O'Brien SJ, Astemborski J, Thomas DL. An analysis of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms and haplotypes with natural clearance of hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2004;5:294-300



- 12 Rosen HR, McHutchison JG, Conrad AJ, Lentz JJ, Marousek G, Rose GL, Zaman A, Taylor K, Chou S. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:714-720
- 13 顾绍庆, 朱启镡, 俞蕙, 费林娥, 董左权, 浦东坡. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  基因多态性与乙型肝炎病毒宫内感染易感性的关系. *中华肝脏病杂志* 2004;12:538-539
- 14 Tokushige K, Tsuchiya N, Hasegawa K, Hashimoto E, Yamauchi K, Komatsu T, Hayashi T. Influence of TNF gene polymorphism and HLA-DRB1 haplotype in Japanese patients with chronic liver disease caused by HCV. *Am J Gastroenterol* 2003;98:160-166
- 15 Schiemann U, Glas J, Torok P, Simperl C, Martin K, Konig A, Schmidt F, Schaefer M, Folwaczny C. Response to combination therapy with interferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C according to a TNF-alpha promoter polymorphism. *Digestion* 2003;68:1-4
- 16 Yu ML, Dai CY, Chiu CC, Lee LP, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Chen CJ, Chuang WL, Chang WY. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Antiviral Res* 2003;59:35-40
- 17 Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2000;1:386-390
- 18 Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998;66:1014-1020
- 19 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:828-833
- 20 Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2002;316:83-94
- 21 Tag CG, Mengsteab S, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, Weiskirchen R. Analysis of the transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with chronic hepatitis C infection. *Cytokine* 2003;24:173-181
- 22 Kim YJ, Lee HS, Im JP, Min BH, Kim HD, Jeong JB, Yoon JH, Kim CY, Kim MS, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Exp Mol Med* 2003;35:196-202
- 23 Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-269
- 24 Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526-530
- 25 Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, Goldin R, Hill AV, Thomas HC, Thursz MR. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics* 2003;55:362-369
- 26 Mangia A, Santoro R, Piattelli M, Pazienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. *Cytokine* 2004;25:103-109
- 27 Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsuhashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2086-2092
- 28 Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambur AR, Tur-Kaspa R, Klein T. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2003;98:144-150
- 29 Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME, Donaldson PT. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 2002;22:404-412
- 30 Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crow J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003;71:212-218
- 31 Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2001;33:708-712
- 32 Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Kim JY, Yoon JH, Kim YJ, Lee HS. Interleukin-10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet* 2003;12:901-906
- 33 Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:18138-18144
- 34 Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The Effect of Novel Polymorphisms in the Interleukin-6 (IL-6) Gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376
- 35 Park BL, Lee HS, Kim YJ, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Shin HD. Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. *Exp Mol Med* 2003;35:76-82
- 36 Chevillard C, Henri S, Stefani F, Parzy D, Dessein A. Two new polymorphisms in the human interferon gamma (IFN-gamma) promoter. *Eur J Immunogenet* 2002;29:53-56
- 37 Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863-866
- 38 Henri S, Stefani F, Parzy D, Eboumbou C, Dessein A, Chevillard C. Description of three new polymorphisms in the intronic and 3'UTR regions of the human interferon gamma gene. *Genes Immun* 2002;3:1-4
- 39 Lopez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C. Interferon- $\gamma$  and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:970-975
- 40 Ben-Ari Z, Pappo O, Druzd T, Sulkes J, Klein T, Samra Z, Gadba R, Tambur AR, Tur-Kaspa R, Mor E. Role of cytokine gene polymorphism and hepatic transforming growth factor beta1 expression in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Cytokine* 2004;27:7-14
- 41 俞蕙, 朱启, 顾绍庆, 费林娥, 浦东坡. IFN- $\gamma$  + 874 基因单核苷酸多态性与宫内 HBV 感染易感性关系的研究. *中华儿科杂志* 2004;42:421-423

# 胃癌同证型中肿瘤转移相关基因蛋白的表达

许玲, 孙大志, 何金, 刘龙, 魏品康

许玲, 孙大志, 刘龙, 魏品康, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科 上海市 200003  
何金, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科 上海市 200003  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271626  
项目负责人: 许玲, 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中医科. czzyk@smmu.edu.cn  
电话: 021-63610109-73406  
收稿日期: 2004-07-23 接受日期: 2004-08-25

## Expression of tumor metastasis-related gene protein in the same syndromic classification of gastric carcinoma on traditional Chinese medicine

Ling Xu, Da-Zhi Sun, Jin He, Long Liu, Pin-Kang Wei

Ling Xu, Da-Zhi Sun, Long Liu, Pin-kang Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China  
Jin He, Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271626  
Correspondence to: Dr. Ling Xu, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. czzyk@smmu.edu.cn  
Received: 2004-07-23 Accepted: 2004-08-25

## Abstract

AIM: To explore the entity of gastric carcinoma under the same syndromic classification based on traditional Chinese medicine from the angle of gene protein expression.

METHODS: Patients with gastric carcinoma were collected and then classified before operation according to dialectic criterion of traditional Chinese medicine. Samples of gastric carcinoma from all the patient were collected after operation. EnVision two step immunohistochemical method was used to observe the expression of E-cadherin, C-erbB-2, P53, nm23, ICAM-1, VEGF, KDR, MMP-2, TIMP-2 in the cancerous samples.

RESULTS: The preceding 9 gene proteins were differently expressed in each type. There was significant difference ( $P = 0.001 < 0.01$ ) in the expression of the 9 gene proteins between different syndromic types. Several genes had different expression in the same syndromic type. The rates of VEGF, E-cad, nm23 expression were higher (94%, 90% and 92% respectively) than other proteins. E-cad expression in the stagnation of phlegm-damp type is the highest expression (average rank = 63.09). E-cad expression was lower in the types of the stasis and endogenous toxics and the discordance of liver-stomach.

CONCLUSION: Metastasis of gastric carcinoma in the types of the stasis and endogenous toxics and the discordance

of liver-stomach may relate to the loss of E-cadherin expression. However, both cancer gene and anti-oncogene are expressed at a high level in the two types.

Xu L, Sun DZ, He J, Liu L, Wei PK. Expression of tumor metastasis-related gene protein in the same syndromic classification of gastric carcinoma on traditional Chinese medicine. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(12):2782-2787

## 摘要

目的: 从基因蛋白表达层次探索胃癌中医证本质。

方法: 从第二军医大学长征医院普外科收集术前胃癌患者, 并按中医辨证分型标准将其归属; 取术后肿瘤标本, 用免疫组化方法检测胃癌肿瘤中 E-Cadherin、C-erbB-2、P53、nm23、ICAM-1、VEGF、KDR、MMP-2、TIMP-2 9 种基因蛋白表达情况。

结果: 每个证型中的 9 个基因蛋白之间均有不同表达, 统计学分析表明 6 证型的 9 个基因蛋白表达均有显著性差异  $P = 0.001$ , 进一步两两比较示同一证型内部多组基因都存在表达差异性; VEGF、E-cad、nm23 表达率较高, 分别为 94%、90%、92%。痰湿凝滞型中 E-cad 的蛋白表达最高, 以平均秩和表示为: 63.09, 肝胃不和、■ 毒内阻两型 E-cad 表达较低。

结论: 肝胃不和、■ 毒内阻两型胃癌发生转移可能主要与 E-cad 的缺失有关, 但内部既有癌基因的高表达亦有抑癌基因高表达。

许玲, 孙大志, 何金, 刘龙, 魏品康. 胃癌同证型中肿瘤转移相关基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2782-2787  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2782.asp>

## 0 引言

胃癌是常见的恶性肿瘤, 当前的诊治状况是一高三低, 即发病率高、早诊断率低, 手术切除率低、5a 生存率低。由于患者临床确诊时大多已为进展期胃癌, 故术后内科综合治疗对提高生存率, 减少转移复发, 改善生活质量显得尤为重要。但许多西药或治疗方案在临床应用时也遇到不敏感人群, 或毒副作用过强患者; 因此包括国家相关医疗机构等开始呼吁, 希望重视“个体化医疗”这个问题<sup>[1]</sup>。这正符合中医“辨证论治”原则。然而目前中医对疾病的认识多是宏观的概括, 尚不能深入探求其本质内涵, 这从某种程度上限制了中医药的发展。此研究项目即从肿瘤相关基因 E-cadherin,

C-erbB-2, P53, nm23, ICAM-1, VEGF, KDR, MMP-2, TIMP-2 的蛋白表达上探求中医证本质内涵.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌 100 例来源于第二军医大学长征医院普外科. 我院病理科联系, 收集胃癌标本, 蜡块备用. 辨证标准按照 1978 年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的六型分法辨证. (1)肝胃不和型: 主症为胃脘胀满, 时时隐痛, 窜及两胁, 呃逆呕吐, 脉沉或弦细, 舌质淡红, 苔薄白或薄黄; (2)脾胃虚寒型: 主症为胃脘隐痛, 喜按喜温, 或朝食暮吐, 暮食朝吐, 面色苍白, 肢冷神疲, 便溏浮肿, 舌淡而胖, 苔白滑润, 脉沉缓; (3)瘀毒内阻型: 主症为胃脘刺痛, 心下痞硬,

吐血便黑, 皮肤甲错, 舌质暗紫, 脉沉细涩; (4)胃热伤阴型: 主症为胃内灼热, 口干欲饮, 胃脘嘈杂, 食后脘痛, 五心烦热, 大便干燥, 食欲不振, 脉弦细数, 舌红少苔, 或苔黄少津; (5)痰湿凝结型: 主症为胸闷膈满, 面黄虚肿, 呕吐痰涎, 腹胀便溏, 痰核累累, 舌淡红, 苔滑腻; (6)气血双亏型: 主症为全身乏力, 心悸气短, 头晕目眩, 面色无华, 虚烦不寐, 自汗盗汗, 甚至阴阳两虚, 脉沉细无力, 舌淡苔薄. 本组胃热伤阴、瘀毒内阻各 16 例, 痰湿凝结、气血双亏、肝胃不和、脾胃虚寒各 17 例. 男 69 例, 女 31 例; 年龄 < 40 岁 7 例, > 40 岁 93 例. 胃热伤阴型中有 1 例不能明确是否有远处转移, 临床分期亦无法确定(表1). E-cad: 小鼠抗人 E-cad 蛋白一抗, C-erbB-2: 兔抗人 C-erbB-2 蛋白

表 1 100 例胃癌患者一般情况表

分析因素		胃癌辨证分型						合计
		肝胃不和	脾胃虚寒	瘀毒内阻	胃热伤阴	痰湿凝结	气血双亏	
年龄	<40	1	1	2	0	3	0	7
	≥40	16	16	14	16	14	17	93
性别	男	12	12	12	9	13	11	69
	女	5	5	4	7	4	6	31
病理	腺癌	12	13	11	15	14	14	79
分型	黏液腺癌	3	2	3	1	0	3	12
	印戒细胞癌	1	2	1	0	3	0	7
	间质瘤细胞瘤	1	0	1	0	0	0	2
	恶性淋巴瘤	0	0	0	0	0	0	0
腺癌	I	1	0	1	1	2	0	5
	II	10	11	3	11	2	8	45
	II-III	1	1	1	1	2	1	7
	III	5	5	11	3	9	7	40
	IV	0	0	0	0	2	1	3
浸润	1	5	0	1	1	2	0	9
程度	2	3	7	4	5	4	3	26
	3	6	9	8	8	5	7	43
	4	3	1	3	2	6	7	22
	0	7	8	6	5	8	7	41
淋巴结转	0	7	8	6	5	8	7	41
移情况	1	5	5	7	4	4	3	28
	2	5	4	3	7	5	7	31
远处	0	13	15	14	13	14	15	84
转移	1	4	2	2	2	3	2	15
临床	I	6	5	4	3	5	3	26
	II	4	4	3	4	3	1	19
	III <sub>a</sub>	1	3	4	3	2	5	18
	III <sub>b</sub>	3	4	2	4	2	4	19
	IV	3	1	3	2	5	4	18
肿瘤	肿块形	2	4	2	0	1	6	15
形状	溃疡形	10	5	7	7	11	6	46
	溃疡型肿块	4	8	6	7	3	5	33
	局部黏膜病变	1	0	1	1	2	0	5
	革状胃	0	0	0	1	0	0	1

一抗, MMP-2:鼠抗人 MMP-2 蛋白一抗, TIMP-2: 鼠抗人 TIMP-2 蛋白一抗, KDR: 兔抗人蛋白一抗和 p53: 兔抗人 p53 蛋白一抗购自福州迈新生物技术开发公司; nm23: 鼠抗人 nm23 蛋白一抗, 购自上海长岛生物技术有限公司; 6.0 mL, 编号: MAB-0244, 购自福州迈新生物技术开发公司; 6.0 mL, 编号: MAB-0244, 购自福州迈新生物技术开发公司; ICAM-1: 鼠抗人 ICAM-1 蛋白一抗, 购自上海长岛生物技术有限公司; VEGF: 鼠抗人 VEGF 蛋白一抗, 购自上海长岛生物技术有限公司. 免疫组化 EnVision 试剂盒购自 DAKO 公司.

1.2 方法 免疫组化采用EnVision二步法. 具体流程如下: 人胃癌肿瘤标本石蜡连续切片 4  $\mu$ m 厚, 30 mL/L 过氧化氢甲醇溶液浸泡 15 min 以封闭内源性过氧化物酶, 放入高压锅中进行抗原修复. 加入非免疫性小牛血清 37  $^{\circ}$ C 20 min, 甩去血清, 加入浓缩型第一抗体 E-cadherin, ICAM-1(稀释 50 倍)50  $\mu$ L; C-erbB-2, P53, nm23, VEGF, KDR, MMP-2, TIMP-2 50  $\mu$ L 4  $^{\circ}$ C 过夜; PBS 液冲洗 3 次, 每次 2 min; 加入 EnVision 50  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 2 h; PBS 液冲洗 3 次, 每次 2 min; 加 DAB 显色液 50  $\mu$ L, 显微镜下观察 3-10 min; 苏木素复染 2 min; 自来水冲洗; 10 mL/L 盐酸酒精分化、温水中浸洗返蓝、逐级酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片、读结果. 在做 VEGF 时抗原修复用 EDTA 40 mL 加入 2 000 mL 蒸馏水中, 水煮开后将片子放入开水中(不用高压)煮 20 min, 余与其他 8 个免疫组化实验流程同. 阳性为棕色, 以任意 5 个高倍镜视野中阳性显色作为评定依据. 浅棕色(+), 棕黄色(++), 深棕色(+++). 免疫组化着色按其强弱分为

(-), (+), (++) , (+++) 分别给予分值为 0, 1, 2, 3 分; 细胞表达数 0, 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%, 分别给予分值为 0, 1, 2, 3, 4 分; 将每一标本的两个分值相乘, 作为结果.

**统计学处理** 各证型组之间比较采用 SAS 统计软件包, 非正态分布资料用完全随机化设计资料的非参数 kruskal-Wallis H 检验进行数据处理和分析, 两两比较采用 Nemenyi test.

## 2 结果

在 100 例标本中 9 种肿瘤相关基因蛋白皆有表达(图 2-10), 其中 VEGF, E-cad, nm23 表达率较高, 分别为 94%, 90%, 92%; 而 MMP-2, TIMP-2 及 ICAM-1 的表达相对较低, 分别为 17%, 39%, 58%. (图 1). 同证型内整体上皆存在显著性差异,  $P=0.0001(P<0.01)$ , 进一步两两比较发现同一证型内普遍存在基因蛋白表达差异性(表 3), 尤其重要的是发现痰湿凝结型中 E-cad 的表达最高, 以平均秩和表示为: 63.09, 而肝胃不和(图 2D-E)、瘀毒内阻(图 1-2)两型 E-cad 表达较低, 以平均秩和表示分别为: 34.09, 35.50(表 2).

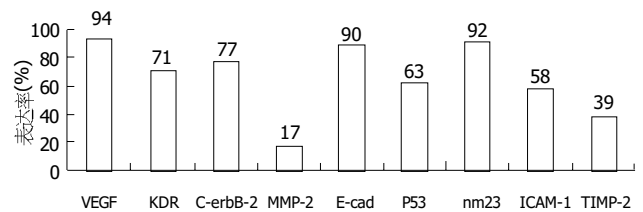


图 1 9 种基因蛋白胃癌组织中的表达率.

表 2 证型与转移相关基因蛋白表达的整体情况表(平均秩和)

基因	痰湿凝结	胃热伤阴	瘀毒内阻	气血双亏	脾胃虚寒	肝胃不和
E-cad	63.09	47.19	35.50	63.06	59.00	34.09
P53	51.53	46.09	53.94	56.24	56.24	38.91
nm23	43.91	49.59	53.00	66.91	46.71	42.97
ICAM-1	56.00	56.53	62.16	44.71	47.44	37.21
VEGF	59.52	44.16	47.13	52.41	48.62	50.59
KDR	49.65	45.34	47.91	61.94	54.03	43.68
MMP-2	50.47	48.00	58.50	53.88	47.65	44.82
TIMP-2	43.21	55.72	45.69	60.47	53.12	44.82
C-erbB-2	52.24	52.31	35.16	53.85	56.79	51.85

表 3 同一证型内 9 种基因蛋白表达差异

中医证型	肿瘤相关基因表达差异情况
痰湿凝结型	E-cad>ICAM-1; E-cad>MMP-2; E-cad>TIMP-2; nm23>MMP-2, nm23>TIMP-2; VEGF>MMP-2, VEGF>TIMP-2;
胃热伤阴型	E-cad>MMP-2; E-cad>TIMP-2; nm23>MMP-2; VEGF>MMP-2;
瘀毒内阻型	nm23>MMP-2; nm23>TIMP-2;
气血双亏型	E-cad>ICAM-1; E-cad>MMP-2; E-cad>TIMP-2; nm23>ICAM-1; nm23>MMP-2, nm23>TIMP-2; VEGF>MMP-2,
脾胃虚寒型	E-cad>ICAM-1; E-cad>MMP-2; E-cad>TIMP-2; C-erbB-2>MMP-2, nm23>MMP-2, nm23>TIMP-2; VEGF>MMP-2, VEGF>TIMP-2;
肝胃不和型	E-cad>MMP-2; nm23>MMP-2; VEGF>ICAM-1; VEGF>MMP-2, VEGF>TIMP-2

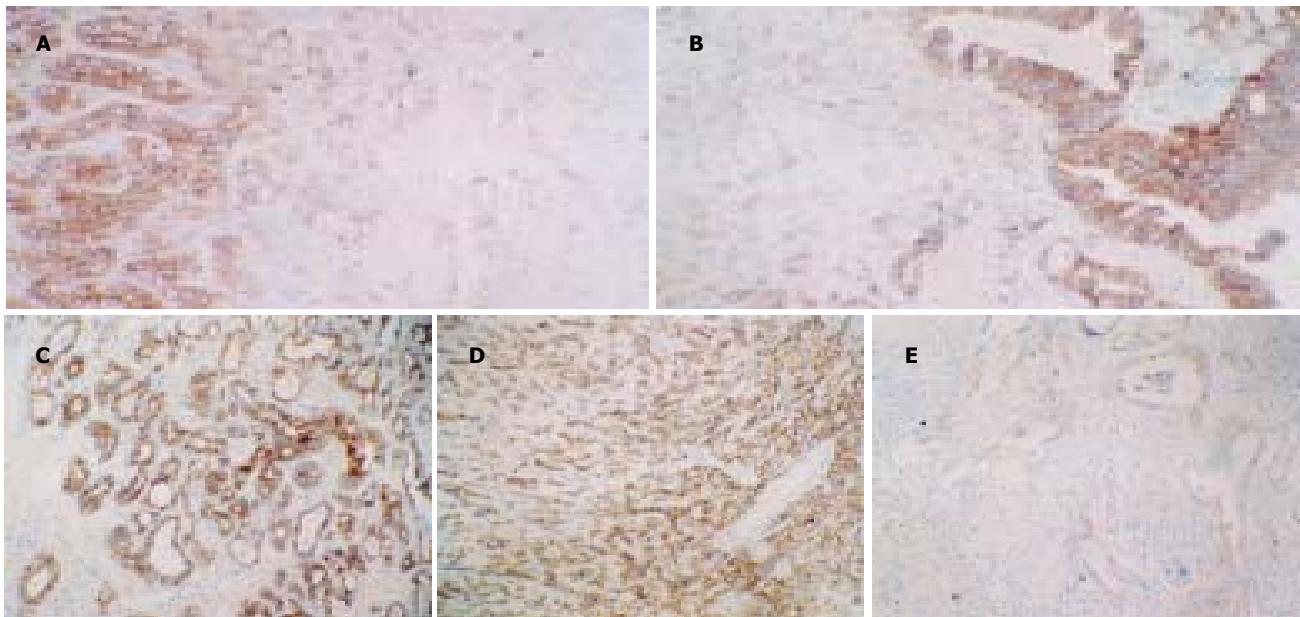


图2 E-cadherin 免疫组化结果. A: 瘀毒内阻型, 腺癌Ⅲ级, 正常(左)+++ ,×100; 肿瘤组织(右)+,×100; B 瘀毒内阻型, 腺癌Ⅱ级, 正常(右)+++ , 肿瘤组织(左)+, ×100; C: 痰湿凝结型, 腺癌Ⅱ级, +++ ,×100, D: 痰湿凝结型, +++ ,×100; E: 肝胃不和型腺癌Ⅱ级, +, ×100.

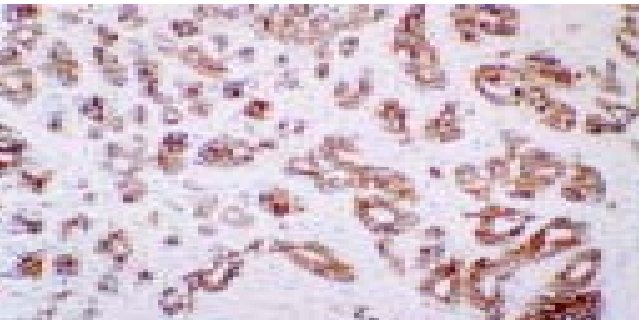


图3 GerbB-2 免疫组化结果, 肝胃不和型, 腺癌Ⅱ级, +++ ,×100.

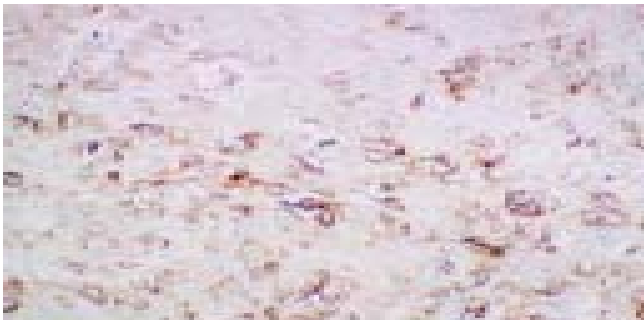


图4 ICAM-1 免疫组化结果, 痰湿凝结型, 腺癌Ⅱ-Ⅲ级, +++ ,×100

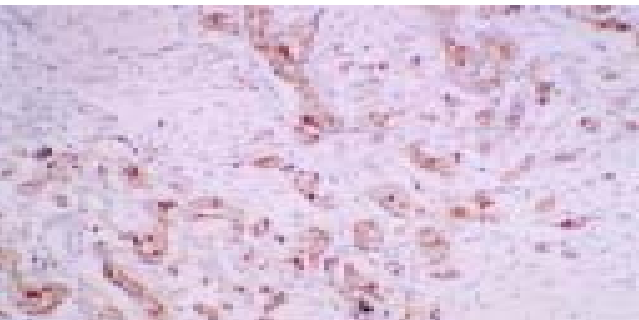


图5 VEGF 免疫组化结果, 气血双亏型, 腺癌Ⅲ级, ++ ,×100.

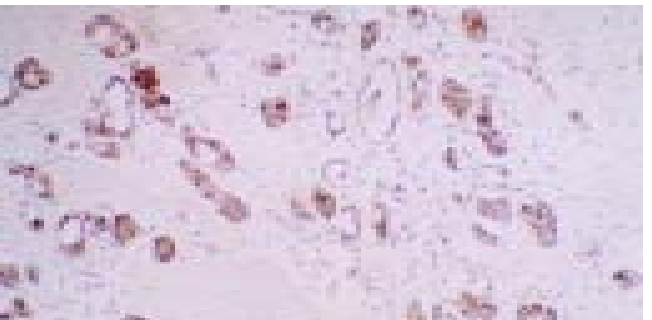


图6 KDR 免疫组化结果, 脾胃虚寒型, 腺癌Ⅱ级, +++ ,×100.

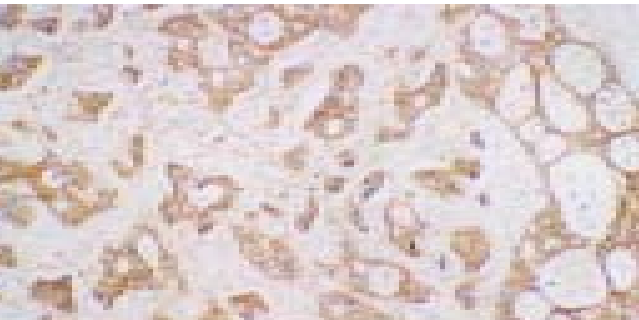


图7 MMP-2 免疫组化结果, 胃热伤阴型, 腺癌Ⅱ级, ++ ,×100.



图8 TIMP-2 免疫组化结果, 胃热伤阴型, 腺癌Ⅱ级, +, ×100.

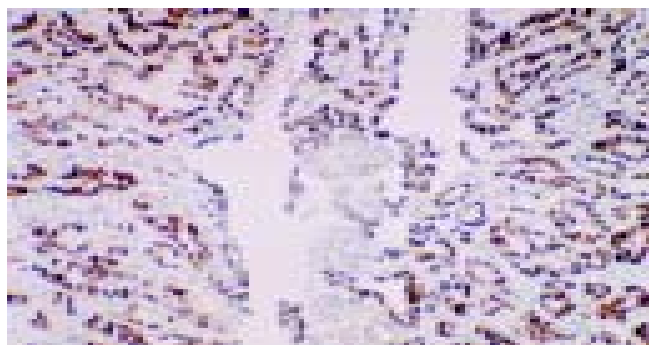


图9 p53免疫组化结果, 胃热伤阴型, 腺癌II级, +++, ×100.

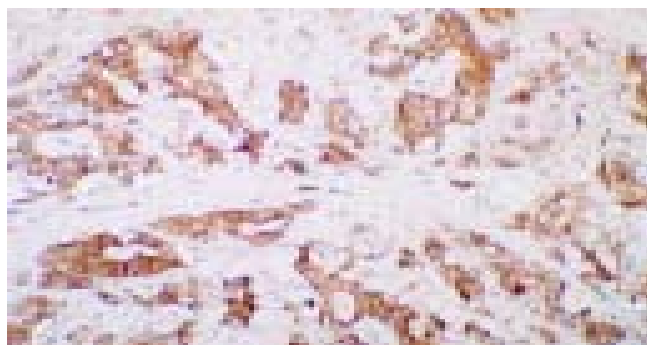


图10 nm23免疫组化结果, 气血双亏型, 腺癌II-III级, +++, ×100.

### 3 讨论

中医证候的重要性早在唐朝就有所论述<sup>[2]</sup>. 中医治病必须按照辨证论治的基本原则, 同病异治、异病同治, 提倡个体化治疗, 真正地体现中医治疗的精髓. 胃癌是常见病、多发病, 当今生物学研究已经进入了在生物大分子整体水平上将不同研究技术与手段有机地结合, 以攻克生物学难题的时代. 这一点突出体现在基因组学(genomics)以及蛋白质组学(proteomics)等新学科领域的研究中<sup>[3]</sup>. 我们思考, 同样是胃癌, 但出现的疾病临床表现并不相同, 有的患者以泛酸、嗝气为主, 即中医辨证为肝胃不和, 而有些患者则以泛吐黏液清水为主, 并无泛酸、嗝气, 伴有舌苔白厚腻辨证应属痰湿凝结表现. 这使我们进一步想到, 这些表型是否能从基因学方面来阐释胃癌证候本质.

随着现代科技与医学的结合, 肿瘤的侵袭与转移在肿瘤分子机制的研究方面取得了令人鼓舞的进展. 肿瘤转移的产生是多步骤的连续过程: 肿瘤细胞首先脱离原发瘤, 侵入周围组织, 进入血管, 然后瘤细胞随血流或淋巴道运行至某些器官或组织, 并受阻停留在小血管中, 穿出血管, 直至在新部位分裂繁殖形成转移瘤或称继发性瘤. 肿瘤浸润是肿瘤细胞和细胞外基质在宿主多因素调节下相互作用的结果, 也是肿瘤远处转移的前奏. 肿瘤的浸润和转移共同构成肿瘤播散, 是成为大多肿瘤患者死亡的重要原因. 可见转移是一个涉及肿瘤细胞-宿主细胞-细胞外基质(ECM)之间相互作用的多步骤分子生物化学变化的过程. 其中分子生物学机制研究已经较为成熟, 尤其是在胃癌肿瘤细胞同质性黏附上起重要作用的 E-cadherin<sup>[4-7]</sup>, ICAM-1<sup>[8-9]</sup>; 在胃癌细胞对基底膜的侵袭上起平衡作用<sup>[10-13]</sup>的 MMP-2, TIMP-2; 在肿瘤细胞发生侵袭、转移的整个过程起作用的肿瘤血管生成因子及其受体 VEGF, KDR<sup>[14-16]</sup>; 以及与胃癌发生侵袭、转移行为密切相关的调控基因<sup>[17-27]</sup> C-erbB-2, P53, nm23 等皆已成为普遍共识. 因此我们采用这9项指标, 用免疫组化方法进行研究, 并试以进一步从基因蛋白表达上探索胃癌证本质.

目前从事临床工作的学者, 逐渐倾向于个体化治疗, 认为疾病的发生、发展以及预后皆存在着差异性, 胃癌同样如此. 在治疗上个体对各种药物的敏感程

度及其疗效亦不同, 因此倡导个体化治疗. 这正应中医临床思维诊疗特点“辨证论治”, “有诸内必形诸外”, 相同的疾病, 中医可辨为不同的证, 针对证候的不同应进行不同治疗. 但中医“辨证论治”的内在本质何在, 即中医证本质, 为此我们从基因水平探讨胃癌中医“证”本质. 本研究结果发现 VEGF, E-cad, nm23 表达率较高, 分别为 94%, 90%, 92%. 尤其重要的发现痰湿凝结型中 E-cad 的表达最高, 以平均秩和表示为: 63.09, 其值最高, 而肝胃不和、瘀毒内阻两型 E-cad 表达较低, 我们考虑此两型胃癌发生的转移主要 E-cad 的缺失, 即肿瘤细胞间同质性黏附降低促进了肿瘤的侵袭、转移的发生. 同时研究亦表明在胃癌每个证型内部均有基因蛋白表达的差异性存在 ( $P = 0.0001$ ), 同证型内部既有抑癌基因的表达, 亦有促癌基因的表达; 而且癌基因与促癌基因的表达可出现在同一证型中. 因此确定患者的预后情况及判断某一证型的整体预后情况还有待于结合随访进行观察.

### 4 参考文献

- 1 李峰, 季绍良, 刘杰, 杨维益, 刘晓兰, 王天芳, 康纯洁, 刘燕. 辨证论治与个体化医疗. 医学与哲学 2001;22:53-54
- 2 唐·孙思邈撰, 鲁兆麟点校. 备急千金要方. 北京: 人民卫生出版社, 1997:470
- 3 李林. 蛋白质组学的进展. 生物化学与生物物理进展 2000;27:227-231
- 4 Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-185
- 5 Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol* 2000;9:5-11
- 6 Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361
- 7 周永宁, 吴治德, 徐采朴, 房殿春. E-钙粘蛋白复合体与胃癌. 世界华人消化杂志 2002;10:436-440
- 8 Tanaka H, Yashiro M, Sunami T, Ohira M, Hirakawa-Y S, Chung K. Lipid-mediated gene transfection of intercellular adhesion molecule-1 suppresses the peritoneal metastasis of gastric carcinoma. *Int J Mol Med* 2002;10:613-617
- 9 倪海滨, 张彦亮, 黄介飞. 细胞间黏附分子-1与胃癌侵袭转移关系的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:356-357
- 10 Okada Y. Tumor cell-matrix interaction: pericellular matrix degradation and metastasis. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000;84:33-42

- 11 Chen BQ, Yang YM, Gao YH, Liu JR, Xue YB, Wang XL, Zheng YM, Zhang JS, Liu RH. Inhibitory effects of c9, t11-conjugated linoleic acid on invasion of human gastric carcinoma cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol* 2003;9:1909-1914
- 12 Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, van Krieken JH, Lamers CB, Verspaget HW. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:413-417
- 13 张翠萍, 田宇彬, 赵清喜, 武军, 梁永信. 胃癌组织 CD44<sup>v9</sup> 和 MMP-2 基因的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11:1531-1534
- 14 Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- 15 张宏图, 胡祥. 血清中血管内皮生长因子与胃癌侵袭和转移的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:344-345
- 16 Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. The role of KDR in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:596-601
- 17 Aoyagi K, Kohfuji K, Yano S, Murakami N, Miyagi M, Takeda J, Shirouzu K. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 in superspreading-type and penetrating-type gastric carcinoma. *Kurume Med J* 2001;48:197-200
- 18 麦卫阳, 彭文明, 郑秀玲, 周敏素, 方云光, 黄锐明, 钟慕贞. C-erbB-2 和 p53 基因表达与胃癌浸润转移的关系. *中国优生与遗传杂志* 2001;9:26-27
- 19 Garcia I, Vizoso F, Martin A, Sanz L, Abdel-Lah O, Raigoso P, Garcia-Muniz JL. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2003;10:234-241
- 20 Yeung P, Lee CS, Marr P, Sarris M, Fenton-Lee D. Nm23 gene expression in gastric carcinoma: an immunohistochemical study. *Aust N Z J Surg* 1998;68:180-182
- 21 Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin JT. Tumor angiogenesis increases with nuclear p53 accumulation in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1453-1456
- 22 Kimura M, Tsuda H, Morita D, Ichikura T, Ogata S, Aida S, Yoshizumi Y, Maehara T, Mochizuki H, Matsubara O. A proposal for diagnostically meaningful criteria to classify increased epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene copy numbers in gastric carcinoma, based on correlation of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical measurements. *Virchows Arch* 2004;[Epub ahead of print]
- 23 Maeta Y, Tsujitani S, Matsumoto S, Yamaguchi K, Tatebe S, Kondo A, Ikeguchi M, Kaibara N. Expression of Mcl-1 and p53 proteins predicts the survival of patients with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2004;7:78-84
- 24 Pinto-de-Sousa J, Silva F, David L, Leita D, Seixas M, Pimenta A, Cardoso-de-Oliveira M. Clinicopathological significance and survival influence of p53 protein expression in gastric carcinoma. *Histopathology* 2004;44:323-331
- 25 Nishikura K, Watanabe H, Iwafuchi M, Fujiwara T, Kojima K, Ajioka Y. Carcinogenesis of gastric endocrine cell carcinoma: analysis of histopathology and p53 gene alteration. *Gastric Cancer* 2003;6:203-209
- 26 Lu C, Xu HM, Ren Q, Ao Y, Wang ZN, Ao X, Jiang L, Luo Y, Zhang X. Somatic mutation analysis of p53 and ST7 tumor suppressor genes in gastric carcinoma by DHPLC. *World J Gastroenterol* 2003;9:2662-2665
- 27 Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:21-27

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

• 消息 •

### 世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《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, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊. 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. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 50 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)



# 肝细胞癌中 XIAP mRNA 及蛋白表达的意义

陶璐薇, 林菊生, 陈孝平, 周鹤俊, 蔡晓坤, 李 超

陶璐薇, 林菊生, 周鹤俊, 蔡晓坤, 李超, 华中科技大学同济医学院附属  
同济医院肝病研究所

陈孝平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝外科中心  
湖北省武汉市 430030

陶璐薇, 女, 1978-12-02 生, 广西桂林市人, 汉族, 2002 年华中科技大学同  
济医学院硕士生, 主要从事肝胆疾病的研究.

项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大  
学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2001@163.net

电话: 027-83663595

收稿日期: 2004-09-07 接受日期: 2004-09-19

## Expression of XIAP mRNA and protein in human hepatocellular carcinoma

Lu-Wei Tao, Ju-Sheng Lin, Xiao-Ping Chen, He-Jun Zhou,  
Xiao-Kun Cai, Chao Li

Lu-wei Tao, Ju-Sheng Lin, He-Jun Zhou, Xiao-Kun Cai, Chao Li,  
Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College,  
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei  
Province, China

Xiao-Ping Chen, Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medi-  
cal College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan  
430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji  
hospital, Tongji medical college of Huazhong University of Science and  
Technology, Wuhan, 430030, Hubei province, China. linjusheng2001@  
163.net

Received: 2004-09-07 Accepted: 2004-09-19

## Abstract

AIM: To study the expression of XIAP mRNA and protein in tissues of hepatocellular carcinoma (HCC), and to investigate the role of XIAP in the development of primary HCC.

METHODS: The expression of XIAP mRNA in normal liver cell line L-02, hepatoma cell lines, SMMC7721 and HepG2, and tissues of primary HCC ( $n = 30$ ) as well as the corresponding adjacent tissues of HCC was detected by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of XIAP protein was observed in preceding cell lines and tissues by immunohistochemical staining.

RESULTS: The expression level of XIAP mRNA in L-02 was lower than that in SMMC7721 and HepG2 (mean XIAP/ $\beta$ -actin:  $0.418 \pm 0.045$  vs  $0.719 \pm 0.069$ ,  $P < 0.05$ ;  $0.418 \pm 0.045$  vs  $0.654 \pm 0.055$ ,  $P < 0.05$  respectively). No significant difference existed in the XIAP mRNA expression between SMMC7721 and HepG2 cells. The expression of XIAP protein was significantly different among three cell lines ( $0.158 \pm 0.016$  vs  $0.291 \pm 0.022$  vs  $0.238 \pm 0.011$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of XIAP mRNA and protein in HCC tissues was higher than those in the corresponding cancer-adjacent tissues (mRNA:  $0.587 \pm 0.064$  vs  $0.313 \pm 0.059$ ,  $P < 0.05$ ; protein:  $0.276 \pm 0.054$  vs  $0.095 \pm 0.014$ ,  $P < 0.05$ ). XIAP protein was mainly distributed in cytoplasm.

CONCLUSION: Overexpression of XIAP mRNA and protein may play an important role in the carcinogenesis of primary HCC.

Tao LW, Lin JS, Chen XP, Zhou HJ, Cai XK, Li C. Expression of XIAP mRNA and protein in human hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(12):2788-2791

## 摘要

目的: 通过检测 XIAP mRNA 及蛋白在肝细胞癌中的表达程度, 探讨 XIAP 在原发性肝细胞癌发生中的作用.

方法: 应用 RT-PCR 技术检测正常肝细胞株 L-02, 肝癌细胞株 SMMC7721, HepG2 和 30 例肝癌及其相应癌旁组织中 XIAP mRNA 的水平, 同时应用免疫组织化学方法检测了上述细胞株及组织中 XIAP 蛋白的表达.

结果: 三株细胞株均有 XIAP mRNA 的表达, XIAP/ $\beta$ -actin 均值分别为 L-02:  $0.418 \pm 0.045$ , SMMC7721:  $0.719 \pm 0.069$ , HepG2:  $0.654 \pm 0.055$ . 其中 L-02 细胞株的 XIAP mRNA 水平显著低于 SMMC7721 及 HepG2 ( $P < 0.05$ ), 两株肝癌细胞株的 XIAP mRNA 表达无显著性差异 ( $P > 0.05$ ). 三株细胞亦均有 XIAP 蛋白的表达, 其细胞爬片平均光度分别为  $0.158 \pm 0.016$ ,  $0.291 \pm 0.022$ ,  $0.238 \pm 0.011$ , 三株细胞的 XIAP 蛋白水平存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ). 肝癌组织 XIAP mRNA 表达较癌旁组织显著升高, XIAP/ $\beta$ -actin 均值分别为:  $0.587 \pm 0.064$ ,  $0.313 \pm 0.059$  ( $P < 0.05$ ). 免疫组化染色显示: XIAP 蛋白表达主要集中在肝细胞胞质中, 其在肝癌组织中的表达显著高于癌旁组织, 平均光度分别为:  $0.276 \pm 0.054$ ,  $0.095 \pm 0.014$  ( $P < 0.05$ ).

结论 XIAP mRNA 及其蛋白在肝癌组织及肝癌细胞系中表达水平明显升高, 提示他可能是促进肝细胞恶变的一个重要因素.

陶璐薇, 林菊生, 陈孝平, 周鹤俊, 蔡晓坤, 李超. 肝细胞癌中 XIAP mRNA 及蛋白表达的意义. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2788-2791

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2788.asp>

## 0 引言

肿瘤的发生是一个多因素多基因多步骤的过程, 而促凋亡和抗凋亡因素间的失衡是其中的一个重要事件. 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase), 又被称死亡蛋白酶, 是凋亡过程的执行者. 多种凋亡相关蛋白, 如 Bcl-2, Fas 等均通过调控凋亡级联反应的上游间接调控 caspase 的活性, 从而调节细胞的凋亡过程. X 染色体连锁的凋

亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员, 是一新发现的强烈的凋亡抑制蛋白, 可以通过抑制 caspase-3, caspase-7 及 caspase-9 阻断凋亡过程. 我们以  $\beta$ -actin mRNA 为内参, 采用 RT-PCR 技术及免疫组织化学 SP 方法检测正常肝细胞株 L-02, 肝癌细胞株 SMMC7721, HepG2 和肝癌及癌旁组织中 XIAP mRNA 和蛋白水平, 从而探讨 XIAP 与肝细胞恶变的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 正常肝细胞株 L-02, 人肝癌细胞株 SMMC7721, HepG2 均由同济医院肝病研究所传代培养, 为贴壁生长细胞. 所有肝癌组织及癌旁组织标本均由同济医院肝脏外科中心手术切除(2003-04/2003-08), 并经病理证实. 逆转录试剂, 包括 MMLV 及 Oligo dT 购自 Promega 公司; PCR 扩增试剂, 包括 Taq 酶、dNTP 购自北京天为时代公司; Trizol 购自上海华舜生物工程公司; 鼠抗人 XIAP mAb 购自 BD Bioscience Pharmingen 公司; 免疫组织化学 sp 试剂盒及 DAB 试剂盒购自北京中山生物技术公司; 目的基因 XIAP 和内参  $\beta$ -actin 引物使用引物设计软件 primer 2.0 设计, 扩增片段分别为 335 bp 和 159 bp, 两对引物均由上海生物工程研究所合成 XIAP 上游引物序列: 5' -tcagcagttggaagacacag-3';  $\beta$ -actin 下游引物序列 5' -agtcacgacactgttaactc-3';  $\beta$ -actin 上游引物序列: 5' -tggcaccacaccttctacaa-3';  $\beta$ -actin 下游引物序列 5' -agcctggatagcaacgtaca-3'.

**1.2 方法** 所有细胞均用含 100 mL/L 胎牛血清(FBS)和 100 kU/L 青霉素及链霉素的 DMEM(dulbeccos modified engle medium)培养基, 在 37 °C 5 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养. 按 Trizol 说明书中步骤提取细胞总 RNA, 以紫外分光光度仪测定 RNA 浓度及纯度, 其余于 -75 °C 中冻存, 近期使用. 组织每次约剪取 50 mg, 用预冷的 PBS 漂洗干净后, 冰上充分匀浆, 其余提取过程同细胞总 RNA. 逆转录反应取 RNA 1  $\mu$ g, 5  $\times$  RT Buffer 4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 50 mU/L RNasin 0.5  $\mu$ L, 0.5 g/L Oligo dT 1  $\mu$ L, 200 MU/L MMLV 1  $\mu$ L, DEPC 水定容至 20  $\mu$ L, 充分混匀, 42 °C 反应 60 min, 94 °C 灭活 5 min. 阴性对照为不加 RNA 的反应体系. 取上述反应产物 cDNA 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 12.5 pmol/L XIAP 及  $\beta$ -actin 引物 1  $\mu$ L, 去离子水定容至 24.5  $\mu$ L, 充分混匀后 94 °C 热启动 5 min, 加入 2.5 mU/L Taq 酶 0.5  $\mu$ L. 扩增条件: 94 °C 热变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环, 72 °C 补偿 5 min, 同时扩增 XIAP 及  $\beta$ -actin. 空白对照为不加入 cDNA 模板的反应体系. 取 PCR 反应产物 3  $\mu$ L, 与 6  $\times$  PCR 上样缓冲液 0.5  $\mu$ L 混合后, 于 20 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)中电泳, 75 V, 40 min, 于紫外光灯下观察结果, 以 UVP 凝胶分析系

统拍照并分析结果.

免疫组化石蜡切片常规脱蜡至水, 滴加 30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇孵育 30 min, 置 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液中加热 92 °C 以上, 15 min 抗原修复, PBS 振洗后加正常羊血清封闭 30 min, 滴加一抗(1:300)4 °C 孵育过夜. 次日室温复温 1 h, 加生物素化二抗孵育 30 min, 辣根过氧化物酶标记链霉卵白素孵育 30 min, PBS 洗后 DAB 显色, 中性树胶封片. 细胞爬片将预先处理的载玻片置于六孔板中, 再将对数生长期细胞以  $5 \times 10^5$  每孔接种于六孔板中. 待细胞贴壁后, 以 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 后续步骤除无需抗原修复外同石蜡切片.

**统计学处理** 试验数据以算术平均值及标准差(mean  $\pm$  SD)表示, 率的显著性差异分析采用 SPSS10.0 软件.

## 2 结果

**2.1 正常肝细胞株及肝癌细胞株中 XIAP mRNA 及蛋白的表达** 正常肝细胞株 L-02 XIAP/ $\beta$ -actin 为  $0.418 \pm 0.045$ , SMMC7721:  $0.719 \pm 0.069$ , HepG2:  $0.654 \pm 0.055$ . 其中 L-02 XIAP mRNA 的表达水平较 SMMC7721 和 HepG2 低( $P < 0.05$ ,  $t$  检验), 但在两肝癌细胞株 XIAP mRNA 水平无明显差异( $P > 0.05$ ,  $t$  检验, 图 1A). 细胞爬片免疫组化显示三株细胞中均有 XIAP 蛋白的表达, 其阳性产物呈棕黄色, 主要分布于胞质中. 图像分析示免疫组化细胞爬片平均光度 L-02 为  $0.158 \pm 0.016$ , SMMC7721:  $0.291 \pm 0.022$ , HepG2:  $0.238 \pm 0.011$ . 三者的平均光度经统计学分析均有显著性差异( $P < 0.05$ ,  $t$  检验), 以 SMMC7721 表达水平最高, L-02 最低. (图 2A-C).

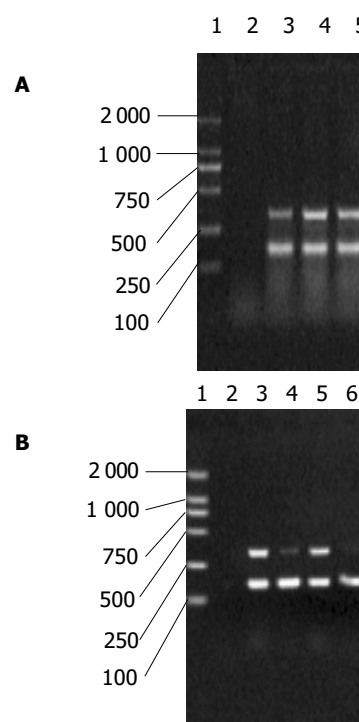


图1 XIAP mRNA 在肝癌中的表达. A: 1: marker; 2: 不加 cDNA 的 PCR 反应体系; 3: L-02 正常肝细胞株; 4: SMMC7721 肝癌细胞株; 5: HepG2 肝癌细胞株; B: 1: marker; 2: 不加 cDNA 的反应体系; 3: 肝癌组织 1; 4: 相应癌旁组织 1; 5: 肝癌组织 2; 相应癌旁组织 2.

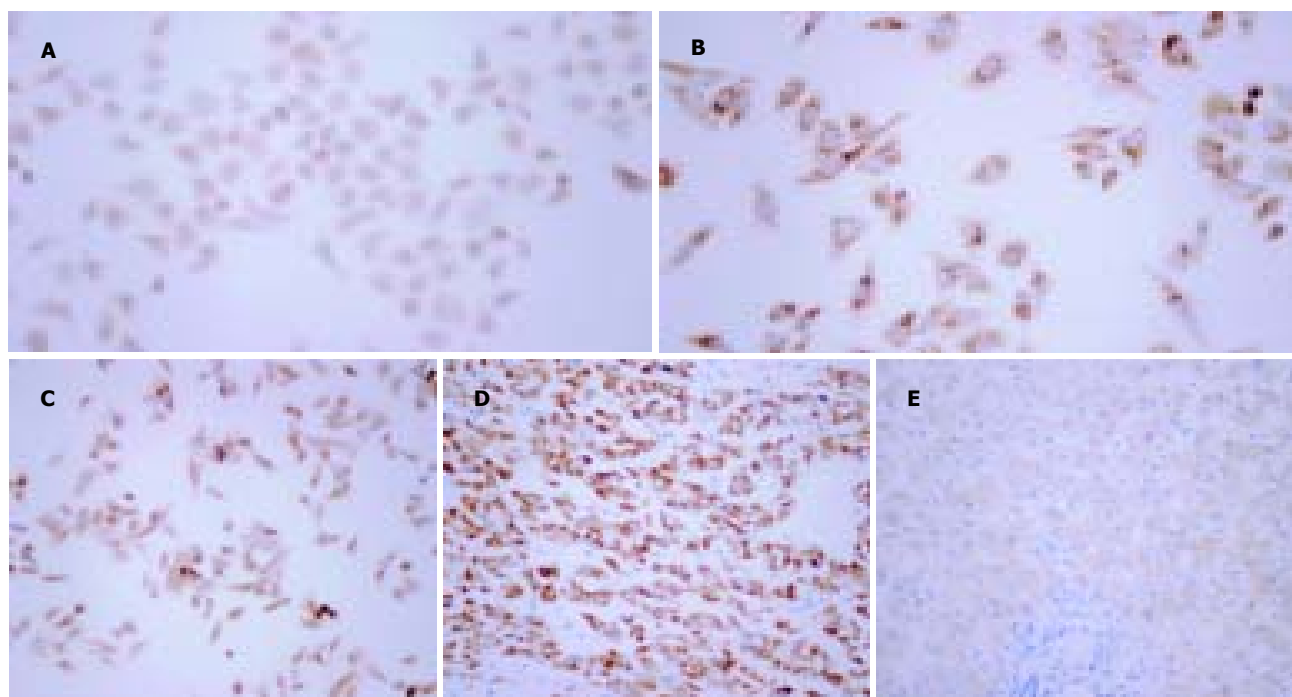


图2 XIAP蛋白在肝癌中的表达 SP×400. A: L-02 细胞中 XIAP 蛋白表达; B: SMMC7721 细胞中 XIAP 蛋白表达; C: HepG2 细胞中 XIAP 蛋白表达; D: 肝癌组织中 XIAP 蛋白表达; E: 癌旁组织中 XIAP 蛋白表达.

2.2 肝癌组织及癌旁组织中XIAP mRNA及蛋白的表达  
肝癌组织 XIAP/ $\beta$ -actin 为  $0.587 \pm 0.064$ , 癌旁组织为  $0.313 \pm 0.059$ , 二者间有显著的统计学差异( $P < 0.05$ ,  $t$  test, 图 1B). 免疫组化阳性染色为棕黄色颗粒, 主要集中于胞质中. 肝癌组织切片免疫组化染色平均光度为  $0.276 \pm 0.054$ , 癌旁组织为  $0.095 \pm 0.014$ . 两组均值间有统计学差异( $P < 0.05$ ,  $t$  test, 图 2D-E).

### 3 讨论

caspase是细胞凋亡过程的最终执行者. 死亡相关受体分子(Fas等)及多种应激因子(如紫外线照射等)分别通过不同途径激活 caspase-8 或 caspase-9, 诱发一系列级联连锁反应, 激活下游的 caspase-7 及 caspase-3, 最终导致细胞正常结构的崩解和细胞凋亡. IAP 家族是近年新发现的具有强烈凋亡抑制作用的蛋白质家族, 其结构的共同特点是名为杆状病毒IAP重复序列(baculoviral inhibitory repeat, BIR)的结构域. 在现发现的IAP 家族的成员, 如 survivin、Livin、ILP-2 中均存在 BIR 结构域, 并能通过 BIR 与相应的 caspase 的结合达到抑制 caspase 活性从而抑制凋亡的作用<sup>[1-6]</sup>. XIAP 的主要结构包括3个BIR结构域, 一个功能不明的两性分子结构区, 羧基端一个富含半胱氨酸的锌指结构以及以上结构间的连接区域(linker). 通过竞争性结合及非竞争性机制, XIAP 的BIR 结构域及 linker 区域能够分别抑制 caspase-3, caspase-7 及 caspase-9, 从而起到抑制细胞凋亡, 促进细胞生存的作用<sup>[7-15]</sup>. 此外, XIAP 还能通过激活丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)家族的另一个成员 C-JUN N 末端激酶 1(JNK1), 从而抑制由 TNF $\alpha$  及 ICE1 即 caspase1 介导的细胞凋亡<sup>[16-22]</sup>. 现有研究表明, 当细胞处于不利

条件, 如缺氧、缺乏血清时, XIAP 表达升高, 同时 XIAP 在多种肿瘤中均有异常表达<sup>[23]</sup>. 故许多学者均认为: XIAP 基因的异常表达可能是肿瘤细胞失去正常凋亡调控并能在不良条件中生存的重要条件. Ingo *et al* 人检测了包括血液、中枢神经、肾脏、肺等多个系统的 60 个肿瘤细胞系, 发现 XIAP 在所有的细胞系中均有普遍表达<sup>[24]</sup>. Ramp *et al* 运用免疫组化检测了 145 例肾脏透明细胞癌标本, 发现其中 95% 的肿瘤组织表达 XIAP, 其中低分化肿瘤的 XIAP 表达远高于高分化肿瘤, 而晚期肿瘤则明显高于早期肿瘤<sup>[25]</sup>. Amantana *et al* 对顺铂耐药的前列腺癌细胞株 DU145 的研究发现, XIAP 的高表达及其对 caspase-3 的抑制作用是 DU145 对顺铂耐药的原因之一. 他们同时证实, 使用 XIAP 的反义核酸治疗能明显增强顺铂的疗效, 减弱细胞耐药性<sup>[26]</sup>.

本研究结果显示 XIAP mRNA 及蛋白在三株细胞中均有表达. 其中, 在正常肝细胞株 L-02 中的表达量较肝癌细胞株 SMMC7721 及 HepG2 中为低, 而两株肝癌细胞株的 XIAP mRNA 及蛋白的表达水平没有显著性差异. XIAP 的普遍表达可能与细胞株建株时为达到永生化的反复筛选, 从而使得 XIAP 高表达而具有强抗凋亡能力的细胞得以存活有关. 值得关注的是, 在 mRNA 水平, 肝癌细胞株 SMMC7721 及 HepG2 的 XIAP 表达相近, 而在蛋白水平 SMMC7721 则高于 HepG2, 其机制可能与 XIAP mRNA 5' 端的核糖体进入序列(internal ribosome entry site, IRES)的活性及细胞内的泛素化水平相关. IRES 能帮助细胞在不利条件下翻译出 XIAP, 而 XIAP 的降解则是由泛素化过程介导的<sup>[27-29]</sup>. 因此, 可能由于 SMMC7721 和 HepG2 在肿瘤起源、细胞特性上存在诸多差异, 导致其胞内 IRES 活性及泛素化水平的不一

致,从而导致了 XIAP 蛋白水平的变化. 研究同时发现在癌旁组织中即存在 XIAP 的表达,在肝癌组织中 XIAP 及蛋白则明显升高. 其机制可能为在良性基础肝病,如肝炎、肝硬化的基础上,肝脏细胞发生修复性增生,抗凋亡机制作用增强, XIAP 相应表达上调. 而其中少数 XIAP 表达明显上调的细胞克隆具有极强抗凋亡能力,失去了正常的凋亡调控并在多种不利条件下存活下来而发展为恶性肿瘤. 总之,本研究表明 XIAP 可能通过细胞的凋亡调控参与了肝细胞癌的发生和发展,他的过表达与肝细胞癌发生发展相关. 这为肝癌的发生预测和早期诊断寻求新的指标,为肝癌的预防和治疗提供新的靶点.

#### 4 参考文献

- Bettina WMR, Samy SM, Lisa JE, Jeffifer L, Stephanie BR, Annalisa F, Lan T, Stephan F, Richard JY, David LN, Luigi DN, Paolo V, Howard OF, Colin SD. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Molecular Cellular Biol* 2001;21:4292-4301
- Gary MK, Bruce CG. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chemistry* 2001;276:3238-3246
- Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1984-1988
- Qiao JG, Zhang YQ, Yin YC, Tan Z. Expression of Survivin in pancreatic cancer and its correlation to expression of Bcl-2. *World J Gastroenterol* 2004;10:2759-2761
- 贾克东, 石淑仙, 阮幼冰. 肝硬化和肝癌肝组织 Survivin 基因表达与增生的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12:550-554
- 金玉, 林连捷, 郑长青. 大肠癌组织中 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性. *世界华人消化杂志* 2004;12:1218-1220
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van AT, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998;17:2215-2223
- Yasuyuki S, Yui N, Kazuko N, John CR, Ryosuke T. X-linked Inhibitor of apoptosis protein(XIAP) inhibits caspase-3 and-7 in distinct modes. *J Biol Chem* 2001;276:27058-27063
- Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 2003;11:519-527
- John S, Paul GE, Catherine LD, Christinge JH, Manuel B, Joanne C, Miha P, Anne MV, David LW. Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *EMBO J* 2001;20:3114-3123
- Rakesh D, Eiji O, Kazuyuz E, Verena B, Jian R, Donald K. XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem* 2000;275:31733-31738
- Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszk DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 2001;104:781-790
- Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszk DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 2001;104:781-790
- Chao Hong S, Mengli C, Robert PM. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem* 2000;275:33777-33781
- Hawkins CJ, Silke J, Verhagen AM, Foster R, Ekert PG, Ashley DM. Analysis of candidate antagonists of IAP-mediated caspase inhibition using yeast reconstituted with the mammalian Apaf-1-activated apoptosis mechanism. *Apoptosis* 2001;6:331-338
- German S, Jean da SC, Odile D, Jongdae L, Ken N, Nicolas S, Quinn LD, Richard JU. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Molecular Cellular Biol* 2002;22:1754-1766
- Bodo L, Kyle JG, Nicola F, Kerstin K, Jerzy-Roch N, Hideo AB, Elaine WR, Gunter B. XIAP induces cell-cycle arrest and activates Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Circulation Research* 2001;88:282-290
- Kyoko Y, Shin-ichi N, Jun NT, Michiru N, Katsuyuki T, Kenji I, Naoto U, Eisuke N, Hiroshi S, Kunihiro M. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J* 1999;18:179-187
- Renate HW, Johannes AS, Christian S, Bernd RB, Joachim L, Rainer d M. Activation of NF- $\kappa$ B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *J Biol Chem* 2000;275:22064-22068
- Stephanie BR, Jens UW, Wurthner WTP, Anita BR, Colin SD. X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor- $\alpha$  signaling. *J Biol Chem* 2001;276:26542-26549
- Chao WX, Kristian A, Benjamin KT. Nuclear Factor- $\kappa$ B-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -induced apoptosis. *Endocrinology* 2001;142:557-563
- Germana S, Colin SD, Bettina WMR, Craig BT, Richard JU. Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. *Biochemistry* 1998;95:6015-6020
- Lu QP, Cao TJ, Zhang ZY, Liu W. Multiple gene differential expression patterns in human ischemic liver: Safe limit of warm ischemic time. *World J Gastroenterol* 2004;10:2130-2133
- Ingo T, Steven MK, Harry S. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in Human cancers and myeloid leukemias. *Clinical Cancer Research* 2000;6:1796-1803
- Ramp U, Krieg T, Caliskan E, Mahotka C, Ebert T, Willers R, Gabbert HE, Gerharz CD. XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35:1022-1028
- Amantana A, London CA, Iversen PL. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cell. *Mol Cancer Ther* 2004;3:699-707
- Martin H, Lefebvre C, Yeh C. A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol* 1999;1:190-192
- Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000;288:874-877
- Yasuyuki S, Yui N, Ryosuke T. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:8662-8667

# 大肠腺瘤及癌组织 HIF-1 $\alpha$ 的表达与凋亡增生的关系

程胜平, 刘南植, 钱 颀

程胜平, 刘南植, 钱颀, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

程胜平, 男, 1972-04-12 生, 湖北省武汉市人, 汉族, 2002 级华中科技大学同济医学院硕士生, 主要从事消化道肿瘤的基础及临床研究。

项目负责人: 程胜平, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。sheng\_ping2004@sina.com

电话: 027-83663208

收稿日期: 2004-10-18 接受日期: 2004-11-27

## Expression of HIF-1 $\alpha$ and its relations with apoptosis and proliferation in colorectal neoplasm

Sheng-Ping Cheng, Nan-Zhi Liu, Jie Qian

Sheng-Ping Cheng, Nan-Zhi Liu, Jie Qian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Sheng-Ping Cheng, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China.

Received: 2004-10-18 Accepted: 2004-11-27

## Abstract

**AIM:** To study the expression of HIF-1 $\alpha$  and its relationship with apoptosis and proliferation in human colorectal neoplasm

**METHODS:** Expression of HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, Bax and PCNA was detected in normal colorectal tissue ( $n = 13$ ), colorectal adenoma ( $n = 26$ ) and adenocarcinoma ( $n = 50$ ) by the immunohistochemical method respectively.

**RESULTS:** HIF-1 $\alpha$  was negatively expressed in normal colorectal mucosa tissues. The positive rate of HIF-1 $\alpha$  expression was significantly higher in adenoma tissues than that in adenocarcinoma ones (30.8% vs 64.0%,  $\chi^2 = 8.546$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of HIF-1 $\alpha$  in colorectal carcinoma significantly related to the depth of invasion, lymph node metastasis, and Dukes' staging ( $\chi^2 = 6.339$ ,  $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 9.091$ ,  $P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 10.72$ ,  $P < 0.05$ ). No significant correlation was found between the positive rate of HIF-1 $\alpha$  and tumor's size and differentiation ( $P > 0.05$ ). The positive rate of Bcl-2 expression in three groups was 15.4%, 50.0% and 76.0% respectively, and there were significant differences among them ( $P < 0.05$ ). The positive rate of Bax expression was 76.9%, 65.4% and 58.0% in three groups respectively. There were no significant differences among them. The proliferation level of carcinoma is higher than that of adenoma ( $\chi^2 = 5.073$ ,  $P < 0.05$ ) and it was related to the depth of invasion and Dukes staging ( $\chi^2 = 6.336$ ,  $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 11.219$ ,  $P < 0.01$ ). HIF-1 $\alpha$  expression was positively associated with Bcl-2 and PCNA levels in adenoma and carcinoma ( $r = 0.5$ ,  $r = 0.535$ ,  $P < 0.05$ ;  $r = 0.457$ ,  $r = 0.426$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Over-expression of HIF-1 $\alpha$  is associated with apoptosis inhibition, proliferation, invasion and metastasis of colorectal neoplasm, and it may play an important role in the carcinogenesis and development of colorectal carcinoma.

Cheng SP, Liu NZ, Qian J. Expression of HIF-1 $\alpha$  and its relations with apoptosis and proliferation in colorectal neoplasm. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(12):2792-2796

## 摘要

**目的:** 研究缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )在大肠肿瘤中的表达及其与凋亡、增生的关系, 探讨 HIF-1 $\alpha$  在大肠癌发生发展中的作用。

**方法:** 运用免疫组化的方法检测 HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, Bax, PCNA 在正常大肠组织 13 例, 大肠腺瘤 26 例, 大肠癌 50 例中的表达。

**结果:** 正常大肠组织 HIF-1 $\alpha$  均为阴性表达, 腺瘤及癌组织中 HIF-1 $\alpha$  阳性表达率为 30.8% 和 64%, 大肠癌 HIF-1 $\alpha$  表达率显著高于腺瘤( $\chi^2 = 8.546$ ,  $P < 0.01$ )。大肠癌 HIF-1 $\alpha$  表达与浸润, 淋巴结转移, Dukes 分期相关( $\chi^2 = 6.339$ ,  $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 9.091$ ,  $P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 10.72$ ,  $P < 0.05$ )。HIF-1 $\alpha$  表达与肿瘤大小、分化程度无关( $P > 0.05$ )。Bcl-2 在 3 组中阳性表达率为 15.4%, 50.0% 和 76.0%, 三者间表达率差别有显著意义( $P < 0.05$ )。Bax 在 3 组中阳性表达率为 76.9%, 65.4% 和 58.0%, 三者间表达率无显著性差异( $P > 0.05$ )。Bcl-2, Bax 表达与肿瘤大小, 分化, Dukes 分期无关( $P > 0.05$ )。正常大肠组织 PCNA 表达均为低增生生活性, 腺瘤及癌中 PCNA 高增生生活性者 26.9% 和 56.0%, 癌组织 PCNA 高增生生活性表达显著高于腺瘤( $\chi^2 = 5.073$ ,  $P < 0.05$ )。大肠癌增生程度与浸润及 Dukes 分期相关( $\chi^2 = 6.336$ ,  $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 11.219$ ,  $P < 0.01$ )。腺瘤及大肠癌 HIF-1 $\alpha$  表达与 Bcl-2, PCNA 增生程度呈正相关( $r = 0.5$ ,  $r = 0.535$ ,  $P < 0.05$ ;  $r = 0.457$ ,  $r = 0.426$ ,  $P < 0.01$ ), 与 Bax 表达无关。

**结论:** HIF-1 $\alpha$  抑制大肠肿瘤凋亡, 促进增生, 与肿瘤浸润转移密切相关, 在大肠癌发生发展中发挥重要作用。

程胜平, 刘南植, 钱颀. 大肠腺瘤及癌组织 HIF-1 $\alpha$  的表达与凋亡增生的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2792-2796  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2792.asp>

## 0 引言

缺氧诱导因子-1(HIF-1)是迄今为止发现惟一的低氧状

态下发挥活性的转录因子. HIF-1 是由 HIF-1 $\alpha$  及 HIF-1 $\beta$  组成的异二聚体, 其中  $\alpha$  亚单位被认为是特异性氧调节亚单位, 决定了 HIF-1 的活性. 人类实体肿瘤中常存在缺氧环境, 已在多种恶性肿瘤甚至癌前病变中检测到 HIF-1 $\alpha$  过表达<sup>[1-7]</sup>. HIF-1 $\alpha$  参加了肿瘤对低氧的适应过程, 从而增强了肿瘤细胞对缺氧的抵抗能力, 促进肿瘤细胞的生长及恶性转化<sup>[8-12]</sup>. 研究表明, HIF-1 $\alpha$  在缺氧介导的凋亡及增生中起重要作用, 但目前关于 HIF-1 $\alpha$  与凋亡、增生的关系报道不一<sup>[13-15]</sup>. 大肠癌是常见的恶性肿瘤, 研究认为凋亡及增生的失衡在大肠黏膜癌变中起着重要作用. 关于 HIF-1 $\alpha$  与大肠肿瘤凋亡及增生的研究较少. 我们通过免疫组化的方法检测 HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, Bax, PCNA 在正常大肠黏膜, 腺瘤及腺癌中的表达, 探讨大肠肿瘤临床病理及 HIF-1 $\alpha$  与凋亡及增生的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2000/2003 年大肠腺癌 50 例, 男 28 例, 女 22 例, 年龄 34-67(52.9  $\pm$  10.6 岁). 高分化 17 例, 中分化 24 例, 低分化 9 例. Dukes A 11 例, B 11 例, C 18 例, D 10 例. 大肠腺瘤 26 例, 管状腺瘤 10 例, 绒毛状腺瘤 9 例, 管状-绒毛状腺瘤 7 例. 另 13 例正常大肠组织作对照. 石蜡切片厚 5  $\mu$ m. 兔抗人 HIF-1 $\alpha$  多抗(1:80)及 SABC 试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司), 鼠抗人 Bcl-2, Bax, PCNA 单抗(1:100, 北京中山试剂公司).

1.2 方法 采用免疫组化方法检测. HIF-1 $\alpha$  免疫组化染色采用 SABC 法, Bcl-2, Bax, PCNA 采用 SP 法. 染色步骤按试剂盒说明进行, 染色前用柠檬酸抗原修复液热水浴或微波抗原修复 10 min. 用 PBS 代替一抗作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照. HIF-1 $\alpha$  蛋白以胞质或胞核内有棕黄色颗粒为阳性, 高倍镜下( $\times 400$ )对每张切片随机选择 5 个视野, 计数 200 个细胞/视野, 共计 1 000 个, 阳性细胞数 < 1% 为阴性(-), 阳性细胞数 1-10% 为弱阳性(+), 11-50% 为中度阳性(++), > 51% 为强阳性(+++)<sup>[13]</sup>. Bcl-2 和 Bax 蛋白均以胞质内有棕黄色颗粒为阳性. 判定标准: 无阳性反应为阴性(-), 阳性细胞数 < 5% 为弱阳性(+), 6-50% 为中度阳性(++), > 51% 为强阳性(+++). PCNA 以胞核内有棕黄色颗粒为阳性, < 5% 为阴性, 6-25% 为(+), 26-50% 为(++), 51-75% 为(+++), > 76% 为(++++) , 以 +++, ++++ 级为高

增生活性, 以此作为大肠肿瘤的增生程度指标.

**统计学处理** 根据数据性质, 采用  $\chi^2$  检验, Fishers 精确概率法, 及 Spearman 等级相关分析, 所有数据在 spss12.0 软件进行, 显著水平取  $\alpha = 0.05$

## 2 结果

2.1 HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, Bax, PCNA 的表达 HIF-1 $\alpha$  蛋白主要表达于胞质, 也有部分胞核表达. 正常大肠组织 HIF-1 $\alpha$  均为阴性表达, 腺瘤中阳性表达率为 30.8% (8/26), 癌组织中阳性表达率为 64.0% (32/50). 腺瘤中 HIF-1 $\alpha$  阳性表达率高于正常组织 ( $\chi^2 = 7.483$ ,  $P < 0.05$ ), 腺癌 HIF-1 $\alpha$  阳性表达率显著高于腺瘤 ( $\chi^2 = 8.546$ ,  $P < 0.01$ ). Bcl-2 及 Bax 表达于胞质. Bcl-2 在正常组织, 腺瘤, 癌组织中阳性表达率为 15.4%, 50.0%, 76.0%, Bcl-2 的阳性表达率正常组织 < 腺瘤 < 癌组织, 三者之间表达率差别有显著意义 ( $P < 0.05$ ). Bax 在三者中阳性表达率为 76.9%, 65.4%, 58.0%, 呈逐渐下降趋势, 但经统计分析, 三者间表达率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ). PCNA 表达于细胞核. 正常大肠组织 PCNA 表达均为低增生活性, 腺瘤中 PCNA 高增生活性者 26.9% (7/26), 癌组织中高增生活性 56.0% (28/50). 腺瘤中高增生活性表达率虽高于正常组织, 但其差异无显著性 ( $P = 0.07$ , Fishers 精确概率), 癌组织中 PCNA 高增生活性表达显著高于腺瘤 ( $\chi^2 = 5.073$ ,  $P < 0.05$ , 表 1, 图 1A-F)

2.2 HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, Bax, PCNA 表达与大肠癌临床病理特征联系 HIF-1 $\alpha$  阳性表达率与大肠癌的大小, 分化程度无关 ( $P > 0.05$ ). 浸润浆膜及有淋巴结转移者 HIF-1 $\alpha$  阳性表达率高于未浸润浆膜 ( $\chi^2 = 6.339$ ,  $P < 0.05$ ) 及无淋巴结转移者 ( $\chi^2 = 9.091$ ,  $P < 0.01$ ), 随着 Dukes 分期进展, HIF-1 $\alpha$  表达增高, 各期 HIF-1 $\alpha$  表达率有显著性差异 ( $\chi^2 = 10.72$ ,  $P < 0.05$ ). PCNA 增生程度与肿瘤的大小及分化程度无关 ( $P > 0.05$ ), 浸润浆膜者增生程度高于未浸润浆膜者 ( $\chi^2 = 6.336$ ,  $P < 0.05$ ), 有淋巴结转移者增生活性高于无淋巴结转移者, 其差异处于统计学临界范围 ( $\chi^2 = 3.63$ ,  $P = 0.057$ ). 随着 Dukes 分期进展, PCNA 增生程度增高, 各期 PCNA 增生程度差异具显著性 ( $\chi^2 = 11.219$ ,  $P < 0.01$ ). Bcl-2, Bax 在大肠癌中的表达与肿瘤的大小、分化及 Dukes 分期无明显相关 ( $P > 0.05$ , 表 2).

2.3 HIF-1 $\alpha$  表达与大肠肿瘤凋亡及增生的关系 在大肠腺瘤中, HIF-1 $\alpha$  表达与 Bcl-2, PCNA 增生程度呈

表 1 HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, Bax, PCNA 的表达(n, %)

分组	n	HIF-1 $\alpha$		Bcl-2		Bax		PCNA	
		-	+	-	+	-	+	低	高
正常	13	13	0	11	2 (15.4)	3	10 (76.9)	13	0
腺瘤	26	18	8 (30.8)	13	13 (50.0)	9	17 (65.4)	19	7 (26.9)
癌组织	50	18	32 (64.0)	12	38 (76.0)	21	29 (58.0)	22	28 (56.0)

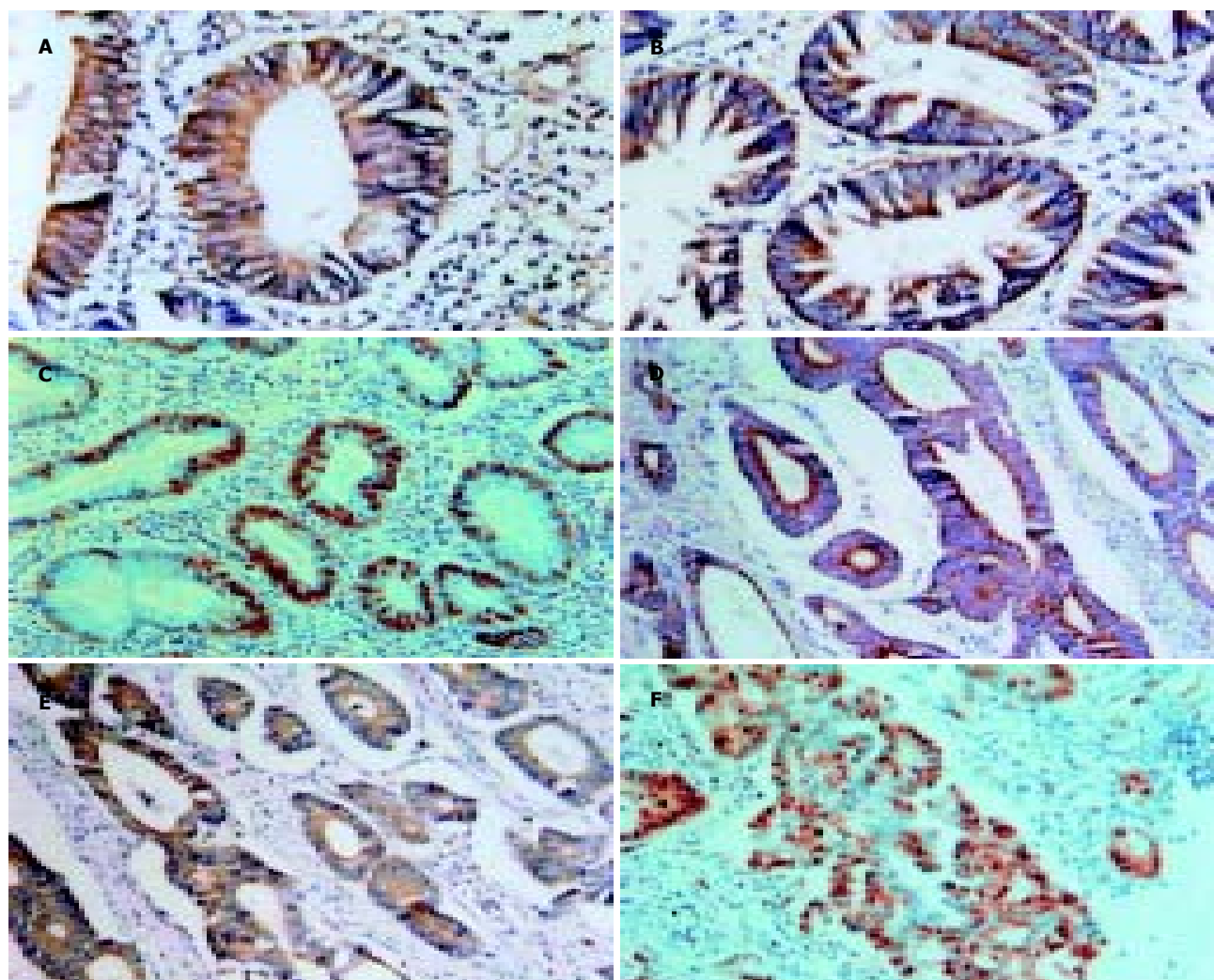


图1 大肠腺瘤及腺癌组织 HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, PCNA 免疫组化表达. A: 腺瘤 HIF-1 $\alpha$  阳性  $\times 400$ ; B: 腺瘤 Bcl-2 阳性  $\times 400$ ; C: 腺瘤 PCNA 阳性  $\times 200$ ; D: 中分化腺癌 HIF-1 $\alpha$  阳性  $\times 200$ ; E: 中分化腺癌 Bcl-2 阳性  $\times 200$ ; F: 中分化腺癌 PCNA 阳性  $\times 200$ .

表2 HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2, Bax, PCNA 表达与大肠癌临床病理特征联系

临床病理特征	<i>n</i>	HIF-1 $\alpha$		Bcl-2		Bax		PCNA	
		-	+	-	+	-	+	低	高
肿瘤大小: <3 cm	16	6	10	3	13	6	10	7	9
3-5 cm	20	7	13	5	15	8	12	10	10
>5 cm	14	5	9	4	10	7	7	5	9
分化程度: 高	17	6	11	6	11	4	13	8	9
中	24	8	16	4	20	12	12	11	13
低	9	4	5	2	7	5	4	3	6
浸润浆膜: (-)	11	8	3	3	8	5	6	9	2
(+)	39	10	29 <sup>a</sup>	9	30	16	23	13	26 <sup>a</sup>
淋巴结转移: (-)	22	13	9	5	17	6	16	13	9
(+)	28	5	23 <sup>b</sup>	7	21	15	13	9	19
Dukes 分期: A	11	8	3	3	8	5	6	9	2
B	11	5	6	2	9	2	9	5	6
C	18	4	14	5	13	9	9	7	11
D	10	1	9 <sup>a</sup>	2	8	5	5	1	9 <sup>b</sup>

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



表3 腺瘤, 大肠癌 HIF-1 $\alpha$  表达与凋亡及增生关系

HIF-1 $\alpha$		Bcl-2		Bax		PCNA	
		-	+	-	+	低	高
腺瘤	-	12	6	7	11	16	2
	+	1	7 <sup>a</sup>	2	6	3	5 <sup>a</sup>
大肠癌	-	9	9	6	12	13	5
	+	3	29 <sup>b</sup>	15	17	9	23 <sup>b</sup>

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

正相关( $r = 0.5$ ,  $r = 0.535$ ,  $P < 0.05$ ), 与 Bax 表达无关( $r = 0.135$ ,  $P > 0.05$ ). 在大肠癌中, HIF-1 $\alpha$  表达与 Bcl-2 表达呈正相关( $r = 0.457$ ,  $\chi^2 = 8.315$ ,  $P < 0.01$ ), 与 PCNA 增生程度呈正相关( $r = 0.426$ ,  $\chi^2 = 9.091$ ,  $P < 0.01$ ), 与 Bax 表达无关( $r = -0.132$ ,  $\chi^2 = 0.867$ ,  $P > 0.05$ , 表3).

### 3 讨论

缺氧是实体肿瘤常见现象, 能诱导一系列与血管新生, 无氧代谢等密切相关的基因, 帮助肿瘤细胞适应缺氧环境. 在此过程中起关键作用的是 HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  过表达与肿瘤的浸润转移、预后、治疗抵抗密切相关<sup>[16-19]</sup>. 本结果显示, HIF-1 $\alpha$  在正常大肠组织中无表达, 在腺瘤中阳性表达率为 30.8%, 在癌组织中表达率为 64.0%, 三者之间表达率差异有显著性. HIF-1 $\alpha$  表达水平在正常组织-腺瘤-腺癌中不断增高, 这与江从庆 *et al*<sup>[20]</sup>, Jiang *et al*<sup>[21]</sup> 结果一致. 这表明细胞缺氧出现在癌变之前并持续到肿瘤发展的全过程, HIF-1 $\alpha$  过表达可能是癌变过程中的早期行为, 提示 HIF-1 $\alpha$  过度表达在促进腺瘤癌变中发挥重要作用. 我们还发现, 浸润浆膜, 有淋巴结转移者 HIF-1 $\alpha$  阳性表达率高于未浸润浆膜及无淋巴结转移者, 且随着 Dukes 分期进展, HIF-1 $\alpha$  表达率逐渐增高, 表明 HIF-1 $\alpha$  在大肠癌的浸润、转移中起重要作用.

Bcl-2 是公认的抗凋亡基因, Bax 基因通过拮抗 Bcl-2 基因而发挥其促进细胞凋亡的作用, Bcl-2/Bax 比值与细胞凋亡率显著相关. Bedi *et al*<sup>[22]</sup> 研究表明在大肠黏膜癌变过程中细胞凋亡能力逐渐减弱. 於亮亮 *et al*<sup>[23]</sup> 研究, 在结肠癌变过程中, 从腺瘤病变到癌, Bcl-2 表达逐渐增高, 凋亡指数相应降低. 说明 Bcl-2 异常表达是大肠癌变过程细胞凋亡受抑制的潜在机制. 我们也发现, 在正常大肠组织, 腺瘤, 癌组织中 Bcl-2 表达逐渐增高, 三组表达有显著性差异, 而 Bax 表达有逐渐降低趋势, 表明在大肠腺瘤-癌变序列中, 细胞凋亡受抑制. PCNA 是 DNA 聚合酶的辅酶之一, 可作为细胞周期内 S 期的特异性标志和评价细胞增生状态的一个指标<sup>[24]</sup>. 本结果显示, 腺瘤细胞增生活性较正常黏膜增加, 而癌组织又较腺瘤明显增加, 从腺瘤到癌发展过程中, 细胞增

生持续增加.

HIF-1 $\alpha$  在低氧诱导的凋亡与肿瘤增生中起重要作用. 但关于缺氧及 HIF-1 $\alpha$  是促进或抑制凋亡目前报道不一<sup>[25-27]</sup>. 目前关于 HIF-1 $\alpha$  与大肠肿瘤凋亡关系报道较少. 我们观察了 HIF-1 $\alpha$  在大肠腺瘤及癌中的表达及其与 Bcl-2, Bax 表达的关系, 结果显示 HIF-1 $\alpha$ , Bcl-2 表达从腺瘤到癌逐渐增多, 且 HIF-1 $\alpha$  表达在腺瘤及癌中均与 Bcl-2 呈正相关, 与 Bax 表达无关. 这提示 HIF-1 $\alpha$  表达与大肠肿瘤凋亡抑制有关, 在大肠腺瘤-癌演变过程中, HIF-1 $\alpha$  通过抑制细胞凋亡从而促进大肠腺瘤的恶性转化过程. 大肠肿瘤中缺氧及 HIF-1 $\alpha$  调控凋亡机制尚不明确. Kinoshita *et al*<sup>[28]</sup> 在人结肠癌细胞系 HCT116 培养中发现, 缺氧培养 24 h 后, 肿瘤细胞 Bcl-2 表达上调, 持续缺氧培养 48 h 后, Bcl-2 表达较前更加增高, 且同时伴有 PCNA 高表达. 认为缺氧可上调 Bcl-2 表达从而使肿瘤细胞抵御缺氧所致的凋亡而继续生长. Wang *et al*<sup>[29]</sup> 也报道, 缺氧培养的 HTDEC 细胞(human tumor-derived endothelial cells, 分离自结肠癌)Bcl-2 表达上调从而使 HTDEC 细胞抵抗 IFN- $\gamma$  诱导的凋亡, 并认为缺氧上调 Bcl-2 是通过 HIF-1 $\alpha$  介导. 有研究表明, VEGF 表达上调可以促进 Bcl-2 表达从而抵御缺氧所致的凋亡<sup>[30-32]</sup>. VEGF 是 HIF-1 $\alpha$  最重要的调控基因, 研究已表明在大肠肿瘤中 HIF-1 $\alpha$  诱导 VEGF 表达上调. 可见 HIF-1 $\alpha$  可能与其他基因一起参与对凋亡的调控. 樊利芳 *et al*<sup>[13]</sup> 发现在肺癌中 HIF-1 $\alpha$  与 bcl-2 呈负相关, 而与 bax 正相关, 与本研究不一致, 可能与不同的肿瘤组织类型有关.

本实验结果显示 PCNA 增生活性在正常黏膜-腺瘤-癌中逐渐增高, 且 PCNA 高增生活性与大肠癌浸润, Dukes 分期有关. 这与陈卫昌 *et al*<sup>[33]</sup> 研究结果一致. 提示 PCNA 可作为判断大肠癌浸润转移的指标. Kinoshita *et al*<sup>[28]</sup> 在大肠癌 HCT116 细胞系缺氧培养发现 PCNA 高表达. 本实验结果也显示 HIF-1 $\alpha$  表达与腺瘤及癌组织 PCNA 增生活性呈正相关, 提示 HIF-1 $\alpha$  过表达可促进肿瘤组织增生. HIF-1 $\alpha$  促进肿瘤细胞增生可能与 HIF-1 $\alpha$  促进 VEGF, IGF-1, IGF-2 等基因表达有关.

总之, 大肠肿瘤组织局部缺氧, HIF-1 $\alpha$  表达上调, 诱导其下游基因表达, 使肿瘤细胞适应缺氧环

境,反过来又抑制缺氧所致的凋亡及促进增生,使凋亡/增生进一步失衡,从而最终导致癌变发生发展。

#### 4 参考文献

- Birner P, Schindl M, Obermair A, Breiteneker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:1661-1668
- 张燕敏, 邓长生, 朱永庆, 毛永荣, 张可, 杨院平. 胃腺癌中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ RNA表达和血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:633-637
- Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:309-314
- Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, Schindl M, Rossler K, Proding A, Budka H, Hainfellner JA. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in oligodendrogliomas: Its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 2001;92:165-171
- Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S, Matsutani N, Kaio E, Ito M, Chayama K. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2003;105:176-181
- Shibaji T, Nagao M, Ikeda N, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Fukumoto A, Nakajima Y. Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2003;23:4721-4727
- Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1831-1837
- Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002;8(4 Suppl):S62-67
- Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern Med* 2002;41:79-83
- Choi KS, Bae MK, Jeong JW, Moon HE, Kim KW. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:120-127
- 黄耿文, 杨连粤. 缺氧致肿瘤恶性转化的分子机制. 世界华人消化杂志 2001;9:1300-1304
- Acker T, Plate KH. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med* 2002;80:562-575
- 樊利芳, 刁路明, 陈德基, 刘铭球, 朱丽琴, 李红钢, 唐志俊, 夏东, 刘绚, 陈洪雷. 肺癌组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的表达及其与凋亡和增生的关系. 癌症 2002;21:254-258
- Erlor JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ, Dive C. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* 2004;24:2875-2889
- Goda N, Dozier SJ, Johnson RS. HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:467-473
- Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrion CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 2003;29:297-307
- Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61:2911-2916
- Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breiteneker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-4696
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63:1138-1143
- 江从庆, 刘志苏, 钱群. 大肠腺瘤和腺癌组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的表达及其与 VEGF、微血管密度的关系. 癌症 2003;22:1170-1174
- Jiang YA, Fan LF, Jiang CQ, Zhang YY, Luo HS, Tang ZJ, Xia D, Wang M. Expression and significance of PTEN, hypoxia-inducible factor-1 alpha in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:491-494
- Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, Zehnbauser BA, Hamilton SR, Jones RJ. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:1811-1816
- 於亮亮, 于皆平, 冉宗学, 于红刚. 核因子- $\kappa$ B 与大肠肿瘤细胞凋亡及增生的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:309-312
- Yue SQ, Yang YL, Dou KF, Li KZ. Expression of PCNA and CD44mRNA in colorectal cancer with venous invasion and its relationship to liver metastasis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2863-2865
- Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002;64:889-892
- Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 2001;61:6548-6554
- Piret JP, Lecocq C, Toffoli S, Ninane N, Raes M, Michiels C. Hypoxia and CoCl<sub>2</sub> protect HepG2 cells against serum deprivation- and t-BHP-induced apoptosis: a possible anti-apoptotic role for HIF-1. *Exp Cell Res* 2004;295:340-349
- Kinoshita M, Johnson DL, Shatney CH, Lee YL, Mochizuki H. Cancer cells surviving hypoxia obtain hypoxia resistance and maintain anti-apoptotic potential under reoxygenation. *Int J Cancer* 2001;91:322-326
- Wang JH, Wu QD, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Hypoxia upregulates Bcl-2 expression and suppresses interferon-gamma induced antiangiogenic activity in human tumor derived endothelial cells. *Cancer* 2002;94:2745-2755
- Iervolino A, Trisciuglio D, Ribatti D, Candiloro A, Biroccio A, Zupi G, Del Bufalo D. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGFmRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *FASEB J* 2002;16:1453-1455
- Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999;154:375-384
- Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 2000;19:4621-4631
- 陈卫昌, 刘强, 李锐, 康苏娅. 结直肠癌微血管密度与增生细胞核抗原的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:1222-1224

# HBsAg 基因启动子 I DNA 结合蛋白 1 下调 IL-18 基因启动子

杨 媛, 洪 源, 成 军, 赵英仁, 黄燕萍, 王建军

杨媛, 赵英仁, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
洪源, 成军, 黄燕萍, 王建军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所  
基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
杨媛, 女, 1979-01-01 生, 陕西省西安市人, 汉族, 西安交通大学 2002 级  
硕士研究生, 主要从事病毒性肝炎的分子生物学发病机制的研究。  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队九五科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第  
302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实  
验室, cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

## Down-regulatory effects of HBsAg promoter I DNA binding protein 1 on IL-18 gene expression

Yuan Yang, Yuan Hong, Jun Cheng, Ying-Ren Zhao, Yan-Ping Huang, Jian-Jun Wang

Yuan Yang, Ying-Ren Zhao, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China  
Yuan Hong, Jun Cheng, Yan-Ping Huang, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689  
Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, 100 Xisihuan Zhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

## Abstract

AIM: To investigate the relationship between HBsAg promoter I DNA binding protein 1 (SBP1) and IL-18 promoter gene expression.

METHODS: Recombinant plasmid, named pcDNA3.1(-)-SBP1, were constructed by inserting a gene fragment of hepatitis B virus surface antigen promoter I DNA binding protein1 (SBP1) into pcDNA3.1(-). Then it was transfected into HepG2 cells transfected with pCAT3-IL-18P by FuGENE 6 transfection reagents. The activity of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) in HepG2 cells was detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA) after 48 h.

RESULTS: pcDNA3.1(-)-SBP1 was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The expression of CAT in HepG2 cells co-transfected with pCAT3-IL-18P and pcDNA3.1(-)-SBP1 was 0.37 times of that transfected with pCAT3-basic, and 0.17 times of that transfected with

pCAT3-IL-18P. The inhibitory rate was about 86.32%.

CONCLUSION: SBP1 can down-regulate the expression of IL-18P promoter, which provides new evidence to explain the molecular biological mechanisms of SBP1 in the interactions between IL-18P and hepatocytes.

Yang Y, Hong Y, Cheng J, Zhao YR, Huang YP, Wang JJ. Down-regulatory effects of HBsAg promoter I DNA binding protein 1 on IL-18 gene expression. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(12):2797-2800

## 摘要

目的: 研究 HBsAg 基因启动子 I DNA 结合蛋白 1(SBP1)与白介素-18(IL-18)基因表达的关系, 研究 SBP1 在 HBV 致病的分子生物学机制中的作用。

方法: 构建质粒 pcDNA3.1(-)-SBP1, pCAT3-IL-18, 转染 HepG2 细胞进行表达, 应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性。

结果: 构建的表达载体 pcDNA3.1(-)-SBP1 经过序列分析和酶切鉴定正确。真核表达载体 pcDNA3.1(-)-SBP1 和 pCAT3-IL-18P 共转染的 HepG2 细胞的 pCAT 表达活性是 pCAT3 空载体的 0.37 倍, 是转染 pCAT3-IL-18P 的 0.17 倍, 抑制率达到 86.32%。

结论: SBP1 可以下调 IL-18 启动子的活性, 抑制 IL-18 基因的表达。

杨媛, 洪源, 成军, 赵英仁, 黄燕萍, 王建军. HBsAg 基因启动子 I DNA 结合蛋白 1 下调 IL-18 基因启动子. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2797-2800  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2797.asp>

## 0 引言

应用酵母单杂交体系<sup>[1-3]</sup>, 以 SP I 核心序列为“诱饵”, 对人肝细胞 cDNA 文库进行了筛选, 得到了一个未知基因, 命名为 HBsAg 基因启动子 I 结合蛋白 1 (SBP1), 可下调 SP I 的转录活性, 表达谱基因芯片技术研究 SBP1 可上调白介素-18(IL-18). 目前认为 IL-18 的抗病毒机制重要通过分泌 INF- $\gamma$  从而调节免疫发挥抗病毒的作用<sup>[4]</sup>, 为了进一步研究 SBP1 与 IL-18 的作用的具体机制, 我们将 SBP1 和真核表达载体 pcDNA3.1(-)连接, 构建了表达质粒; 与 IL-18 启动子的 CAT 报告载体 -pCAT3-IL-18p 共转染, 旨在研究 SBP1 对

IL-18是否具有相互作用,使下游CAT基因的表达发生变化。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞系 HepG2 细胞及大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株为本室保存, pCAT3-IL-18P 为本室构建; Tag DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均购自 Takara 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒, 中间载体 pGEM-T 及报告质粒 pCAT3-basic 均购自 Promega 公司; CAT-ELISA 检测试剂盒及质粒 DNA 转染试剂盒购自 Roche 公司。其他生化试剂购自 Sigma 公司。由 Blastn 程序进行同源比对, 发现有 3 段 cDNA 片段与之同源, 分别为: BC033214, BI117624, BG981402, 进行同源拼接后, 发现该新基因开放读框(ORF)全长为 279 bp, 编码蛋白全长 92 aa, 位于第 6 号染色体, 无内含子序列。根据确定的基因序列的翻译起始位点到下游的 470 nt, 设计上游引物 5' - CTC GAG ACC ATG CCA ACA GGC CTG GTC AG -3', 下游引物 5' -GAA TTC TCT CCC CTG CAT GGC AAG TC-3' 其上下游引物两端分别加入 *Xho* I 和 *Eco* R I 限制性内切酶识别序列, 以 HepG2 细胞 mRNA 逆转录后的 cDNA 为模板, 经聚合酶链反应(PCR)扩增得到了 SBP1 的 DNA 全序列, PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 回收纯化。

**1.2 方法** 以 T-A 克隆法, 用 T4 DNA 连接酶将 SBP1 基因片段连入载体 pGEM-T Easy。将获得的质粒 pGEM-T-SBP1 和表达载体 pcDNA3.1(-) 分别用 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切后用 T4 DNA 连接酶进行定向连接, 产物转化 DH5 $\alpha$  宿主菌, 筛选抗氨苄青霉素阳性菌落; 提取质粒, 再次双酶切及 PCR 鉴定正向插入用 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切的 pcDNA3.1(-), 命名为 pcDNA3.1(-)-SBP1。DNA 测序由上海博亚公司完成。HepG2 细胞系在含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液中生长。细胞生长至 50-80% 时采用脂质体转染法, 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行, 设置 pCAT3-basic 为阴性对照组(每组 2 孔), 质粒 pCAT3-IL-18p 转染 48 h 后收获细胞。HepG2 细胞生长至 50-80% 时将 pcDNA3.1(-)-SBP1+pCAT3-IL-18P 加入细胞培养液中, 同时以转染 pCAT3-Basic 的 HepG2 细胞作阴性对照。转染 48 h 后, 收集细胞裂解液, 用于 CAT 活性检测。所有实验严格平行操作。CAT 含量检测 按照试剂盒说明书进行。取 1.0  $\mu$ g/L 的 CAT 标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液 200  $\mu$ L 加入已包被抗体的 96 孔板中, 37  $^{\circ}$ C 温育 2 h, 再依次加入第 1 抗体(地高辛标记的抗 -CAT)、第 2 抗体(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体抗 -DIG-POD) 200  $\mu$ L 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h 后, 加入过氧化物酶的底物室温显色 10-30 min。用酶标仪检测标本在 415 nm 波长的吸光度, 其数值反映细胞提取物中的 CAT 表达水平。以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照。

## 2 结果

SBP1 的 PCR 扩增产物以 HepG2 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增出全长为 470 bp 的 SBP1 序列(图 1)。构建的中间载体 pGEM-T-SBP1 以 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切电泳图谱为两条带 470 bp(SBP1 基因片段)和约 3 000 bp (pGEM-T 空载体)(图 2)。重组质粒 pcDNA3.1(-)-SBP1 分别以 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切及 DNA 序列测定均显示结果正确, pcDNA3.1(-)-SBP1 鉴定电泳图(图 3)表明, 该真核表达载体已构建成功。重组质粒 pcDNA3.1(-)-SBP1 与 pCAT3-IL-18P 共转染实验 空载体对照组 pCAT3 basic 的 CAT 的 A 值为 0.653, pCAT3-IL-18P 的 CAT 的 A 值为 1.755, 共转染 pCAT3-IL-18P/pcDNA3.1(-)-SBP1 的 HepG2 细胞 CAT 的 A 值为 0.240, 共转染 pCAT3-IL-18P/pcDNA3.1(-)-SBP1 的 CAT 的表达明显减弱, 抑制率为 86.3%, 说明 SBP1 对 IL-18 基因启动子有反式调节作用, 使其下游 CAT 基因的表达下降(图 4)。

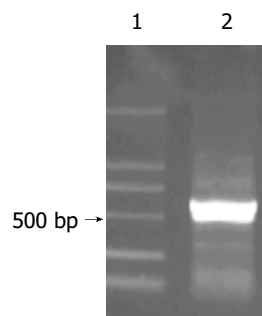


图 1 PCR 扩增 SBP1 启动子序列。1: Marker; 2: SBP1。

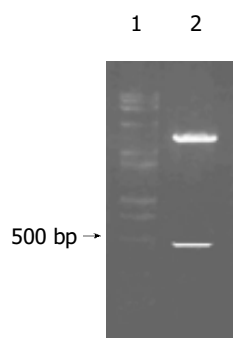


图 2 pGEM-T-SBP1 *Xho* I / *Eco* R I 双酶切鉴定图谱。1: Marker; 2: pGEM-T-SBP1。

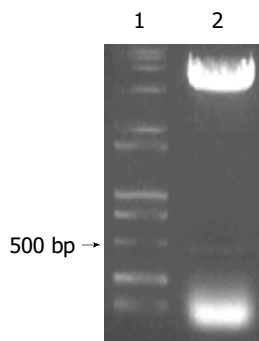


图 3 pcDNA3.1(-)-SBP1 *Xho* I / *Eco* R I 双酶切鉴定图谱。1: Marker; 2: pcDNA3.1(-)-SBP1。

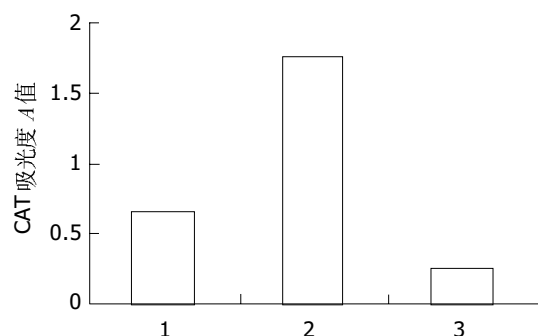


图4 CAT 酶表达结果. 1: pCAT3 basic; 2: pCAT3-IL-18P; 3: pcDNA3.1 (-)-SBP1+pCAT3-IL-18P.

### 3 讨论

HBV SP I 是 HBV 的一个重要转录元件, 调节 HBV 表面抗原大蛋白的表达. 现已证实 SP I 可与肝特异性核因子 1(HNF1)、HNF3、HNF4 特异结合, 这与 HBV 的嗜肝性有一定的关系<sup>[5-8]</sup>, 另外还有大量的非组织特异性的转录因子的存在, 如转录因子 Sp1, 八聚体转录因子(Oct-1)等也同样在 HBV 转录过程中发挥着重要的作用<sup>[9-12]</sup>. Raney *et al* 提出在 HNF1 结合位点下游的 5-10 bp 可能还有其他肝特异性蛋白的结合位点. 为了寻找新的肝特异结合蛋白, 我们以 SP I 核心序列为“诱饵”, 整合入酵母基因组, 构建了酵母报告株; 经加入人肝 cDNA 文库进行筛选, 得到了 12 个双阳性克隆, 为了对这一结果进行验证并深入研究 HBV 的转录调控机制, 我们选取了其中的一个未知功能基因为研究对象, 经用计算机分析、拼接后, 得到了他的编码序列, 命名为 SBP1. 我们已应用 CAT-ELISA 和基因芯片技术对 SBP1 的功能进行了初步研究, 现已证实 SBP1 可下调 SP I, SBP1 基因芯片的研究结果显示可增强 IL-18 的表达. IL-18 作为一种干扰素  $\gamma$ (IFN $\gamma$ )的诱导因子, 可在白介素-12(IL-12)存在的情况下作用于 Th1 细胞, 去极化的 T 细胞, NK 细胞, B 细胞, 树突细胞产生 IFN $\gamma$ <sup>[13-16]</sup>, IL-2 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF), 从而发挥重要作用<sup>[17-20]</sup>. IL-18 是一新的上调 Fas 配体(FasL)表达的细胞因子.

在慢性乙肝患者中 IL-18 的转录和表达水平与血清 ALT 水平呈明显相关性<sup>[21]</sup>. IL-18 在体内通过激活 Fas 通路发挥促肝细胞凋亡的作用<sup>[22]</sup>. 在患者感染了 HBV 后, 病毒本身与 IL-18 之间存在着复杂的相互作用, HBsAg 调节 IL-18 基因的转录, 通过诱导半胱天冬酶-1 来介导 IL-18 的分泌<sup>[23]</sup>. HBxAg 是一种主要的病毒转录因子, 通过从转录水平调节 IL-18 从而参与肝脏的炎症调控<sup>[24]</sup>, 我们已证实 HBx 可上调 IL-18 启动子的活性. 在 HBV DNA 疫苗的研究中发现, IL-18 可增强免疫鼠中特异的细胞毒 T 细胞(CTL)活性和 TH1 应答, 提示 IL-18 和 HBV DNA 疫苗的共免疫在慢性 HBV 感染的治疗中起着关键的作用, 对于 HBV 预防性和治疗性疫苗提供了一种免疫策略, IL-18 是一种很有前景的免疫佐剂<sup>[25]</sup>.

HBV 转基因鼠的肝脏中 IL-18 通过依赖 IFN $\gamma$  和干扰素  $\alpha/\beta$ (IFN $\alpha/\beta$ )的模式来发挥抑制 HBV 的非细胞病变的复制, 并且这种抗病毒的效果是与 IL-12 协同作用的结果. IL-18 的抗病毒效果是通过诱导自然杀伤(NK)和自然杀伤 T(NKT)细胞产生 IFN $\gamma$ , 另外, IL-18 在 IFN $\alpha/\beta$  缺乏的鼠中不能抑制 HBV 的复制, 提示 IFN $\alpha/\beta$  也有助于抗病毒效果的发挥. 这些结果提示 IL-18 通过在感染期间的自身限制达到控制 HBV 复制的效果, 并且对慢性肝炎患者有治疗的价值<sup>[26]</sup>.

基因芯片的研究发现 SBP1 可增强 IL-18, 为了验证 SBP1 和 IL-18 的结合以及 SBP1 对 IL-18 的调节作用, 以 pCAT3-IL-18p 为报告载体, 在人肝癌细胞系中对二者的相互作用进行了共转染验证. 结果证实, SBP1 的表达可下调 IL-18 的启动子活性, 表现为加入 SBP1 后使 IL-18p 下游的 CAT 表达活性降低. 这一结果证实了 SBP1 可与 IL-18p 结合, 且对 IL-18 的启动子活性有下调作用, 这点与基因芯片的结果不一致. 因此, 我们还需做大量的工作进一步研究 SBP1 的功能.

### 4 参考文献

- 1 洪源, 成军. 应用酵母单杂交技术筛选乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;13:337-339
- 2 Deplancke B, Dupuy D, Vidal M, Walhout AJ. A gateway-compatible yeast one-hybrid system. *Genome Res* 2004;14:2093-2101
- 3 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-760
- 4 Sun Y, Chen HY, Sin SJ. Effect of IL-18 on peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B and hepatitis B virus DNA released by Hepag2.2.15 cell lines Hepatobiliary. *Pancreat Dis Int* 2004;3:230-234
- 5 Jung D, Kullak-Ublick GA. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology* 2003;37:622-631
- 6 Locker J, Ghosh D, Luc PV, Zheng J. Definition and prediction of the full range of transcription factor binding sites- the hepatocyte nuclear factor 1 dimeric site. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3809-3817
- 7 Tang H, McLachlan A. Mechanisms of inhibition of nuclear hormone receptor-dependent hepatitis B virus replication by hepatocyte nuclear factor 3beta. *J Virol* 2002;76:8572-8581
- 8 Tang H, McLachlan A. Avian and Mammalian hepadnaviruses have distinct transcription factor requirements for viral replication. *J Virol* 2002;76:7468-7472
- 9 Kwun HJ, Jang KL. Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *Nucleic Acids Res* 2004;32:2202-2213
- 10 Yan P, Mao X, Wang L, Zha X, Lu C. HBV C promoter Sp1 binding sequence functionally substitutes for the yeast ARS1 ABF1 binding site. *DNA Cell Biol* 2002;21:737-742
- 11 Han HJ, Jung EY, Lee WJ, Jang KL. Cooperative repression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene expression by hepatitis B virus X protein and hepatitis C virus core protein. *FEBS Lett* 2002;518:169-172
- 12 Sytina EV, Pankratova EV. Oct-1 transcription factor--plasticity and polyfunctionality. *Mol Biol (Mosk)* 2003;37:755-767
- 13 Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001;19:423-474
- 14 Papadakis KA, Prehn JL, Landers C, Han Q, Luo X, Cha SC, Wei P, Targan SR. TL1A synergizes with IL-12 and IL-18 to enhance IFN-gamma production in human T cells and NK cells. *J Immunol* 2004;172:7002-7007

- 15 Mavropoulos A, Sully G, Cope AP, Clark AR. Stabilization of IFN- $\gamma$  mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells. *Blood* 2004;2:[Epub ahead of print]
- 16 Tsutsui H, Adachi K, Seki E, Nakanishi K. Cytokine-induced inflammatory liver injuries. *Curr Mol Med* 2003;3:545-559
- 17 Sun Y, Chen HY, Xin SJ. Effect of IL-18 on peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B and hepatitis B virus DNA released by HepG2.2.15 cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:230-234
- 18 Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:439-454
- 19 Biet F, Loch C, Kremer L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J Mol Med* 2002;80:147-162
- 20 Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis* 2003;187(Suppl 2):S370-384
- 21 Stuyt RJ, Netea MG, Van Krieken JH, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. Recombinant interleukin-18 protects against disseminated candida albicans infection in mice. *J Infect Dis* 2004;189:1524-1527
- 22 Finotto S, Siebler J, Hausding M, Schipp M, Wirtz S, Klein S, Protschka M, Doganci A, Lehr HA, Trautwein C, Khosravi-Fahr R, Strand D, Lohse A, Galle PR, Blessing M, Neurath MF, Khosravi-Fahr R. Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo. *Gut* 2004;53:392-400
- 23 Manigold T, Bocker U, Chen J, Gundt J, Traber P, Singer MV, Rossol S. Hepatitis B core antigen is a potent inducer of interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and patients with hepatitis B infection. *J Med Virol* 2003;71:31-40
- 24 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002;37:380-386
- 25 Chen JZ, Zhu HH, Liu KZ, Chen Z. Enhancing cellular immune response to HBV M DNA vaccine in mice by codelivery of interleukin-18 recombinant. *J Zhejiang Univ Sci* 2004;5:467-471
- 26 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002;76:10702-10707

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

• 消息 •

### *World Journal of Gastroenterology* 2005 年由半月刊改为周刊

本刊讯 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从2005年开始, *World Journal of Gastroenterology*(WJG)由半月刊改为周刊出版. 每月7, 14, 21, 28 日出版, 50 元/期, 全年48期, 邮发代号82-261, 北京报刊发行局发行. 2002-10-11 获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金. 2003-01 获得第二届国家期刊奖百种重点期刊. 2003-01-15 由月刊改为半月刊. 2003-04-15 WJG(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)全文电子版免费开通, 截至2004-06-15 点击次数为1816277. 2003-04-15 世界胃肠病学杂志社稿件处理系统开发成功, 并开始使用. 作者通过用户名和密码在网上查找到稿件的全部处理记录. 2004-05-06 自然出版集团出版的《*Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*》收录WJG. 经过多项学术指标综合评定及同行多位专家评审推荐, WJG 被收录为国家科技部中国科技论文统计源期刊和中国科技核心期刊, 时间为2004-03/2006-03. 1998-01-15 / 2004-03-01 ISI SCI 收录期刊389种引用WJG出版的论文687篇分布39个国家. 引用WJG的SCI高影响因子期刊包括自然医学28.740(Nature Medicine), 细胞27.254(Cell), 自然神经科学综述24.047(Nature Reviews Neuroscience), 自然细胞生物学20.699(Nature Cell Biology), 基因与发育(Genes & Development)18.772, 柳叶刀15.397(Lancet), 自然神经科学14.857(Nature Neuroscience), 神经元13.846(Neuron), 自然癌症综述13.625(Nature Reviews Cancer), 胃肠病学13.440(Gastroenterology), 肝脏学9.825(Hepatology), 等国际顶级期刊. 引用WJG的作者分布于687个机构, 其中包括华盛顿大学医学院(Washington Univ, Sch Med), 耶鲁大学(Yale Univ), 康奈尔大学(Cornell Univ), 明尼苏达大学(Univ Minnesota), 斯坦福大学医学中心(Stanford Univ, Ctr Med), 加州大学旧金山分院(Univ Calif San Francisco), 美国国立卫生研究院(National Institute of Health), 伦敦帝国大学等国际著名大学或研究机构. 2004-06-11 被CAB Abstracts, CAB Global Health 收录.(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

# 噬菌体展示技术筛选 HBV 前-前-S 抗原基因启动子结合蛋白基因

黄燕萍, 成军, 张树林, 杨艳杰, 高学松, 钟彦伟, 杨 瑗, 白桂芹, 蔺淑梅

黄燕萍, 成军, 杨艳杰, 高学松, 钟彦伟, 杨瑗, 白桂芹, 蔺淑梅, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
黄燕萍, 女, 1963-04-23 生, 陕西省西安市人, 汉族, 2002 年西安交通大学内科学博士研究生, 副教授, 主要从事传染病的临床与基础研究。  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队九五科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

## Screening of binding protein of hepatitis B virus pre-pre-s promoter by phage display technique

Yan-Ping Huang, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Yan-Jie Yang, Xue-Song Gao, Yan-Wei Zhong, Yuan Yang, Gui-Qin Bai, Shu-Mei Lin

Yan-Ping Huang, Jun Cheng, Yan-Jie Yang, Xue-Song Gao, Yan-Wei Zhong, Yuan Yang, Gui-Qin Bai, Shu-Mei Lin, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China  
Shu-Lin Zhang, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, 100 Xisihuan Zhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

## Abstract

**AIM:** To screen the binding protein gene of hepatitis B virus pre-pre-s promoter using phage display technique.

**METHODS:** Taking HBV pre-pre-S promoter as a solidified selective molecule, the phage-human liver cDNA library was biopanned and the positive clones were selected. The positive plaques were amplified and then cloned into pGEM-Teasy vector. The selected positive plaques were analyzed using bioinformatics and DNA sequencing.

**RESULTS:** Twenty positive clones were obtained, which included 17 clones with known function and 3 with unknown function.

**CONCLUSION:** The binding protein genes of HBV pre-pre-s promoter can be obtained by phage display technique,

which may be helpful for further study of the pathogenesis of HBV infection.

Huang YP, Cheng J, Zhang SL, Yang YJ, Gao XS, Zhong YW, Yang Y, Bai GQ, Lin SM. Screening of binding protein of hepatitis B virus pre-pre-s promoter by phage display technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(12):2801-2804

## 摘要

**目的:** 筛选乙型肝炎病毒(HBV)前-前-S抗原基因启动子的结合蛋白。

**方法:** 应用噬菌体表面展示技术, 以 HBV 前-前-S 抗原基因启动子的聚合酶链反应产物作为固相筛选分子, 对噬菌体人肝细胞 cDNA 文库进行 4 轮“黏附-洗脱-扩增”的筛选过程, 经噬斑的 PCR 扩增后, 构建克隆载体, 并对所筛选克隆进行 DNA 测序和生物信息学分析。

**结果:** 噬菌体经富集后, 从随机筛选的 43 个克隆中得到 20 个与 HBV 前-前-S 抗原基因启动子特异结合的阳性克隆, 包括人类 SMG-1 的磷脂酰肌醇 3 相关激酶激酶、28 S 核糖体、单倍型 A<sub>2</sub>A 线粒体、组氨酰-tRNA 合成酶、脂肪醛脱氢酶、桥粒相关蛋白、MAX 相互作用蛋白 1 等 17 个已知功能基因及 3 个未知功能基因。

**结论:** 用噬菌体人肝细胞 cDNA 文库筛选得到 HBV 前-前-S 抗原基因启动子的结合蛋白基因, 为进一步研究 HBV 发病机制创造了新的途径。

黄燕萍, 成军, 张树林, 杨艳杰, 高学松, 钟彦伟, 杨瑗, 白桂芹, 蔺淑梅. 噬菌体展示技术筛选 HBV 前-前-S 抗原基因启动子结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(12):2801-2804  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2801.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个全球性健康问题<sup>[1]</sup>. 虽然部分慢性乙型肝炎患者对于干扰素、核苷类似物拉米夫定等治疗有一定的疗效<sup>[2]</sup>, 但目前仍无确切有效的治疗方案, 其主要原因是 HBV DNA 复制的生物学机制不十分清楚. HBV 是一个很小的包膜蛋白, 其基因组结构精密, 约有 3 200 个碱基对(bp). 前-S1, 前-S2 和表面抗原蛋白按照同一开放读框(in frame)顺序进行翻译. 董菁 *et al*<sup>[3]</sup> 发现在前-S1 上游存在新的 ORF, 命名为前-前-S 基因, 并在已克隆的 HBV 基因组得到证



实,且在甘人宝 *et al*、Mukalde *et al*、Okamoto *et al* 报告的 HBV 基因组序列中均存在前-前-S 区<sup>[4]</sup>,杨倩 *et al*<sup>[5]</sup>又确定了前-前-S 基因启动子的序列和活性鉴定.我们采用 HBV 前-前-S 基因启动子作为固相靶分子,用噬菌体表面展示的人肝 cDNA 文库来筛选特异的 HBV 前-前-S 基因启动子结合蛋白,以探讨 HBV 前-前-S 在 HBV 感染发病机制中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** T7 Select 人肝细胞 cDNA 文库、受体菌 BLT5615(Novagen 公司);质粒 pGEM-T easy (Promega 公司);Taq 酶、琼脂糖、dNTP、T4 连接酶、RNA 酶、玻璃奶 DNA 回收试剂盒(博大科技)、*Eco*R1、*Bam*H1、*Mlu*I、*Xho*I(宝生物公司).热循环仪、凝胶成像仪、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本研究中心保存.将新鲜 BLT5615 克隆接种于 LB/Amp 3 mL, 37 °C 过夜.在 LB/Amp 3 mL 内加入振荡细菌 30  $\mu$ L, 将细菌浓度摇至  $A_{600} = 0.5$ , 加入 0.1 mol/L IPTG 30  $\mu$ L 诱导, 37 °C 再振荡 30 min 后加入噬菌体文库 5  $\mu$ L. 37 °C 振荡 1-2 h 观察至细菌裂解, 停摇. 8 000 g, 离心 10 min, 将上清液移至无菌 Eppendorf (Ep)管中. 4 °C 保存.

### 1.2 方法

**1.2.1 HBV 前-前-S 启动子扩增和生物筛选** 根据我室 HBV DNA 基因组序列确定前-前-S 基因的转录起始点, 选取其上游 277 bp, 设计并合成引物, 在上下游引物的 5' 端分别加上 *Mlu*I 和 *Xho*I 位点序列, 并且以生物素标记, 上游引物 P1: 5' -ACG CGT CTC GGG AAT CTC AAT GTT AG-3', 下游引物 P2: 5' -CTC GAG CCG GAT AAT AGG GTT TAA TGC C-3', 由上海博亚生物技术有限公司合成. 在 0.2  $\mu$ L Ep 管中依次加入 10  $\times$  缓冲液(含 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 2.5  $\mu$ L, 无菌水 17.3  $\mu$ L 2 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L P1 和 P2 各 1  $\mu$ L, HBV 基因组为模板 1  $\mu$ L, Taq 酶(5MU/L)0.2  $\mu$ L. 于 PE 9600 PCR 仪中扩增. 扩增条件: 94 °C 变性 50 s, 52 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 循环 35 次. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果, 玻璃奶回收 DNA 片段. 生物筛选链亲和素 15  $\mu$ L(1 g/L)包被微孔板, 4 °C 过夜. 1  $\times$  TBS 洗涤, 加入回收的前-前-S 启动子 DNA 100  $\mu$ L, 4 °C 过夜. 1  $\times$  TBST(5 g/L Tween-20)洗涤 2 遍, 加入文库扩增裂解液 110  $\mu$ L, 4 °C 过夜. 1  $\times$  TBST 洗涤 5 遍, 加入 T7 洗脱缓冲液 100  $\mu$ L, 室温孵育 20 min, 将洗脱液移至另一无菌管中. 将洗脱噬菌体 10  $\mu$ L 加入对数生长期的 BLT5615 细菌培养液 3 mL 中, 37 °C 振荡培养, 看到细菌裂解时停摇. 10 000 g 离心 10 min, 取上清液 1 mL 移到新的 Ep 管, 4 °C 保存, 待下一轮筛选时用. 每轮筛选后均作噬斑分析. 以同样步骤筛选 4 轮.

**1.2.2 噬斑 PCR 扩增及克隆载体的构建鉴定** 用 Tip 头刮取第 4 轮筛选后的阳性噬斑, 并以阳性噬斑对细菌

的裂解上清液(噬菌体 DNA)作为模板, 进行噬斑 PCR 扩增. T7 Select 上游引物 P3: 5' - GGA GCT GTC GTA TTC CAG TC-3'; P4 下游引物 P4: 5' -AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA-3' 扩增条件: 94 °C 变性 50 s, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果, 玻璃奶回收 DNA 片段. 将纯化的 PCR 产物连接到 pGEM-Teasy 载体后, 转化到用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒, 进行酶切鉴定. 选择经酶切鉴定阳性的相应克隆送检测序, 序列测定由上海博亚生物公司完成. 测序结果在 GenBank 数据库中进行同源序列比较, 并进行分析.

## 2 结果

**2.1 肝细胞 cDNA 文库的筛选** 以固相化的 HBV 前-前-S 启动子 DNA 片段作为支持分子, 对肝细胞 cDNA 文库进行 4 轮“黏附-洗脱-扩增”的筛选. 第 4 轮与第 1 轮相比富集了 1.8 倍(富集倍数 = 第 4 轮产出率 / 第 1 轮产出率, 表 1).

表 1 亲和筛选对噬菌体的富集

筛选次数	噬菌体数		产出率(%)
	投入	捕获	
第 1 轮	$2.9 \times 10^9$	$3.0 \times 10^{10}$	10
第 2 轮	$3.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^{10}$	7
第 3 轮	$2.0 \times 10^9$	$1.1 \times 10^{10}$	6
第 4 轮	$1.1 \times 10^9$	$2.0 \times 10^{10}$	18

产出率 = 捕获的噬菌体数量 / 投入的噬菌体数量.

**2.2 目的基因的 PCR 扩增** 经过 4 轮筛选, 随机挑取 43 个噬斑为模板, 用 T7 Select 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 结果显示所筛选到的肝细胞文库中大小不等的基因片段(图 1).

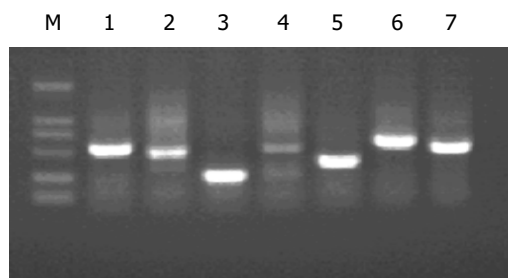


图 1 部分噬斑 PCR 结果. M: DNA 2 000 标准; 1-7: 阳性噬斑 PCR 扩增 DNA 片段.

**2.3 目的基因克隆载体的酶切鉴定** 经过 4 轮筛选及噬斑 PCR 扩增鉴定, 获得了 20 个阳性克隆, 将 PCR 产

物连接到 pGEM-T easy 载体上, 从 LB/Amp 平板中随机挑取白色菌落, 摇菌过夜扩增重组子 DNA, 酚/氯仿抽提和 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳初筛. 将重组子用 *Eco*R1 酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示切出 3 000 bp 和大小不等的片段(图 2), 证明重组子带有不同大小的目的 DNA 片段.

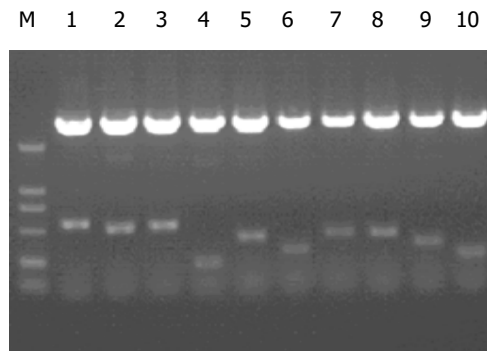


图2 部分目的基因克隆载体的酶切鉴定. M: DNA 2000 标准; 1-10 为酶切后不同目的基因片段.

**2.4 cDNA 测序与同源性分析** 挑选 43 个克隆测序, 测序结果与 GenBank 数据库进行初步比较, 筛选出 20 个与 HBV 前-前-S 抗原基因启动子特异结合蛋白, 包括人类 SMG-1 样的磷脂酰肌醇 3 相关激酶激酶、28S 核糖体、单倍型 As2A 线粒体、组氨酰-tRNA 合成酶、脂肪醛脱氢酶、桥粒相关蛋白、MAX 相互作用蛋白 1 等 17 个已知功能基因及 3 个未知功能基因, 同源性为 96-100%(表 2).

表2 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
1	人类 SMG-1 样的磷脂酰肌醇 3 相关激酶激酶	5	98-100
2	人类核孔复合体相互作用蛋白	5	97-99
3	人类 28S 核糖体	1	99
4	人类单倍型 As2A 线粒体	2	100
5	人类组氨酰-tRNA 合成酶	1	100
6	人类脂肪醛脱氢酶(ALDH10)	1	99
7	人类桥粒相关蛋白	1	98
8	人类 MAX 相互作用蛋白 1	1	99
9	人类未知功能基因	3	96-100
10	无法分析的序列	23	

### 3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)是一种 DNA 病毒, 在其生活周期中存在着独特的 DNA-RNA-DNA 的复制过程, 感染肝细胞后, 在肝细胞中完成复制和表达的生活周期, 肝细胞中的一些调节蛋白与调节基因序列结合后, 可对其生活周期进行调节, 翻译而成的蛋白不仅完成病毒颗粒自身的装配, 而且在肝细胞中可产生一系列的生物

学效应. 肝炎病毒蛋白、肝炎病毒调节基因序列通过蛋白与蛋白、DNA 与蛋白之间的结合, 对肝细胞基因组表达谱调节, 影响肝细胞正常的代谢和信号转导途径, 进而影响肝细胞的细胞周期<sup>[6-7]</sup>、细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>、细胞的恶性转化等过程<sup>[10-11]</sup>. 噬菌体展示技术<sup>[12]</sup>是 1980 年代中期发明的一项新技术, 可以展示真正表达的蛋白质或多肽片段, 在噬菌体表面可保持筛选蛋白折叠后的空间结构, 该系统可模拟细胞编码蛋白的真实情况. 我们应用噬菌体展示技术从肝细胞 cDNA 文库中筛选到了几种不同的 HBV 前-前 S 抗原基因启动子的特异结合蛋白.

核孔复合体(NPC)是一种巨大的蛋白复合物, 他插在核外膜的双层膜中, 他作为一种装配的可溶性渠道起作用, 是允许与 NPC 成分作用的转运受体进出的选择性通道. 不同可溶性转运受体可以识别许多转入或转出细胞核的转运物质, 并携带载物到达各自的目标物. 所有的核转运因子可以双向通过 NPC, 这是通过与富含苯丙氨酸和甘氨酸的 NPC 成分特定的相互作用完成的. 核质转运通过 NPC 转移定位, 具有高度选择性并非常迅速. 输入蛋白或输出蛋白介导的转运所需要的能量来源只能由 RanGTP 周期提供, 他可通过调节底物接合和释放反应来进行定向转移. 由于核糖体亚基的复杂生物合成性, 对核糖体从核中转出的分析一直很难, 通过系列研究表明 40 S 转出要求 RanGTP 酶周期及核孔蛋白; 几种核孔蛋白的突变及 Ran 周期的成员突变禁止 60 S 转运; 60 S 成熟化与核释放以及转运到细胞质有紧密联系. 核孔复合体相互作用蛋白(NPIP), 由免疫荧光显微术证实定位于核膜, 与核孔 P62 共区域化<sup>[13-15]</sup>. 通过噬菌体展示技术筛选到的 HBV 前-前 S 启动子的结合蛋白 NPIP, 是否能提示 HBV 感染后, 影响肝细胞核孔复合体功能, 影响核糖体的成熟, 从而影响肝细胞蛋白的合成及功能.

值得注意的是我们还筛选到 HBV 前-前 S 启动子的另一个结合蛋白是磷脂酰肌醇 3 激酶相关激酶(PIKK)与信号转导密切相关. 信号转导是指外部的信号通过细胞膜上的受体蛋白传到细胞内部, 并激发出诸如离子通透性、细胞形状或其他细胞功能改变的应答过程. PIKK 家族是细胞周期的主要调节剂<sup>[16]</sup>. 磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)是细胞内信号转导系统的一条通道, 是肌醇磷脂信使系统的重要组成部分, 介于细胞受体与第二信使之间的信号转导途径, 在细胞生物学功能中起到重要作用. PI3K 通过将第二信使前体磷酸化而转导信息, 所产生的第二信使可能参与细胞代谢、生长分化、基因表达、细胞凋亡等过程. 外源性蛋白如病毒蛋白可通过 PI3K 途径导致细胞凋亡或癌变, 有研究发现 PI3K 激活丝/苏氨酸激酶-Akt, 并可能级联放大下游抑癌基因表达达到抑制细胞凋亡目的<sup>[17-20]</sup>. 磷脂酰肌醇 3 激酶作为胰岛素信号转导中的关键酶, 在调节糖代谢中起重要作用<sup>[21-23]</sup>. 2 型糖尿病和胰岛素抵抗 (IR)患者中, PI3K

的含量和活性均降低,并存在对胰岛素刺激的反应缺陷。T、B细胞活化过程中涉及到多种磷脂酰肌醇的产生及其调节,不同种的磷脂酰肌醇可分别激活下游的信号蛋白,使得信号逐级传递,通过信号蛋白激活T、B细胞内的多种酶活化途径,最终导致T、B细胞的增生、活化,合成并发挥其生物学功能<sup>[21, 24-26]</sup>。肝慢性损伤及炎症反应时,常伴有多种可影响不同靶细胞的可溶性物质被激活,如血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)及其受体(PDGF receptor, PDGF-R)的表达常可增强。PI3K参与细胞内PDGF信号转导,活化的PDGF-R可使PI3K内的酪氨酸残基磷酸化,从而促进HSC增生及趋化,PI3K下游效应分子有蛋白激酶C、40S核糖体蛋白S6激酶等<sup>[27]</sup>,PI3K可催化磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸之D3位磷酸化,其产物磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸可激活PKC基因,而后者可激活Ras,而Ras/MAPK通路与PDGF诱导HSC增生及移动有关。

我们通过噬菌体展示技术筛选到的部分HBV前-前-S启动子基因结合蛋白为阐明HBV感染的慢性化和肝细胞癌形成的机制、并发症的发生机制以及机体免疫功能改变提供了新的研究方向和思路。

#### 4 参考文献

- Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004;11:97-107
- Ciancio A, Smedile A, Rizzetto M, Lagget M, Gerin J, Korba B. Identification of HBV DNA sequences that are predictive of response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2004;39:64-73
- 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. *解放军医学杂志* 2002;27:116-118
- 杨倩, 成军, 董菁, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组新基因的研究及意义. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004;13:72-75
- 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:761-762
- 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:73-76
- 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变性的机制及其意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:999-1003
- 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:469-471
- 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. *世界华人消化杂志* 2003;11:880-889
- 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
- 张忠东, 成军, 张树林. 噬菌体展示技术的原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:459-461
- Allen NP, Patel SS, Huang L, Chalkley RJ, Burlingame A, Lutzmann M, Hurt EC, Rexach M. Deciphering networks of protein interactions at the nuclear pore complex. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:930-946
- Johnson ME, Viggiano L, Bailey JA, Abdul-Rauf M, Goodwin G, Rocchi M, Eichler EE. Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes. *Nature* 2001;413:514-519
- Ben-Efraim I, Gerace L. Gradient of Increasing Affinity of Importin  $\beta$  for Nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J Cell Biol* 2001;152:411-417
- Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* 2003;2(4 Suppl 1):169-177
- Matsuoka M, Igisu H. Cadmium induces phosphorylation of p53 at serine 15 in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:1120-1125
- Yamashita A, Ohnishi T, Kashima I, Taya Y, Ohno S. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 2001;15:2215-2228
- Rogoff HA, Pickering MT, Debatis ME, Jones S, Kowalik TF. E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:5308-5318
- Jackowski S, Voelker DR, Rock CO. Inositol metabolism and cell growth in a Chinese hamster ovary cell myo-inositol auxotroph. *J Biol Chem* 1988;263:16830-16836
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:615-675
- Kossila M, Pihlajamaki J, Karkkainen P, Miettinen R, Kekalainen P, Vauhkonen L, Yla-Herttuala S, Laakso M. Promoter polymorphisms -359T/C and -303A/G of the catalytic subunit p110 $\beta$  gene of human phosphatidylinositol 3-kinase are not associated with insulin secretion or insulin sensitivity in finnish subjects. *Diabetes Care* 2003;26:179-182
- Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 2002;16:769-777
- Koyasu S. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 2003;4:313-319
- Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K-signalling in B- and T-cells: insights from gene-targeted mice. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 1):270-274
- Inabe K, Ishiai M, Scharenberg AM, Freshney N, Downward J, Kurosaki T. Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J Exp Med* 2002;195:189-200
- 董菁, 成军. 磷脂酰肌醇3激酶信号转导系统与肝炎病毒. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003;12:217-219

# 大鼠孤束核在五羟色胺介导的胰腺外分泌中的作用

夏青, 李兆申, 屠振兴, 龚燕芳, 满晓华

夏青, 李兆申, 屠振兴, 龚燕芳, 满晓华, 中国人民解放军第二军医大学  
长海医院消化内科 上海市 200433  
夏青, 女, 1978-09-13 生, 江苏省建湖县人, 汉族, 2001 年第二军医大学长  
海医院消化内科硕士生, 住院医师, 主要从事消化内科的临床工作。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30270504  
项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海  
医院消化内科, zhsl@81890.net  
电话: 021-25070552 传真: 021-55620081  
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-25

## Role of nucleus tractus solitarii in pancreatic secretion induced by 5-hydroxytryptamine in rats

Qing Xia, Zhao-Shen Li, Zhen-Xing Tu, Yan-Fang Gong,  
Xiao-Hua Man

Qing Xia, Zhao-Shen Li, Zhen-Xing Tu, Yan-Fang Gong, Xiao-Hua Man,  
Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military  
Medical University, Shanghai 200433, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30270504  
Correspondence to: Dr Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology,  
Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai  
200433, China. zhsl@81890.net  
Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-09-25

### Abstract

AIM: To investigate the role of nucleus tractus solitarii (NTS) in pancreatic secretion induced by 5-hydroxytryptamine (5-HT) in rats and to further elucidate the related neural substance.

METHODS: Twenty-four rats were randomly divided into NaCl group, 5-HT group and sham operation group. Rats in NaCl and 5-HT groups were given NaCl (0.86 mol/L) and 5-HT ( $10^{-4}$  mol/L) via duodenum respectively and the mixture of bile and pancreatic juice was collected every 15 min. Protein content of the mixture was measured with BCA protein assay. EnVision Immunohistochemical method and double-label immunohistochemistry (immunoenzyme-fluorescence) were used to detect the quantity of c-Fos and NK1-R positive cells in intermediate-medial NTS (mNTS), rostral (rNTS) and caudal regions (cNTS).

RESULTS: The number of c-Fos positive cells was significantly increased in NaCl and 5-HT group as compared to that in sham operation group in rNTS, mNTS and cNTS ( $P < 0.01$ ), and in cNTS, the number was significantly larger in 5-HT group than that in NaCl group  $22.00 \pm 1.80$  vs  $18.50 \pm 1.71$ ,  $P < 0.01$ ). Moreover, NK1-R was expressed in the regions where c-Fos expression was enhanced by duodenal stimulation of NaCl and 5-HT, but this did not happen in sham operation group. After infusion of NaCl and 5-HT, pancreatic protein secretion was increased ( $P < 0.01$ ). And the content of pancreatic protein was significantly higher than that in 5-HT and NaCl groups ( $29.6 \pm$

$1.4$  mg/15 min vs  $18.1 \pm 2.4$  mg/15 min,  $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: NTS plays a role of sensing and processing information on pancreatic protein secretion induced by 5-hydroxytryptamine, in which the receptor of P substance may take a part.

Xia Q, Li ZS, Tu ZX, Gong YF, Man XH. Role of nucleus tractus solitarii in pancreatic secretion induced by 5-hydroxytryptamine in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(12):2805-2808

### 摘要

目的: 探讨在五羟色胺(5-HT)介导的胰腺外分泌中, 大鼠孤束核所起的作用, 并进一步阐明与这些作用相关的神经物质。

方法: 在十二指肠内恒流灌注 0.86 mol/L NaCl、 $10^{-4}$  mol/L 5-HT, 然后对各处理组中不同的孤束核切面(孤束核嘴侧平面、中间平面、尾侧平面)进行 c-Fos 免疫组化、c-Fos-NK1-R 双重免疫组化染色方法(免疫荧光-免疫酶学), 同时计数其中 c-Fos 阳性细胞数, 并行定量分析; 另外每 15 min 收集胆胰混合液一次, 测定胰液蛋白含量。

结果: 在孤束核各平面, 5-HT 组、0.86 mol/L NaCl 组内 c-Fos 阳性神经元数量均高于假手术组( $P < 0.01$ ), 且在孤束核尾侧平面 5-HT 组( $22.00 \pm 1.80$ )明显高于 0.86 mol/L NaCl 组( $18.5 \pm 1.7$ )( $P < 0.01$ ), 另外两组在孤束核内的 c-Fos 阳性表达密集区域内均有 NK1-R 表达, 而假手术组则未见 c-Fos 与 NK1-R 很好的重叠。胰蛋白测定方面: 与假手术组胰液蛋白相比, 5-HT 组以及 0.86 mol/L NaCl 组在实验进行 60 min(灌注后 15 min)至 135 min 均有明显升高, 有统计学意义( $P < 0.01$ ); 且 5-HT 组( $29.6 \pm 1.4$  mg/15 min)与 0.86 mol/L NaCl 组( $18.1 \pm 2.4$  mg/15 min)相比较, 胰蛋白含量增加更为明显( $P < 0.01$ )。

结论: 在 5-HT 介导的胰液蛋白分泌中, 大鼠孤束核起着感知及整理信息的作用, 且这种作用的发挥与 P 物质受体有关。

夏青, 李兆申, 屠振兴, 龚燕芳, 满晓华. 大鼠孤束核在五羟色胺介导的胰腺外分泌中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2805-2808  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2805.asp>

### 0 引言

随着对胰腺外分泌的深入研究, 胰腺外分泌的神经调节机制备受关注, 尤其在迷走神经方面的研究. 目前

CCK 因素、5-HT 因素(如麦芽糖、高渗盐)都已报道可以经迷走神经,最终引起胰液蛋白的变化,且二者作用并无依赖性<sup>[1]</sup>。另外在 CCK 因素方面, Glatzie *et al*<sup>[2]</sup> 用免疫组化的方法证实: 正餐后, CCK 的分泌可以引起孤束核(迷走神经在中枢的投射核团)内的 c-Fos 阳性神经元表达增加,说明胆囊收缩素(cholecystikinin octapeptide, CCK)引起的胰腺外分泌增加可能由孤束核(nucleus of solitary tract, NTS)参与调节。但 NTS 是否也参与了 5-HT 介导的胰腺外分泌改变,以及他在其中所起作用至今尚无报道。因此我们应用 c-Fos 蛋白(神经元激活的标志物)表达为指标,观察十二指肠内给予高渗盐(即内源性 5-HT)及外源性 5-HT 刺激后,延髓 NTS 中神经元激活状况,及其与 P 物质受体的关系,同时观察胰液蛋白变化,以丰富胰腺外分泌在神经调节方面的研究。

## 1 材料和方法

1.1 材料 兔抗大鼠 c-Fos 抗体为 Santa-Cruz 公司产品,豚鼠抗大鼠 NK1-R 抗体为: Evenson 二抗购自 Dako 公司;辣根过氧化物酶购自华美生物工程公司。Alexa Fluor 546 标记的二抗为 Molecular probes 公司。Zymed 公司的 SP 通用型试剂和盒。Pierce 公司的 BCA 蛋白质检测试剂盒。

1.2 方法 健康  $\delta$  SD 大鼠 24 只,体重 200–250 g,清洁级,第二军医大学动物实验中心提供。适应性饲养 1 wk 后开始实验。实验前 1 d 禁食,自由饮水。实验前 2 h 禁水。然后随机分为 3 组: 0.86 mol/L NaCl 组、 $10^{-4}$  mol/L 5-HT 组、假手术组,每组 8 只。用 20 g/L 氯胺酮(80 mg/kg) ip 麻醉后,于十二指肠上端(幽门口下 5 cm)插入动静脉留置针。在十二指肠下端(距上端 20 cm)再插入一多聚乙烯管,同时结扎幽门口,以防反流,自十二指肠乳头处循胰管插入静脉留置针,收集胆胰混合液。应用电热毯尽量将腹腔保持在 37 °C。灌前分别收集 15、30、45 min 的胆胰混合液,然后在十二指肠分别恒流灌注 0.86 mol/L NaCl、 $10^{-4}$  mol/L 5-HT 组,流速 3 mL/h,收集 60、75、90、105、120、135 min 的胆胰混合液。假手术组开腹插管,并留置 135 min,同时在上述时间段收集胆胰混合液。然后,开胸经升主动脉插管,先后用生理盐水 100–150 mL、40 g/L 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液 400 mL 冲洗,固定脑组织。取脑于含 200 g/L 蔗糖的 PB 内(4 °C),直至组织块沉底。切取自脑(obex)平面向吻尾侧各 2 000  $\mu$ m 的延髓,行冰冻冠状切片,片厚 10  $\mu$ m。分为 3 套: 第 1 套行 c-Fos 免疫组化,第 2 套行 c-Fos-NK1-R 双重免疫组化,第 3 套行尼氏(Nissl)染色,检查、核准脑干内相关结构的范围和界限。免疫组织化学(Evenson)法反应: 切片经 3 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、含 3 g/L TritonX-100 的 PBS、10 g/L BSA 分别处理 30 min 后加入兔抗 c-Fos 抗体(1:400)置 4 °C 下孵育 24 h, Evenson 二抗孵育 1 h, DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液镜控显色,衬染、蓝化、脱水、透明、封片。PBS 代替一抗、二抗作为阴性对照。显微镜(Olympus Bx-50)下明视野观察、计数、摄

影。双重免疫组化反应(免疫酶学-免疫荧光): 切片经 3 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、含 3 g/L TritonX-100 的 PBS、10 g/L BSA 分别处理 30 min 后加入豚鼠抗 NK1-R 抗体(1:800)置 4 °C 下孵育 48 h, 通用性生物素化二抗孵育 30 min, 滴加链霉卵白素-碱磷酶耦合物 30 min, DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液镜控显色。含 3 g/L TritonX-100 的 PBS、10 g/L BSA 分别处理 30 min 后,然后滴加兔抗 c-Fos 抗体(1:200), 4 °C 孵育 48 h, 荧光二抗(1:200)避光保存 6 h, 甘油封片, 荧光显微镜下观察拍照, PBS 洗去甘油, 衬染、蓝化、脱水、透明、中性树脂封片。PBS 代替一抗、二抗作为阴性对照。光学显微镜(Olympus Bx-50)下明视野观察、计数、摄影。将 NTS 依据形态和所在平面位置, 自尾侧向吻侧分为 3 个平面<sup>[3]</sup>: (1) NTS 尾侧平面(cNTS), Obex+500。 (2) NTS 中间平面(mNTS), Obex-500 包绕最后区。 (3) NTS 嘴侧平面(rNTS), Obex-1000, 以内侧边界被 IV 脑室分离为标志的 NTS 中间核区域。定位参照包新民等编著的《大鼠脑立体定位图谱》。细胞核内出现棕黄色颗粒即为阳性, 部分胞质内也可有棕黄色颗粒。取每只动物各区对应的典型平面, 于孤束核内取随机视野数出 100 个细胞, 计数其中阳性细胞数, 作为该区 FOS 阳性细胞数。免疫酶学-免疫荧光可见 c-Fos 阳性细胞即荧光显微镜下出现点状的红色荧光, NK1-R 阳性细胞即光镜下细胞树突出现棕黄色颗粒。

统计学处理 所有数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。通过 SPSS10.0 统计软件, 采用非参数统计方法对各组均数进行显著性检验。

## 2 结果

2.1 c-Fos 免疫组化 不同处理组大鼠各平面 NTS 均可见神经细胞的细胞核及部分胞质中含有棕黄色颗粒即 c-Fos 阳性神经元, 尤其在 0.86 mol/L NaCl 及 5-HT 组, 如图 1A、1B 所示。但各处理组在不同平面的 c-Fos 阳性神经元数量有差异: 与假手术组相比, 0.86 mol/L NaCl 组、 $10^{-4}$  mol/L 5-HT 组 c-Fos 阳性神经元数量明显增加( $P<0.01$ ), 具体数值(图 2)。假手术组: c-NTS 区与 r-NTS、m-NTS 区比较, 均无统计学意义。0.86 mol/L NaCl 组: c-NTS 区阳性神经元数量最多, 分别多于 m-NTS 以及 r-NTS 区,  $P<0.01$ , 而 m-NTS 多于 r-NTS 区; 5-HT 组: c-NTS 区阳性神经元数量最多, 分别多于 m-NTS 以及 r-NTS 区,  $P<0.01$ , 而 m-NTS 多于 r-NTS 区。

2.2 c-Fos-NK1-R 免疫荧光-免疫酶学 荧光显微镜下可见 5-HT 组、0.86 mol/L NaCl 组 NTS 内有少量点状的红色荧光即 c-Fos 阳性, 而假手术组则仅见少量点状的红色荧光, 见图 3A、4A。光镜下观察: 5-HT 组、0.86 mol/L NaCl 组可见各组在 NTS 内 c-Fos 阳性的区域均有 NK1-R 表达在细胞的树突膜, 呈棕黄色颗粒状, (图 3B、4B)。假手术组未见 c-Fos 与 NK1-R 很好的重叠。PBS 组在荧光显微镜和光镜下均未见阳性表达。

2.3 胰液蛋白含量 假手术组胰液蛋白含量的曲线呈水

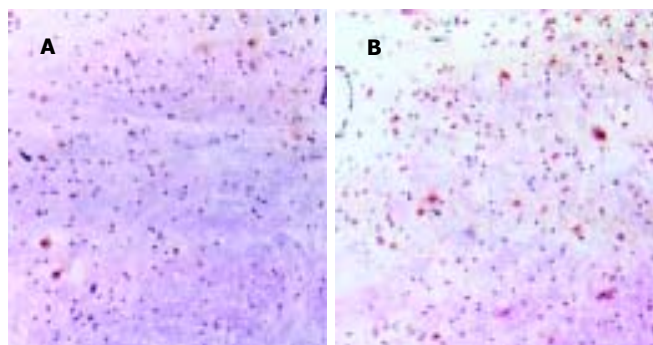


图1 c-Fos免疫组化结果. A: 0.86 mol/LNaCl组; B: 5-HT组.

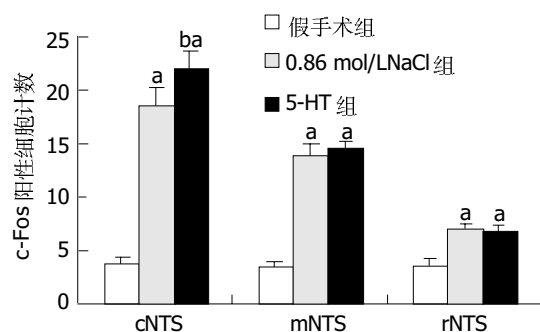


图2 NTS各平面的c-Fos阳性神经数量. <sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 假手术组, <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 0.86 mol/LNaCl组.

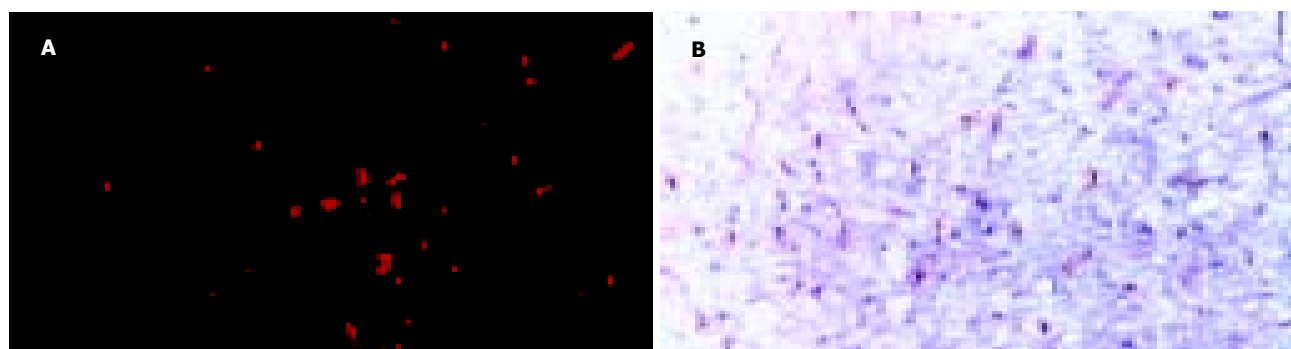


图3 5-HT组 c-Fos-NK1-R观察结果. A: 荧光显微镜下; B: 光镜下.

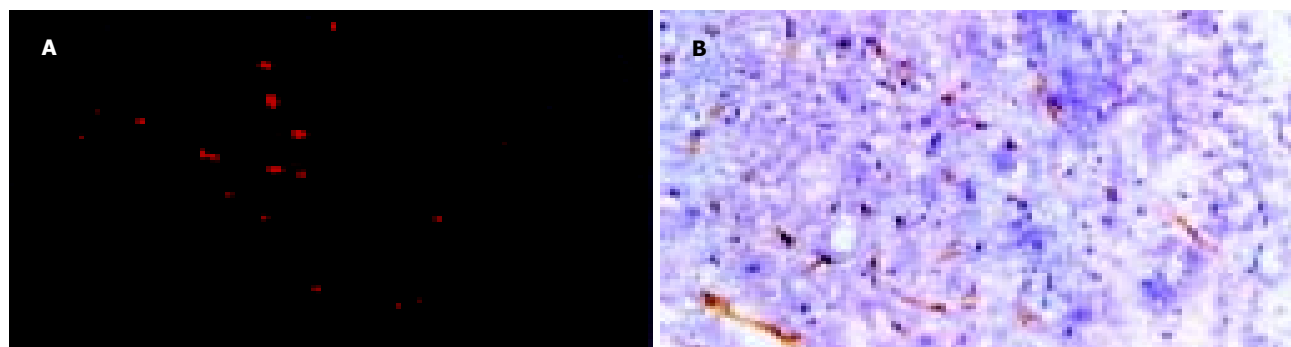


图4 A: 0.86 mol/LNaCl组 c-Fos-NK1-R观察结果. A: 荧光显微镜下; B: 光镜下.

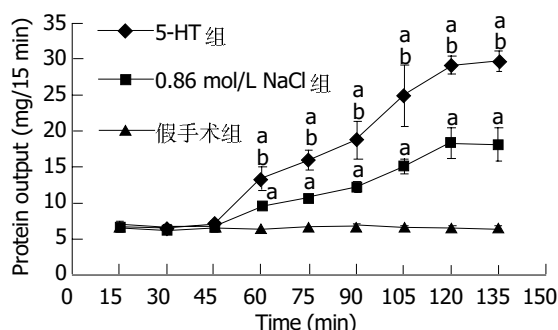


图5 大鼠不同时段胰液蛋白含量. <sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 假手术组; <sup>b</sup> $P < 0.01$ , 5-HT组 vs 0.86 mol/L NaCl组.

平线型, 无明显的增高减低, 各时间段的比较均提示无明显统计学意义( $P > 0.05$ ). 而5-HT组、0.86 mol/L NaCl组在肠道灌注后15 min后即有明显升高, 灌注后各时间段与假手术组比较, 有统计学意义( $P < 0.05$ ). 另外5-HT组与0.86 mol/L NaCl组比较, 灌注后升高更

明显, 有统计学意义( $P < 0.05$ ). 具体数值(图5).

### 3 讨论

c-fos属即刻早期基因的一种, 他对神经递质、激素、神经冲动等外界刺激的传入信息在数分钟内就可作出反应, 并进行表达. 由于c-fos的这一特性, c-fosmRNA及其表达产物c-Fos蛋白现常用作神经元功能活动标记物. 与假手术组相比, 十二指肠内给予0.86 mol/L组、 $10^{-4}$  mol/L 5-HT组诱导了NTS内各部位的c-Fos阳性神经元数量明显增加, 说明NTS内的部分神经元参与了5-HT介导的胰腺外分泌变化. 在0.86 mol/L NaCl组、 $10^{-4}$  mol/L 5-HT组中孤束核cNTS区域神经元表达增加最明显, 且5-HT组高于0.86 mol/L NaCl组. 说明与0.86 mol/L NaCl组相比, 十二指肠灌注 $10^{-4}$  mol/L 5-HT后上传的信息能更强激活NTS内的神经元.

P物质(substance P, SP)是一种含有11个氨基酸的多肽, 属速激肽家族, 广泛分布于神经系统各部, 是神经系统中重要的生物活性物质之一. 速激肽家族目前已

发现3种受体: NK1-R, NK2-R和NK3-R, 均属于G蛋白相偶联的7次跨膜受体家族. 其中以NK1-R与SP的亲合力最强. 研究已证实SP及其受体NK1-R均存在于大鼠的NTS内<sup>[4-5]</sup>. 在c-Fos阳性神经元密集的区域也可见NK1-R, 且这些SP受体在NTS内主要集中在树突膜上. 可能提示十二指肠内5-HT以及0.86 mol/L NaCl刺激, 经迷走神经传导至NTS, 然后激活了部分P物质受体阳性神经元, 使其参与了NTS内的内脏感知信息整理. Baude *et al*<sup>[6]</sup>的实验结果发现: (1)在大鼠和家猫的迷走神经背核复合体(DVC)上, NK1-R不分布在任何轴突膜、轴突末梢以及胶质细胞, (2)应用半定量实验, 提示NK1-R在某些树突膜上密度更高, 而这些树突的特点是和其他神经元轴突末梢没有突触或非突触的联系. 因而他们认为SP作用与NK1-R受体可能是通过对传入信息的整理来调节各种相关活动的. 其第一点否认了NK1-R阳性的神经元作为轴突与其他神经元联系的可能; 而第二点则否认了NK1-R阳性的神经元做为树突与其他神经元形成轴突-树突模式的这种联系方式. 因此从某种意义上也提示SP在CNS对胰腺的外分泌调节可能是通过对传入信息的整理来完成的, 而不是通过经典的神经传导方式.

就胰蛋白分泌来讲, 三个实验组在基础状态时胰液蛋白含量并没有差异, 而两个处理组在分别灌注0.86 mol/L NaCl、5-HT后, 均有明显的统计学意义( $P < 0.05$ ), 且随灌注的时间增加, 胰蛋白含量也不断增加, 直到120 min左右增加渐慢, 这些结果与Li的实验结果趋势基本相仿. Li *et al*<sup>[7]</sup>认为十二指肠高渗盐、5-HT刺激均可引起的胰腺外分泌增加, 且并不依赖于CCK. 他们同时认为5-HT是作为一种旁分泌物质, 与胆碱能神经通路上突触后的5-HT<sub>3</sub>受体结合, 最终增加胰腺外分泌的. 另外Zhu *et al*<sup>[8]</sup>应用电生理方法也证实了在54只大鼠的十二指肠内分别灌注高渗盐、自来水、高渗糖等, 然后记录了这些大鼠的364个神经元(均来自于迷走神经节)的放电, 有40个神经元被激活. 接着将 $10^{-4}$  mol/L 5-HT,  $10^{-5}$  mol/L 5-HT灌注于上述筛选出来的大鼠十二指肠内, 上述40个神经元所发放的冲动分别为 $(38 \pm 5)$ ,  $(21 \pm 4)$ 冲动/20 s, 而基础水平为 $(0 \pm 1)$ 冲动/20 s. 后用10 g/L利多卡因对上述十二指肠黏膜行局部浸润, 可完全去除5-HT对神经元的反应. 表明迷走神经节内的感觉神经元和迷走神经传入纤维都参与了管腔因子对胰腺外分泌的促进过程. 另外5-HT组在灌注以后胰液蛋白含量明显高于0.86 mol/L NaCl组, 提示0.86 mol/L NaCl组所引起的内源性5-HT释放可能小于 $10^{-4}$  mol/L. 这一点与Li *et al*<sup>[7]</sup>的研究也比较符合, 他们认为十二指肠内灌注0.6 mol/L (4%)的NaCl可以使肠道内5-HT的水平增至 $5.2 \pm 0.2 \mu\text{g}/20 \text{ min}$ , 而 $10^{-5}$  mol/L 5-HT按照3 mL/h的速度灌注, 可使肠道浓度稳定在 $5.7 \pm 1.7 \text{ g}/20 \text{ min}$ . 因此4% NaCl基本相当于

$10^{-5}$  mol/L 5-HT水平. 在各时间段进行比较中发现5-HT组105 min后各时间段、0.86 mol/L NaCl组120 min后各时间段比较均无统计学意义, 提示超过一定时间段后, 胰液蛋白含量可能处于平台期或者缓慢增长期.

从方法学而言, 本研究采用双重免疫组化方法, 即利用同一张片子探测2种蛋白的表达, 其目的是为得到更好的同一性. 目前在中枢核团的研究中常常应用c-Fos与受体搭配的双重免疫组化方法, 这样不但能明确核团神经元的活动性, 也能搞清楚这些已激活神经元的性质, 如在大鼠呼吸调节的中枢核团研究中, Whitney *et al*同时应用谷氨酸受体与c-Fos结合, 了解舌下神经核对于呼吸活动的调节. 就大鼠胰液收集方面, 虽然国内在胰腺疾病方面已作了较多研究, 但在国内尚未见动物胰液收集的详尽报道. 另外本课题所收集的虽为胆胰混合液, 但根据文献报道, 非CCK刺激引起的蛋白分泌属胰源性, 并不引起胆汁中蛋白含量的增加<sup>[9]</sup>. 因此所测蛋白可以很好的反映胰液蛋白含量的变化. 同时由于未结扎胆管, 使大鼠更趋于生理状态, 结果更可靠.

总之, 5-HT, 0.86 mol/L NaCl灌注十二指肠后可以引起胰液中蛋白含量的即刻增加, NTS在这一过程中可能起着感知及整理信息的作用, P物质受体可能参与了这种整理过程. 但目前P物质受体在此过程中的具体调节机制以及发挥的作用尚未完全清楚, 有待进一步研究. 同时本研究仅是从形态学单方面进行了阐述, 并不全面, 尚缺乏神经电生理方面的证据, 有待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Li Y, Wu XY, Zhu JX, Owyang C. Intestinal serotonin acts as paracrine substance to mediate pancreatic secretion stimulated by luminal factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G916-G923
- 2 Glatzle J, Kreis ME, Kawano K, Raybould HE, Zittel TT. Postprandial neuronal activation in the nucleus of the solitary tract is partly mediated by CCK-A receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R222-R229
- 3 Kasparov S, Davies KA, Patel UA, Boscan P, Garret M, Paton JF. GABA<sub>A</sub> receptorepsilon-subunit may confer benzodiazepine insensitivity to the caudal aspect of the nucleus tractus solitarius of the rat. *J Physiol* 2001;536:785-796
- 4 Nishi T, Hara H, Aoyama Y. Guanidinated casein hydrolysate stimulation of cholecystokinin release via pancreatic enzyme- and cholinergic-independent mechanisms in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:1070-1074
- 5 Yakabi K, Iwabuchi H, Nakamura T, Endo K, Fukunaga Y, Kumaki I, Takayama K. Neuronal expression of Fos protein in the brain after intravenous injection of gastrin in rats. *Neurosci Lett* 2002;317:57-60
- 6 Baude A, Shigemoto R. Cellular and subcellular distribution of substance P receptor immunoreactivity in the dorsal vagal complex of the rat and cat: a light and electron microscope study. *J Comp Neurol* 1998;402:181-196
- 7 Li Y, Hao Y, Zhu J, Owyang C. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats. *Gastroenterology* 2000;118:1197-1207
- 8 Zhu JX, Zhu XY, Owyang C, Li Y. Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat. *J Physiol* 2001;530:431-442



# 肝大部分切除或HGF刺激可以引起STAT3和TEC的同时激活

李菲菲, 郑红, 许望翔, 杨晓明, 汪思应

李菲菲, 郑红, 汪思应, 安徽医科大学病理生理教研室  
安徽省合肥市 230032

许望翔, 杨晓明, 军事医学科学院二所 北京市 100850

李菲菲, 女, 1979-07-17 生, 2002 年安徽医科大学本科毕业, 2002 年至今攻读安徽医科大学硕士学位, 研究方向为肝再生的分子调控。

国家自然科学基金资助项目, No. 39670366,

安徽省自然科学基金资助项目, No. 00044202

安徽省人才开发基金资助项目, No. 2002Z035

项目负责人: 汪思应, 230032, 安徽省合肥市梅山路 69 号, 安徽医科大学病理生理教研室. sywang@ahmu.edu.cn

电话: 0551-5167706 传真: 0551-5167706

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-09-30

## Activation of TEC and STAT3 after partial hepatectomy or hepatocytic growth factor stimulation

Fei-Fei Li, Hong Zheng, Wang-Xiang Xu, Xiao-Ming Yang, Si-Ying Wang

Fei-Fei Li, Hong Zheng, Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Wang-Xiang Xu, Xiao-Ming Yang, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100056, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39670366; the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 00044202; and Human Resource Fund of Anhui Province, No. 2002Z035

Correspondence to: Dr. Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. sywang@ahmu.edu.cn

Received: 2004-09-18 Accepted: 2004-09-30

## Abstract

AIM: To study the activation of TEC and STAT3 in the hepatocyte after partial hepatectomy (PH) or hepatocytic growth factor (HGF) stimulation in the mice.

METHODS: Mice of SPF degree and WB F-344 cell (liver stem cell line) were used in this study. *In vivo* and *in vitro* experimental models of PH and HGF stimulation were established respectively. Immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB) were used to observe the phosphorylation level and time of TEC and STAT3. On the other hand, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to detect the binding ability of STAT3 DNA.

RESULTS: TEC and STAT3 were both inducibly phosphorylated in one hour after PH or HGF stimulation. Ten to twenty minutes after PH, levels of TEC and STAT3 reached the peak. About 10 min after HGF stimulation, TEC phosphorylation level reached maximum value and about 30 min STAT3 phosphorylation level reached peak value. Meanwhile, STAT3 DNA binding activity was enhanced both *in vivo*

and *in vitro* experiments.

CONCLUSION: After PH or HGF-stimulation, both TEC and STAT3 are quickly phosphorylated in one hour, and they synergically affect the early proliferation of hepatocytes.

Li FF, Zheng H, Xu WX, Yang XM, Wang SY. Activation of TEC and STAT3 after partial hepatectomy or hepatocytic growth factor stimulation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(12):2809-2812

## 摘要

目的: 了解STAT3和TEC在肝再生以及HGF刺激的肝干细胞中激活情况, 探讨在肝细胞早期增生中STAT3和TEC的活化的相关性。

方法: 建立小鼠肝大部分切除和HGF刺激肝干细胞(WB F-344)的体内、体外两个试验模型, 采用免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)、免疫印迹(immunoblotting, IB)的方法检测TEC和STAT3酪氨酸磷酸化激活水平与时间, 使用凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)分析核蛋白与STAT3 DNA特异序列的结合能力。

结果: 肝大部分切除和HGF刺激下STAT3和TEC的磷酸化水平均快速明显升高, 肝大部分切除后10-20 min时二者激活水平均达到最高, HGF刺激后10 min TEC激活水平最高, 30 min STAT3活化水平最高。肝大部分切除或HGF刺激下10 min左右, 核蛋白与STAT3 DNA特异序列的结合能力明显增强。

结论: 肝大部分切除和HGF刺激下STAT3和TEC均被快速激活, 他们之间可能存在相互作用, 共同影响肝细胞早期增生反应。

李菲菲, 郑红, 许望翔, 杨晓明, 汪思应. 肝大部分切除或HGF刺激可以引起STAT3和TEC的同时激活. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2809-2812  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2809.asp>

## 0 引言

STAT3 (signal transducer and activator transcription factor 3, STAT3)对不同组织的发育和细胞的增生有着至关重要的作用<sup>[1-3]</sup>. 它可以与急性期基因启动子上的增强元件(即急性期反应元件)相互作用, 对HGF, EGF等生长因子刺激诱导的肝细胞早期增生有重要作用<sup>[4-6]</sup>. TEC (tyrosine kinase expressed in hepacelluar carcinoma, TEC)

是一种重要的非受体型酪氨酸激酶<sup>[7]</sup>,参与造血细胞生长、分化的调控<sup>[8]</sup>,被认为具有造血组织及肝组织分布相对特异性<sup>[9]</sup>.我们发现大鼠TEC的mRNA在2/3肝切除的大鼠再生肝中表达迅速升高,并发现TEC是一种与肝再生调控密切相关的早期反应基因,他可能参与肝细胞早期生长<sup>[10-11]</sup>.肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种多功能的细胞活性因子,是目前公认的最重要的肝再生启动因子之一<sup>[12]</sup>.无论是肝再生还是HGF刺激下引起的肝细胞的增生的机制目前还不十分明了.由于TEC与STAT3都与肝大部分切除后细胞早期增生有关,提示我们二者可能共同作用于肝干细胞或是存在cross-talk.因此我们研究STAT3和TEC在肝再生以及HGF刺激的肝干细胞中激活的情况,探讨在肝细胞早期增生中STAT3和TEC的相关性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 鼠重组肝细胞生长因子(mHGF)为Sigma公司产品. TEC抗体、抗磷酸化PY99抗体、STAT3抗体、磷酸化STAT3抗体购自Santa Cruz. Protein A-Sepharose 4B Beads, 辣根过氧化物酶标记的IgG抗体, ECL (enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒购于北京中山生物公司. PVDF (polyvinylidene difluoride, PVDF)膜为Amersham公司产品. DMEM胰酶为Gibco公司产品,胎牛血清为Life Technologies公司产品. 昆明鼠购于军事医学科学院动物实验中心. 肝干细胞<sup>[13]</sup>WB F-344为中国医学科学院药理所韩锐教授赠送. 培养条件: 高糖DMEM, 含100 g/L胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱培养. 5×10<sup>8</sup>/L细胞密度下使用10 g/L胎牛血清的DMEM饥饿培养24-48 h,再用HGF刺激(20-50 μg/L). 25-30 g SPF级(♀)昆明鼠12只,随机分为实验组与对照组,10 g/L戊巴比妥ip麻醉后,实验组依次进行2/3肝大部切除,分别在切除后10, 20, 30, 60 min取再生肝组织,以小号研磨器研磨后过滤,加入RIPA(975 g/L PBS, 10 g/L Nonidet P-40, 5 g/L脱氧胆酸钠, 1 g/L SDS)冰上裂解30 min, 4℃离心取上清,即为再生肝总蛋白. 对照组开腹牵拉肝组织后10, 20, 30, 60 min取肝组织提总蛋白.

### 1.2 方法

1.2.1 TEC与STAT3活化的检测 TEC酪氨酸磷酸化水平检测: 再生肝组织或HGF刺激后的细胞用冰PBS洗3遍, RIPA裂解后提取蛋白. 取细胞蛋白或组织蛋白2 mg/group, 加入抗TEC抗体(1:100稀释)在旋转器上4℃混匀1 h, 再加入Protein A-Sepharose 4B Beads于4℃混匀过夜, 将免疫沉淀复合物用冰RIPA洗4遍, 重悬于2×SDS上样缓冲液中, 100℃变性3 min后上样进行100 g/L SDS-PAGE电泳, 再电转(100 mA、120 min)至PVDF膜上, 转好的膜放在TBS-T(20 mmol/L Tris-HCl PH7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.5 g/L Tween20)中封闭3 h, 然后再将膜置于加入抗PY99抗体(1:1 000)

的TBST中室温孵育1 h, 再加入相应结合的二抗后与ECL发光检测剂结合显示结果. STAT3酪氨酸磷酸化水平检测: 再生肝组织蛋白或HGF刺激后的细胞裂解物(10 μg/group)经100 g/L SDS-PAGE胶分离后电转(100 mA, 120 min)至PVDF膜上, 转好的膜放在TBST中封闭3 h. 然后再将膜置于加入抗STAT3抗体(1:2 000)或phospho-STAT3(1:2 000)的TBST中室温孵育1 h, 再加入相应结合的二抗后与ECL发光检测剂结合显示结果.

1.2.2 EMSA法检测STAT3结合活性 核蛋白的提取: 组织提取物或细胞用预冷的PBS 10 mL洗2次, 重悬于400 μL buffer A(10 mmol/L Hepes pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L aprotinin, 1 mg/L pepstatin A). 冰上放置15 min, 加入12.5 μL 100 g/L Nonidet P-40, 轻轻混匀后于4℃2 000 g离心10 min, 沉淀重悬于40 μL buffer C(20 mmol/L Hepes pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 450 mmol/L NaCl, 250 g/L glycerol, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L aprotinin, 1 mg/L pepstatin A), 冰上静置30 min, 20 000 g离心15 min, 上清即为核提取物. STAT3同源寡核苷酸片段为Promega公司标记和纯化产品. 探针的制备: <sup>32</sup>P标记STAT3寡核苷酸(1.75 p mol/L) 2 μL, 10×T4缓冲液1 μL, <sup>32</sup>P-ATP(111 PBq/mmol) 1 μL, 无菌水5 μL, T4核酸酶(5-10 MU/L) 1 μL, 37℃反应10 min, 加入1 μL 0.5 mol/L EDTA终止反应. EMSA实验: 98 μg核蛋白在结合液(20 mmol/L Hepes pH 7.9, 100 mmol/L KCl, 200 g/L glycerol, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF)中与1 μL <sup>32</sup>P标记STAT3寡核苷酸中4℃反应15 min. 加上样缓冲液1 μL, 上样, DNA-protein复合物在400 g/L聚丙烯酰胺凝胶中电泳(300 V, 30-40 min), 取出凝胶压片. 在-20℃放射性自显影8-24 h.

## 2 结果

2.1 肝大部分切除后STAT3与TEC快速活化 肝大部分切除后STAT3与TEC磷酸化水平均在1 h内迅速升高, 其中STAT3激活水平在10-20 min达最高(图1A), TEC激活水平在20-30 min达最高.(图1B)

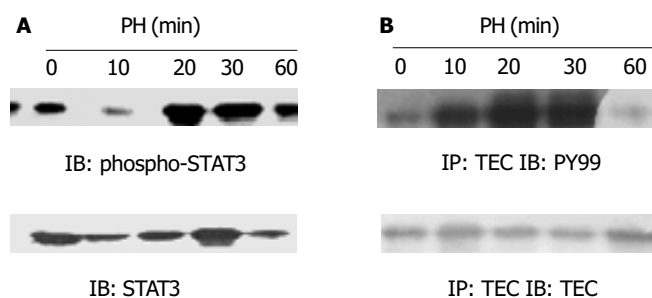


图1 小鼠肝大部分切除术(PH)后TEC和STAT3酪氨酸磷酸化水平. A: STAT3酪氨酸磷酸化水平; B: TEC酪氨酸磷酸化水平.

2.2 HGF 刺激使 STAT3 与 TEC 也均被快速活化 在 HGF 刺激下, 肝干细胞 WBF-344 中 STAT3 和 TEC 快速激活. 其中在 TEC 在 HGF 刺激 10 min 时磷酸化水平达最高(图 2A), STAT3 则在 30 min 时磷酸化水平达最高(图 2B).

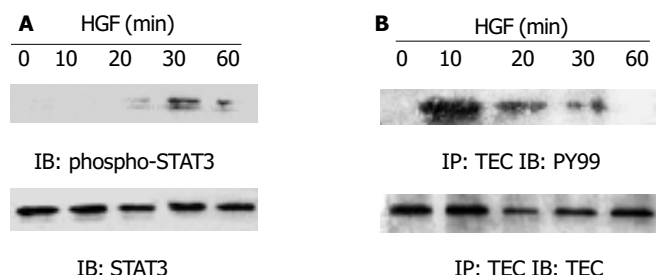


图2 WBF-344 在 HGF 刺激后 TEC 和 STAT3 酪氨酸磷酸化水平. A: STAT3 酪氨酸磷酸化水平; B: TEC 酪氨酸磷酸化水平.

2.3 核蛋白与 STAT3 DNA 结合能力增强 肝大部分切除和 HGF 刺激 1 h 内, 核蛋白与 STAT3 的 DNA 结合能力呈瞬时性增强, 在肝大部分切除 20 min 左右, HGF 刺激 10 min 左右结合力达最高(图 3).

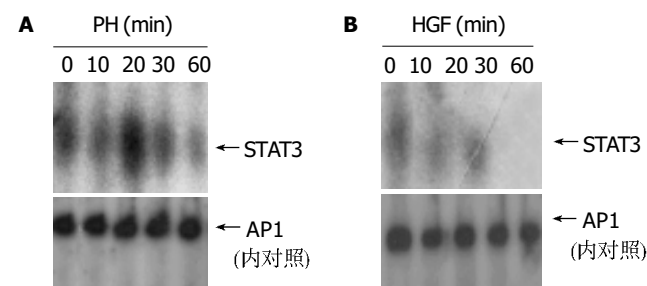


图3 肝大部分切除术(PH)和 HGF 刺激后 STAT3 与核蛋白结合能力. A: 肝大部分切除术(PH); B: HGF 刺激.

### 3 讨论

本结果表明, 在肝切除或生长因子等多种因素刺激下, TEC 和 STAT3 被迅速激活, 都共同参与了肝细胞的增生反应, 可能对肝细胞的早期分裂增生发挥重要作用. STAT3 参与了多种病理生理过程中的应答, 是 gp-130 受体(IL-6 受体)下游最重要的介导信号转导的分子<sup>[14-15]</sup>. STAT3 和其他 STAT 蛋白一样, 在氨基末端有 1 个 4 聚体化区, 参与受体的募集与 STAT 自身二聚体化. STAT3 的酪氨酸磷酸化是在细胞因子刺激下, 由 JAK 激酶介导下而发生的<sup>[16-17]</sup>, 这种酪氨酸磷酸化对 STAT3 的二聚体化激活、核定位、与 DNA 结合是必须的<sup>[18]</sup>. TEC 基因编码框由 PH domain、TH domain、SH3 domain、SH2 domain 和 kinase domain 组成<sup>[19]</sup>. SH2 domain 与 kinase domain 可以与下游一些蛋白 Dok1, BROG1, PKC- 等结合, 从而使后者磷酸化而激活<sup>[20-22]</sup>.

肝再生是一个复杂的病理生理过程, 有很多基因参与其中<sup>[23-24]</sup>. 以往的研究表明 STAT3 与 TEC 是肝再生早期反应基因<sup>[25-27]</sup>. HGF 是肝再生最强的启动因子之一<sup>[28-29]</sup>. HGF 与其细胞表面的受体 c-met 结合后, 引起细胞内

一系列蛋白酪氨酸磷酸化<sup>[30]</sup>. 我们有理由设想 STAT3 与 TEC 间可能也存在交叉对话, 共同影响肝细胞早期增生反应. 根据我们的实验结果, 我们提出 TEC 在活化后可以使 STAT3 活化的假设, 有两种可能, 一种简单的假设是 TEC 磷酸化激活后发挥其激酶活性, 其 kinase domain 使 STAT3 的碳末端活化区的酪氨酸位点磷酸化, 直接激活 STAT3; 另一种可能是间接激活, TEC 活化后, 通过激活其他激酶使 STAT3 发生磷酸化活化, 这种激酶可能是 JAK2 或者是 TEC 下游其他靶基因. TEC 与 STAT3 激活后将调节一些对细胞增生起重要作用的基因的活性, 如 c-fos, 从而调节细胞增生信号转导途径, 最终对急性肝损伤或细胞因子诱导下的肝细胞有丝分裂起正相调控作用. 本研究为进一步探讨 STAT3 与 TEC 之间信号转导关系奠定了基础, 为进一步深入了解肝细胞再生机制提供了新思路.

### 4 参考文献

- Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-1635
- Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002;109:1143-1148
- 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
- Leu JJ, Crissey MA, Leu JP, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol Cell Biol* 2000;21:414-424
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994;264:95-98
- Lutticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 1994;263:89-92
- Tsygankov AY. Non-receptor protein tyrosine kinases. *Front Biosci* 2003;8:595-635
- Lucas JA, Miller AT, Atherly LO, Berg LJ. The role of Tec family kinases in T cell development and function. *Immunol Rev* 2003;191:119-138
- Mano H, Ishikawa F, Nishida J, Hirai H, Takaku F. A novel protein-tyrosine kinase, tec, is preferentially expressed in liver. *Oncogene* 1990;5:1781-1786
- Xu W, Wang S, Wang G, Wei H, He F, Yang X. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during the liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:318-325
- 汪思应, 王阁, 许望翔, 魏汉东, 杨晓明. Tec 酪氨酸蛋白激酶基因是一种与肝再生调控相关的早期反应基因. *中国生物化学与分子生物学报* 2001;17:325-328
- Gohda E. Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002;119:287-294
- 展玉涛, 任继萍. 肝干细胞. *世界华人消化杂志* 2003;11:1735-1737
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000;19:2548-2556
- Schuringa JJ, Jonk LJ, Dokter WH, Vellenga E, Kruijer W. Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J* 2000;347:89-96
- Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 re-

- ceptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 1999;274:16513-16521
- 17 Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J* 1995;14:1421-1429
  - 18 Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:199-207
  - 19 Mano H. Tec family of protein-tyrosine kinases: an overview of their structure and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:267-280
  - 20 Mayer BJ, Hirai H, Sakai R. Evidence that SH2 domain promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinase. *Curr Biol* 1995;5:296-305
  - 21 Yokohari K, Yamashita Y, Okada S, Ohya K, Oda S, Hatano M, Mano H, Hirasawa H, Tokuhisa T. Isoform-dependent interaction of BRDG1 with Tec kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:414-420
  - 22 Altman A, Kaminski S, Busuttill V, Droin N, Hu J, Tadevosyan Y, Hipskind RA, Villalba M. Positive feedback regulation of PLCgamma1/Ca(2+) signaling by PKCtheta in restimulated T cells via a Tec kinase-dependent pathway. *Eur J Immun* 2004;34:2001-2011
  - 23 Schoen JM, Lutt WW. Nitric oxide potentiates C-Fos mRNA expression after 2/3 partial hepatectomy. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:47-48
  - 24 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39:1477-1487
  - 25 Li W, Liang X, Kellendonk C, Poli V, Taub R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 2002;277:28411-28417
  - 26 Debonera F, Aldeguer X, Shen X, Gelman AE, Gao F, Que X, Greenbaum LE, Furth EE, Taub R, Olthoff KM. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. *J Surg Res* 2001;96:289-295
  - 27 Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. Essential Role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation in the liver. *Mol Cell Biol* 2001;21:1621-1632
  - 28 Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4477-4482
  - 29 Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10608-10613
  - 30 Okano J, Shiota G, Matsumoto K, Yasui S, Kurimasa A, Hisatome I, Steinberg P, Murawaki Y. Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:298-304

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 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 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)

# 空肠弯曲菌 28-31 ku 外膜蛋白的免疫原性

冯胜军, 孙万邦, 姚新生, 肖 政

冯胜军, 孙万邦, 姚新生, 肖政, 遵义医学院免疫学教研室  
贵州省遵义市 563003

冯胜军, 男, 1976-01-03 生, 贵州省德江人, 2003 年遵义医学院硕士研究生毕业, 助教, 主要从事抗感染免疫及疫苗研究。

贵州省社会发展基金重点课题, No. C-168

贵州省优秀人才省长基金课题, No. C-195

项目负责人: 孙万邦, 519041, 贵州省遵义市, 遵义医学院免疫学教研室。  
wb-sun@263.com

电话: 0756-7623323 传真: 0756-7623328

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-20

## Immunogenicity of 28-31 ku outer membrane protein in *Campylobacter jejuni*

Sheng-Jun Feng, Wan-Bang Sun, Xin-Sheng Yao, Zheng Xiao

Sheng-Jun Feng, Wan-Bang Sun, Xin-Sheng Yao, Zheng Xiao,  
Department of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003,  
Guizhou Province, China

Supported by the Foundation for Social Development of Guizhou  
Province, No. C-168 and the Governor Foundation for Excellent Talent  
of Guizhou Province, No. C-195

Correspondence to: Dr. Wan-Bang Sun, Department of Immunology,  
Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China.  
wb-sun@263.com

Received: 2004-07-27 Accepted: 2004-08-16

## Abstract

AIM: To explore immunogenicity of 28-31 ku outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) and to pave the way for preparation of *C. jejuni* subunit vaccine.

METHODS: BALB/c mice were divided into normal control group, control group and immune group. Mice in immune group were subcutaneously (SC) injected 28-31 ku protein (*Pur*) or glycine extraction (*A*), adding or without adding the complete Freud's adjuvant (*F*). Mice in control group were treated with *F* and saline. Each mouse received five times of immunization at an interval of 6 days. At 10<sup>th</sup> day after the final immunization, the specific antibodies' titer in serum was measured with double immunodiffusion test. ELISA method was used to detect the specific IgG, IgA antibodies in serum and intestinal fluid.

RESULTS: After treated with different doses of antigen, the levels of specific IgG, IgA or secretory IgA (SIgA) antibodies in serum and intestinal fluid were significantly higher in immune group than those in normal control or control group ( $P < 0.05$ ). No significant difference existed between normal control and control group.

CONCLUSION: Outer membrane protein of *C. jejuni* with molecular mass of 28-31 ku is a fine immunogen and it can induce response of specific antibodies in BALB/c mice. It may be used as a promising component of sub-

unit vaccine.

Feng SJ, Sun WB, Yao XS, Xiao Z. Immunogenicity of 28-31 ku outer membrane protein in *Campylobacter jejuni*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(12):2813-2816

## 摘要

目的: 探讨空肠弯曲菌 28-31 ku 外膜蛋白的免疫原性。

方法: 将 BALB/c 小鼠分为正常对照组和不同剂量抗原的免疫组, 正常对照组不予抗原免疫, 而免疫组采用 28-31 ku 蛋白(纯)或甘氨酸提取的外膜蛋白(粗), 分别加用或不用完全弗氏佐剂(*F*), 采用 *sc*, 在 0, 1, 2, 3, 4 wk 免疫, 于末次免疫后 10 d, 用双向免疫琼脂扩散试验测定各免疫组抗血清效价, 待效价达到 1:4 至 1:16 时, 分别采集各免疫组及对照组小鼠的血清、空肠及回肠内的肠液, 用间接 ELISA 法检测各组标本的特异性抗体 IgA, IgG。

结果: 不同剂量的抗原 *sc* 免疫 BALB/c 小鼠后, 免疫组血清及肠液中特异性 IgA, IgG 抗体水平较正常对照组及实验对照组显著升高 ( $P < 0.05$ )。

结论: 空肠弯曲菌的 28-31 ku 外膜蛋白是一种良好的免疫原, 能够诱导 BALB/c 小鼠产生特异性抗体, 可能成为空肠弯曲菌亚单位疫苗候选的重要组分。

冯胜军, 孙万邦, 姚新生, 肖政. 空肠弯曲菌 28-31 ku 外膜蛋白的免疫原性.  
世界华人消化杂志 2004;12(12):2813-2816  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2813.asp>

## 0 引言

空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*)作为一种人兽共患病病原体, 系最常见的胃肠道炎症的致病菌之一<sup>[1-2]</sup>, 还是 Guillain-Barre 综合征和 Miller Fisher 综合征的常见致病病原体<sup>[3-8]</sup>, 其血清型繁多<sup>[9-10]</sup>, 并且 *C. jejuni* 由于存在分子模拟等成分, 制备的全菌苗, 以及 *C. jejuni* 突变株菌苗<sup>[11]</sup>提供的保护性效果有限, 而不安全. 在亚单位组分的提取上, 众多血清型菌株分布, 使得 *C. jejuni* 共同抗原具有保护性的组分的鉴定及提取增加了难度, 同时也为 *C. jejuni* 疫苗的研制增加了阻力. 并且, 随着 *C. jejuni* 耐药菌株的增加<sup>[12-13]</sup>, 研究安全、有效的 *C. jejuni* 亚单位疫苗具有重要的预防作用. 对于 *C. jejuni* 的亚细胞成分的研究最多的是其鞭毛蛋白<sup>[14]</sup>, 但获得的保护性有限, 并且在不同来源的 *C.*

jejuni 菌株间提供了不稳定的保护性. 本研究中, 我们参照 Pei *et al*<sup>[15]</sup>的方法, 对 *C. jejuni* 28-31 ku 外膜蛋白进行免疫原性研究, 为深入探讨 *C. jejuni* 的有效的保守性亚单位组分奠定基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*) 标准株(CF-1, 购于上海市疾病预防控制中心菌种保存中心, 由中国科学院从腹泻肠炎患者中分离); BALB/c 小鼠清洁级, 6-8 wk 龄, 健康, 质量 18-25 g, ♂, 购于重庆医科大学, 常规饲养; HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体 HRP 标记羊抗小鼠 IgA 抗体购于 Southern Biotech 公司; 蛋白酶抑制剂购于 Amersham 公司; 小牛血清购于中德三利生物制品厂; OPD 购于 Sigma 公司; 卡介苗购于中科院成都生物制品研究所; 改良布氏血琼脂培养基参照文献[16]配制.

1.2 方法 *C. jejuni* 在改良布氏血琼脂培养基中培养, 在 42.5 °C, 气体条件 50 mL/L O<sub>2</sub>, 100 mL/L CO<sub>2</sub>, 850 mL/L N<sub>2</sub> 条件下培养 48 h. 取出, 用灭菌双蒸水洗刮下 *C. jejuni* 菌苔, 室温 4 000 g, 20 min 离心洗涤菌液. 重复洗涤 1 次, 去掉上清液, 取出 CJ 菌泥, 称重, 按每 4 g CJ 菌泥加入 0.2 mol/L、pH 2.2 甘氨酸-盐酸缓冲液 120 mL, 4 °C 搅拌 30 min, 然后在 4 °C 条件下 12 000 g, 离心 15 min. 透析, 用固体聚乙二醇 6 000 包埋浓缩, 该透析物为 *C. jejuni* 粗提物. 然后将该粗提物通过 Sephadex G-75 纯化, 获得 *C. jejuni* 的 28-31 ku 外膜蛋白, 80 mL/L 浓缩胶、120 mL/L 分离胶作 SDS-PAGE 分子质量鉴定. 蛋白质定量采用 Bradford 法蛋白定量. 抗原制备采用本室制备的福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂, 无菌操作, 4 °C 保存, 备用.

1.2.1 动物分组免疫 小鼠 48 只, 随机分组, 每组 6 只, 共 8 组(表 1): 实验对照组采用福氏完全佐剂 0.2 mL + 生理盐水 0.2 mL sc(NS+F 组); 正常对照组不进行任何免疫处理. 上述动物均常规饲养. 免疫方法均采用背部皮下 + 腹部皮下多点注射. 加有福氏完全佐剂的疫苗按 0.2 mL 混合 0.2 mL 抗原(*C. jejuni* ku-31 ku 外膜蛋白或 *C. jejuni* 甘氨酸提取物), 未加福氏完全佐剂用灭菌生理盐水 0.2 mL 代替. 每次每只小鼠共 0.4 mL. 每隔 6 d sc 1 次, 共五次. 全程 40 d(包括末次采血采用双向免疫琼脂扩散试验检测抗体效价的 10 d). 免疫期间观察进食、大便、毛皮、四肢、体重、活动、死亡等情况.

1.2.2 小鼠血清中抗体效价检测 每组取 2 只小鼠, 摘眼球从眼眶采血, 常规分离血清, 作双向免疫琼脂扩散试验检测血清中抗体效价. ELISA 法检测血清 IgG, IgA 及肠液中 IgG, SIgA 水平: 经眼眶采血, 在采集前 10 h 禁食. 常规方法分离血清. 肠黏液收集, 在采集前 10 h 禁食. 眼眶采血处死后, 立即取空肠和回肠 5 cm. 于 Eppendorf 管中, 加入胰蛋白酶抑制剂 /PBS 溶液 0.5 mL, 用剪刀剪碎肠段, 并轻微搅拌约 30 min. 置 4 °C 冰箱保存 10 h.

4 °C 离心, 13 000 g, 15 min. 收集上清液. 4 °C 保存, 备用. 用样本稀释液将血清按 1:100 稀释, 4 °C 保存. 用样本稀释液将肠黏液按 1:10 稀释, 4 °C 保存. *C. jejuni* 甘氨酸提取物(pH 7.0, 浓度 1 g/L), 100 μL/孔, 封板. 置湿盒中, 37 °C 孵育 4 h. 弃去孔中液体, 50 mL/L 小牛血清 /PBS 液 4 °C 封闭 24 h. 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min. 加入稀释好的样品(血清或肠黏液) 100 μL/孔, 封板. 湿盒, 37 °C 孵育 60 min. 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min. 加入 HRP 标记 IgG 或 IgA 抗体, 100 μL/孔, 封板. 置湿盒, 37 °C 孵育箱中, 60 min. 加入底物液 100 μL/孔, 封板. 置湿盒, 37 °C 孵育 15 min. 加入终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液)50 μL/孔, 终止反应. 酶标仪 490 nm 波长读取 A 值. 空白对照组为 0.1 mol/L, pH 7.4 PBS. 阳性结果 P/N ≥ 2.1, 即疫苗免疫组的样本测定孔的 A 值(P)-空白对照组值/正常对照组测定孔的 A 值(N)-空白对照组值 ≥ 2.1; 阴性结果 P/N ≤ 2.1. 即疫苗免疫组的样本测定孔的 A 值(P)-空白对照组值/正常对照组测定孔的 A 值(N)-空白对照组值 ≤ 2.1.

统计学处理 各组血清或黏液中的 A 值以均数 ± 标准差(mean ± SD)表示. 采用 SPASS V10.0 统计软件处理, 进行方差齐性检验后, 进行 t 检验、方差分析和相关性分析进行组间比较.

## 2 结果

*C. jejuni* 甘氨酸提取物进行 Sephadex G-75 分子筛层析, 然后 SDS-PAGE, 可以发现本次纯化出了分子质量为 28-31 ku 的外膜蛋白质, 且纯度较高(图 1). 免疫期间小鼠每次注射后前 16 h, 食量减少, 之后逐渐恢复至正常水平; 无稀便、干结; 毛发倒立、紊乱; 在第 2 次注射 1 d 后, 加有完全福氏佐剂组均有四肢关节肿胀、发红现象出现, 并伴眼睑红肿、结膜充血, 分泌物增加, 活动受限; 体质量明显减轻, 分别减少 1-5 g 左右; 活动迟缓; 无死亡.

2.1 小鼠后的血清特异性抗体效价在小鼠皮下多点注射后达 1:4-1:16(表 1).

表 1 小鼠免疫血清抗体效价

分组	双向免疫琼脂扩散试验
(1) 50 μg(纯)+F	1:4-1:8
(2) 50 μg(粗)+F	1:4-1:16
(3) 100 μg(纯)+F	1:4-1:16
(4) 100 μg(粗)+F	1:4-1:16
(5) 100 μg(纯)	1:4-1:8
(6) 100 μg(粗)	1:4-1:16
(7) 200 μg(纯)+F	1:4-1:16
(8) 200 μg(粗)+F	1:4-1:16

纯: 提取的 *C. jejuni* 28-31 ku 外膜蛋白; 粗: *C. jejuni* 甘氨酸提取物; F: 完全福氏佐剂.

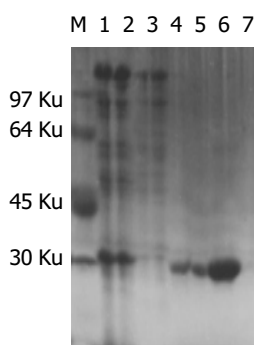


图1 *C.jejuni* 甘氨酸提取物 Sephadex G-75 纯化后 SDS-PAGE 分析. M: Marker; 1, 2: *C.jejuni* 甘氨酸提取物的 SDS-PAGE 条带; 3, 4: *C.jejuni* 的 67 ku、97 ku、108 ku 外膜蛋白; 5, 6, 7: *C.jejuni* 28-31 ku 外膜蛋白.

2.2 血清和肠黏液 IgG, IgA 抗体 BALB/c 小鼠经过 sc *C.jejuni* 外膜蛋白 28-31 ku 免疫 5 次后 10 d, 各免疫组特异性抗体 IgG, IgA 水平均较实验对照组或正常对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而实验对照组与正常对照组间抗体水平无差异 ( $P > 0.05$ , 表 2).

### 3 讨论

26-30 ku 蛋白介导 *C.jejuni* 体外黏附 HeLa 细胞, 其中 27 ku 蛋白是 *C.jejuni* 的特异性成分, 目前研究表明 27 ku 就是 28 ku. Peit *et al*<sup>[15]</sup> 认为 *C.jejuni* 的甘氨酸提取物中蛋白质 PEB1 (28 ku) 和 PEB3 (30 ku) 分子, 具有保守性, 无血清型改变, 能够作为检测不同血清学来源的 *C.jejuni* 共同的 PEB1 组分具有高度的免疫原性并有黏附真核细胞的能力. 而 29 ku 及 31 ku 多肽亦是甘氨酸提取物中的主要抗原成分, 并有研究表明该蛋白存在于整个 *C.jejuni* 菌体表面, 亦是 *C.jejuni* 共同抗原, 可作为 *C.jejuni* 的候选<sup>[17]</sup>. 为了鉴定纯化的 *C.jejuni* 28-31 ku

外膜蛋白质(图1)或甘氨酸提取物(其中含有28-31 ku蛋白质)的免疫原性, 我们采用注射免疫小鼠的方法收集资料. 由于该类蛋白质分子量较小, 为了增强免疫原性, 采用福氏完全佐剂作为该类蛋白质的佐剂. 对 BALB/c 小鼠通过 sc 间隔 6 d 接种 5 次. 检测免疫组的血清中特异性抗体的效价, 采用双向琼脂扩散试验表明该抗体效价在 1:4-1:16 之间(表 2). 并且, 在 28-31 ku 纯化物中, 出现了单一的白色沉淀线(即 28-31 ku 与其抗体的复合物). 用间接 ELISA 检测血清或肠道中特异性 IgG 或 IgA 抗体水平, 以 *A* 值表示, 抗体效价采用  $P/N \geq 2.1$  为阳性,  $P/N < 2.1$  为阴性进行结果分析, 发现免疫组的抗体分泌水平较对照组有显著升高 ( $P < 0.05$ ). 由此表明 *C.jejuni* 的 28-31 ku 抗原或 *C.jejuni* 甘氨酸提取物均能够诱导血清或肠道中有效的特异性抗体 IgG, IgA, SIgA 产生. 采用福氏完全佐剂, 其缺点是 sc 操作不便, 在多点注射时, 由于卡介苗导致的局部皮肤的炎症反应, 容易形成皮下囊肿, 影响抗原的完全吸收, 小鼠注射局部的皮下出现囊肿可以证实. 我们在第 2 次免疫后, 观察到小鼠的关节肿胀、发红的炎症反应, 与报道的该类佐剂能够诱导佐剂性关节炎一致, 常用于复制佐剂性关节炎动物模型. 因此口服或皮下注射用佐剂上调抗原的免疫原性时, 可采用其他的佐剂取代, 如 CT、LT、脂质体等佐剂的单用或联合应用, 该项工作本课题组正在开展中. 由于 *C.jejuni* 是通过粪-口途径感染, 因此作为抗胞外菌的 *C.jejuni* 而言, 黏膜免疫的研究具有了重要地位, 可以深入研究微粒体疫苗通过口服方式获得免疫力, 而以脂质体等为代表的免疫佐剂的联合应用具有了广阔的前景, 采用脂质体制备抗原包裹的微粒, 可克服口服时胃酸等肠液对抗原的破坏, 刺激小鼠产生 Th1 型免疫应答, 这正是我们的下一

表2 小鼠血清及肠道中抗体水平

分组	<i>n</i>	Serum		Intestinal fluid	
		IgG	IgA	IgG	sIgA
(1) 50 $\mu$ g(纯)+F	6	1.71 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.50 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
(2) 50 $\mu$ g(粗)+F	6	1.78 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
(3) 100 $\mu$ g(纯)+F	6	1.71 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.47 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
(4) 100 $\mu$ g(粗)+F	6	1.82 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.52 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
(5) 200 $\mu$ g(纯)+F	6	1.76 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
(6) 200 $\mu$ g(粗)+F	6	1.75 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.48 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
(7) 100 $\mu$ g(纯)	6	1.52 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.59 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
(8) 100 $\mu$ g(粗)	6	1.64 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.53 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
(9) NS+F	6	0.21 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.121 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	0.23 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	0.22 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>
(10) 正常对照	6	0.20 $\pm$ 0.17	0.11 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.17	0.21 $\pm$ 0.20
空白对照	6	0.12 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.015	0.20 $\pm$ 0.12

纯: *C.jejuni* 28-31 ku 外膜蛋白; 粗: *C.jejuni* 甘氨酸提取物; F: 完全福氏佐剂. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NS+F 组、正常对照组、空白对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 正常对照组、空白对照组.

步工作的重点. 在本实验中, 采用福氏完全佐剂的免疫调节作用, 证实了 *C.jejuni* 的 28–31 ku 分子是一种良好的免疫原, 能够诱导 BALB/c 小鼠产生特异性抗体. 该类蛋白质的研究能够为 *C.jejuni* 亚单位疫苗的研制打下初步基础.

#### 4 参考文献

- 1 Isenbarger DW, Hien BT, Ha HT, Ha TT, Bodhidatta L, Pang LW, Cam PD. Prospective study of the incidence of diarrhoea and prevalence of bacterial pathogens in a cohort of vietnamese children along the red river. *Epidemiol Infect* 2001;127:229-236
- 2 Baqar S, Rice B, Lee L, Bourgeois AL, El Din AN, Tribble DR, Heresi GP, Mourad AS, Murphy JR. Campylobacter jejuni enteritis. *Clin Infect Dis* 2001;33:901-905
- 3 Yuki N. Pathogenesis of Guillain-Barre and miller fisher syndromes subsequent to campylobacter jejuni enteritis. *Jpn J Infect Dis* 1999;52:99-105
- 4 Godschalk PC, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, Brochu D, Li J, Yuki N, Jacobs BC, van Belkum A, Endtz HP. The crucial role of Campylobacter jejuni genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barre syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1659-1665
- 5 Nishimoto Y, Yuki N. Intravenous immunoglobulin therapy for Guillain-Barre syndrome in Japan: changes in treatment after its inclusion in health insurance coverage. *Rinsho Shinkeigaku* 2004;44:633-635
- 6 Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Koga M, Mori M, Hiraga A, Kanesaka T, Hattori T, Yuki N. Does Campylobacter jejuni infection elicit "demyelinating" Guillain-Barre syndrome? *Neurology* 2004;63:529-533
- 7 Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and Campylobacter jejuni lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11404-11409
- 8 Odaka M, Yuki N, Tatsumoto M, Tateno M, Hirata K. Ataxic Guillain-Barre syndrome associated with anti-GM1b and anti-GalNAc-GD1a antibodies. *J Neurol* 2004;251:24-29
- 9 Sopwith W, Ashton M, Frost JA, Tocque K, O'Brien S, Regan M, Syed Q. Enhanced surveillance of campylobacter infection in the north west of England 1997-1999. *J Infect* 2003;46:35-45
- 10 Hopkins KL, Desai M, Frost JA, Stanley J, Logan JM. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing. *J Clin Microbiol* 2004;42:229-235
- 11 Ziprin RL, Hume ME, Young CR, Harvey RB. Inoculation of chicks with viable non-colonizing strains of Campylobacter jejuni: evaluation of protection against a colonizing strain. *Curr Microbiol* 2002;44:221-223
- 12 Nachamkin I, Ung H, Li M. Increasing fluoroquinolone resistance in campylobacter jejuni, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1501-1503
- 13 Rautelin H, Vierikko A, Hanninen ML, Vaara M. Antimicrobial susceptibilities of campylobacter strains isolated from finnish subjects infected domestically or from those infected abroad. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:102-105
- 14 Lee LH, Burg E 3rd, Baqar S, Bourgeois AL, Burr DH, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against Campylobacter jejuni. *Infect Immun* 1999;67:5799-805
- 15 Pei ZH, Ellison RT 3rd, Blaser MJ. Identification, purification, and characterization of major antigenic protein of campylobacter jejuni. *J Biol Chem* 1991;266:16363-16396
- 16 李影林. 中华医学检验全书(上卷). 北京: 人民出版社, 1996:1023-1173
- 17 Kervell M, Pages JM, Pei Z, Grollier G, Blaser MJ, Fauchere JL. Isolation and characterization of two Campylobacter glycine-extracted protein that bind to HeLa cell membrane. *Infect Immun* 1993;61:3440-3448

### World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色. 若不符, 请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的是与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术的有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.



# 肝部分切除大鼠肠源性内毒素血症与肝再生的关系

许翠萍, 韩德五, 张 杨, 赵元昌, 尹 镭

许翠萍, 山西医科大学第一医院消化内科 山西省太原市 030001  
韩德五, 张杨, 赵元昌, 尹镭, 山西医科大学病理生理教研室  
山西省太原市 030001  
许翠萍, 女, 1965-01-03 生, 山西省介休市人, 汉族, 博士生, 副主任医师。  
主要从事慢性肝病相关研究, 发表论文 15 篇。  
项目负责人: 许翠萍, 030001, 山西省太原市解放南路 85 号 358 信箱, 山西  
医科大学第一医院消化内科. 99jxcp@sina.com  
电话: 0351-4184680  
收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-20

## Relationship between intestinal endotoxemia and liver regeneration after partial hepatectomy in rats

Cui-Ping Xu, De-Wu Han, Yang Zhang, Yuan-Chang Zhao, Lei Yin

Cui-Ping Xu, Department of Digestive Diseases, First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
De-Wu Han, Yang Zhang, Yuan-Chang Zhao, Lei Yin, Department of Pathophysiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Correspondence to: Dr. Cui-Ping Xu, Department of Digestive Diseases, First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, 85 South Jiefang Road, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. 99jxcp@sina.com  
Received: 2004-09-18 Accepted: 2004-10-20

## Abstract

**AIM:** To investigate the dynamic changes and the relationship between intestinal endotoxemia (IETM) and liver regeneration after partial hepatectomy (PH) in rats.

**METHODS:** Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control (NC) group, sham operation (SO) group and PH group. Levels of endotoxin (ET) in blood were measured in rats of each group 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120 and 168 h after PH, respectively. Liver regeneration was evaluated by different methods.

**RESULTS:** Plasma endotoxin level was increased in PH group during 6-72 h after PH, and the levels appeared at 12 and 48 h were significantly higher than those at the corresponding time point in NC and SO groups (12 h:  $P = 0.002 < 0.01$  vs NC, SO; 48 h:  $P = 0.002 < 0.01$  vs NC,  $P = 0.000 < 0.01$  vs SO). However, ET returned to normal level after 72 h. After PH, the weight of remnant liver, the rate of liver regeneration, the percent of S phase liver cells and the index of PCNA in liver were increased significantly, but there was no relationship between these data and plasma ET. In NC and SO groups, liver regeneration showed no significant difference between the different time points.

**CONCLUSION:** There is no relationship between IETM and liver regeneration after PH, suggesting that IETM has no direct effects on liver regeneration.

Xu CP, Han DW, Zhang Y, Zhao YC, Yin L. Relationship between intestinal endotoxemia and liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(12):2817-2821

## 摘要

**目的:** 观察肝部分切除大鼠肠源性内毒素血症的动态变化与肝再生的关系。

**方法:** 随机将 Wistar 大鼠分为正常对照组 (NC)、假手术组 (SO) 和肝大部切除组 (PH), 测定 NC 组及 SO, PH 组术后 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168 h 血浆 ET 浓度, 同时动态观察残余肝组织的再生情况。

**结果:** PH 组大鼠血浆 ET 浓度在 PH 后 6-72 h 升高, 期间出现 2 次峰值, 第 1 次在 PH 后 12 h, 第 2 次在 PH 后 48 h, 明显高于 NC 组及 SO 组对应时间点 ( $P < 0.01$ ), 72 h 后迅速下降至 NC 组水平。PH 后残余肝质量、肝再生率均出现明显的动态变化, 但分别与血浆内毒素水平的变化趋势比较, 相关系数分别为  $-0.408 (P > 0.05)$ ,  $-0.167 (P > 0.05)$ ; PH 后再生肝组织 DNA 合成 S 期肝细胞的数量、PCNA 的标记指数均出现显著动态改变, 但分别与血浆 ET 水平的变化趋势比较, 相关系数分别为  $0.062 (P > 0.05)$ ,  $0.058 (P > 0.05)$ 。NC, SO 肝组织中上述反映肝再生的指标改变不明显。

**结论:** PH 后残余肝再生全程中 IETM 的变化与肝再生程度的变化无关, 提示 IETM 对肝再生程度没有产生直接影响, 但不能否定因 IETM 所引起细胞因子的释放而导致对肝再生的影响作用。

许翠萍, 韩德五, 张杨, 赵元昌, 尹镭. 肝部分切除大鼠肠源性内毒素血症与肝再生的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12(12):2817-2821  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2817.asp>

## 0 引言

大鼠肝部分切除 (partial hepatectomy, PH) 后伴随肠源性内毒素血症 (intestinal endotoxemia, IETM) 的产生并影响残余肝组织的再生<sup>[1-3]</sup>, 对 IETM 在 PH 后的动态变化以及与残余肝组织再生的关系目前未见系统研究报道。肝再生是肝损伤或 PH 后肝脏修复的必经过程, 有多种方法可用于肝再生状态的观察, 但各有优缺点<sup>[4]</sup>, 目前还没有公认的金标准。为弥补方法学的不足, 我们以大鼠 PH 后残余肝组织再生为研究模型, 通过测量再生肝质量, 计算残肝再生率, 测定 S 期肝细胞含量, 检测增生细胞核抗原 (PCNA) 表达的方法, 从不同侧面反

映肝再生的情况,旨在探讨IETM与PH后残余肝组织再生状态的关系,衡量IETM在肝再生过程中的作用.

## 1 材料与方法

1.1 材料 健康♂ Wistar大鼠120只,体质量 $200 \pm 20$  g,由山西医科大学实验动物中心提供.动物经适应性饲养1 wk后随机分为3组. I 正常对照(normal contrast, NC)组8只,不施加任何处理因素; II 假手术(sham operation, SO)组48只,于腹部正中施加3 cm切口暴露腹腔,摆动肝脏左叶与中叶,关闭腹腔; III 手术(PH)组64只,依据Higgins创建的经典方法,腹部正中切口进入腹腔,轻轻挤出肝脏的左叶和中叶于肝蒂部结扎,于结扎点远端切除肝脏的左叶和中叶(切除量约占全肝的68-70%),称被切除肝质量,关闭腹腔.

1.2 方法 动物经10 g/L戊巴比妥钠(30 mg/kg)ip麻醉,SO及PH均在上午08:00-10:00进行.术前动物禁食12 h但不限水,术时严格无菌操作,术后保温并自由进食、水,观察NC动物(0 h)与术后6, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168 h,每个时相点保证至少6只大鼠存活.在不同预定时相点经腹主动脉无菌抽血留血浆 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备检.切除全肝并称肝湿质量,于肝右叶取部分组织以40 g/L中性甲醛固定,石蜡包埋,4  $\mu\text{m}$ 切片,供免疫组织化学检测.同时取肝右叶部分组织用0.5 g/L胶原酶消化,制作单细胞悬液,悬于 $-20^{\circ}\text{C}$ ,700 mL/L乙醇固定, $-4^{\circ}\text{C}$ 保存,供(流式细胞术)FCM检测.血浆ET检测使用可定量检测微量内毒素的鲎试剂盒(上海伊华).FCM检测使用FACS Calibur型流式细胞仪(美国Becton Dickinson),用碘化丙啶(PI)定量DNA荧光染色法染色,鸡红细胞作标准样品,调整仪器的CV值在5%以内,每份样品检测30 000个细胞,计数活细胞总数, S期(DNA合成期)肝细胞数,求出每例样本S期肝细胞百分含量(S期肝细胞数/活细胞总数).肝组织增生细胞核抗原(PCNA)检测用鼠抗PCNA mAb(PC10, IgG<sub>2a</sub>),即用型SABC免疫组化染色试剂盒、DAB显色试剂盒(武汉博士德公司).石蜡包埋肝组织4  $\mu\text{m}$ 切片,切片常规脱蜡至水,15 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭内源性过氧化物酶,室温30 min,蒸馏水振洗2 min  $\times$  3, 10 mmol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)煮沸20 min,冷却后PBS(pH 7.2-7.6)振洗2 min  $\times$  3,滴加正常山羊血清封闭液,室温20 min,甩去多余液体后加入鼠抗PCNA mAb(1:50),湿盒中4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. PBS振洗2 min  $\times$  3;加生物素标记羊抗鼠抗体,湿盒中室温30 min, PBS振洗2 min  $\times$  3;加预先混合的SABC复合物,室温30 min, PBS振洗2 min  $\times$  3;加临时配制的DAB显色液,显微镜下观察显色,苏木素轻度衬染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片.实验结果判定:PCNA阳性染色呈棕黄色颗粒,同时设置空白对照(以PBS代替第1抗体与第2抗体)、阳性对照(以已知有PCNA表达的大鼠肝组织石蜡切片).染色结果由两个独立的观察

者使用奥林巴斯光学显微镜报告.结果判定标准为PCNA在肝细胞核呈界限清楚的棕色反应为阳性,阳性结果分级标准为随机记录10个高倍(200  $\times$ )视野中,每个视野记数100个肝细胞,按下列公式计算PCNA的指数:PCNA标记指数=染色阳性细胞数 $\times$ 100%/全部肝细胞数.

**统计学处理** 实验结果以mean  $\pm$  SD表示,采用SPSS软件包(11.0版),进行 $t$ 检验,方差分析,相关和回归分析,以 $P < 0.05$ 认为差异有显著性.

## 2 结果

2.1 血浆ET水平动态变化 SO组术后6 h达到峰值,与NC组比较,差异无显著性( $P > 0.05$ ). PH组在术后6 h明显升高,与NC组比较( $P < 0.05$ ),与SO组对应时相点比较( $P > 0.05$ );术后12 h达到峰值 $4432 \pm 249$  EU/L,与NC组及SO组相应时相点比较( $P < 0.01$ );术后24、36 h血浆ET水平有下降趋势,但均高于NC组及与SO组相应时间点( $P < 0.05$ );术后48 h再次出现峰值 $4024 \pm 425$  EU/L,12、24 h数值比较( $P > 0.05$ );与NC及与SO组相应时间点比较( $P < 0.01$ );术后72-168 h血浆ET水平迅速下降,与NC及与SO组相应时间点比较( $P > 0.05$ ,图1).

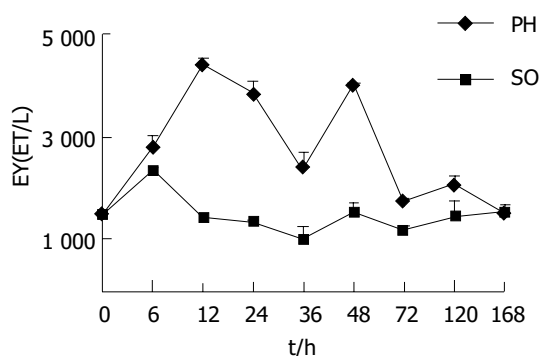


图1 大鼠血浆内毒素变化.

2.2 肝质量与血浆ET关系 SO, PH组肝质量随时间延长逐渐增加. PH术后在不同时相点的肝质量与PH时的残余肝质量比较, PH后6、12 h差异无显著性,残肝质量增加幅度较慢; PH后24、36、48 h差异有显著性( $P < 0.05$ ),残肝质量增加幅度加快; PH 48 h以后,残肝体积开始明显增加,72、120、168 h有非常显著性差异( $P < 0.01$ ),残肝质量增加幅度明显加快,168 h时残肝质量达 $(8.42 \pm 0.75)$  g,接近SO组相应时相点的肝脏质量 $(9.44 \pm 1.30)$  g,术后168 h PH组与SO组肝脏质量比较差异无显著性. SO组在全部观察时相点肝脏质量变化不大,组内两两比较( $P > 0.05$ ). 两组均为肝湿质量. PH组残肝质量的变化与血浆ET水平变化特征的相关分析,  $r = -0.408$  ( $P > 0.05$ ,图2、3).

2.3 残肝再生率与血浆ET关系 将正常组8只大鼠称体,切除全肝称量,全肝质量为 $(8.10 \pm 0.76)$  g.再切除左叶和中叶称量,被切除肝质量为 $(5.52 \pm 0.65)$  g,得出PH组预切除的肝左叶和中叶占全肝质量 $(69.2 \pm 1.2\%)$ .

同时求得肝脏质量( $Y$ )与体质量( $X$ )间函数变化关系  $Y=0.088X-8.635$ , 称取制模时切除的肝组织质量及术后再生肝质量, 观察残肝再生率的演变. 将已建立肝再生模型对照组SD大鼠行SO时的大鼠体质量( $X$ )代入上式中求得相应之肝质量. 残肝再生过程中在不同时相点的再生率  $=S/E \times 100$ , 其中  $S$ 、 $E$  分别代表动物处死时每克体质量的肝质量和术前每克体质量的肝质量,  $E$  可用被切除肝叶质量/肝切除率推算. 本实验中NC组大鼠肝切除率为  $(69.2 \pm 1.2\%)$ . PH组的肝再生率随时间的延长出现增高趋势, SO组肝脏质量的变化幅度较小. PH组肝再生率变化与血浆ET变化特征的相关分析  $r = -0.167$ ,  $P > 0.05$ , 图4).

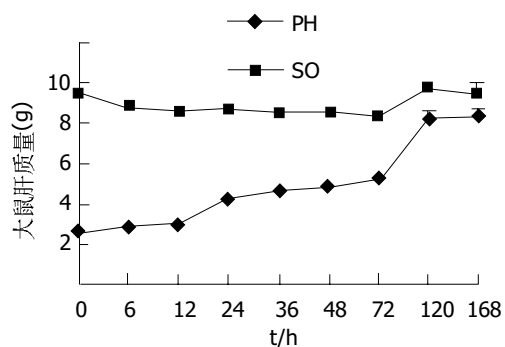


图2 实验动物肝脏质量的变化.

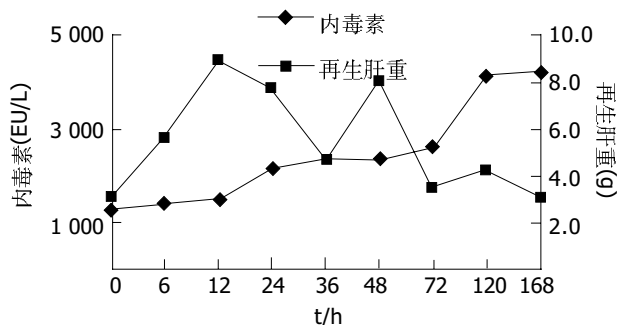


图3 PH大鼠血浆内毒素与再生肝质量的变化.

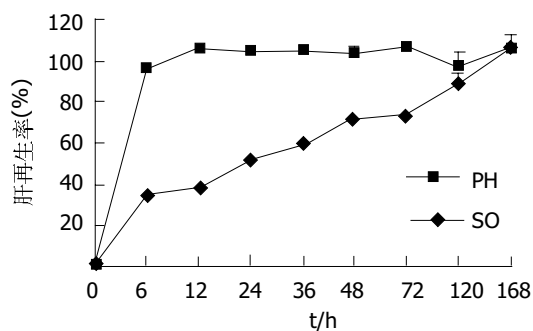


图4 实验动物肝再生率变化.

2.4 再生肝S期肝细胞与血浆ET的关系 SO组各时相点与NC组比较均无显著性差异. PH组术后较术前明显增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 24、48、72 h 3次达峰. 残肝体积和质量的增加速度也相应呈现3个加速期, 第1

加速期出现在术后24 h, 第2加速期在术后48 h, 第3加速期持续到术后72 h. 肝组织S期肝细胞百分含量与血浆ET变化特征与的相关分析,  $r = 0.062$ ,  $P > 0.05$ , 图5).

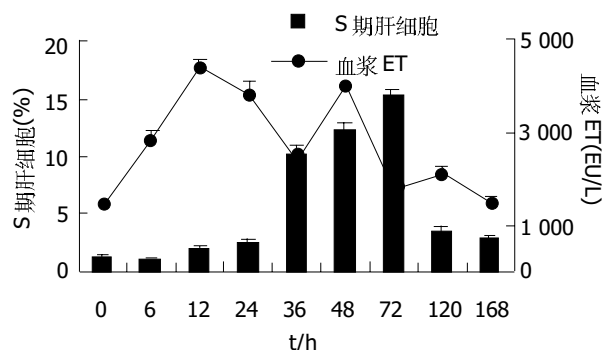


图5 PH大鼠肝S期细胞与血浆ET变化.

2.5 肝组织PCNA标记指数的变化 SO组各时相点与NC组比较均无显著性差异. PH组术后12 h即开始增加, 24 h明显增加, 72 h达到高峰, 标记指数近79%, 此后逐渐下降, 至7 d接近术前水平, 但与NC组比较( $P < 0.05$ ). SO、PH组对应时相点比较, 自12–120 h, 差异均有显著性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), PCNA标记指数与肝组织S期细胞百分含量相关分析  $r = 0.957$ ,  $P < 0.01$ . PH组PCNA标记指数与血浆ET水平的动态变化相关分析,  $r = 0.058$ ,  $P > 0.05$ , 图6–9).

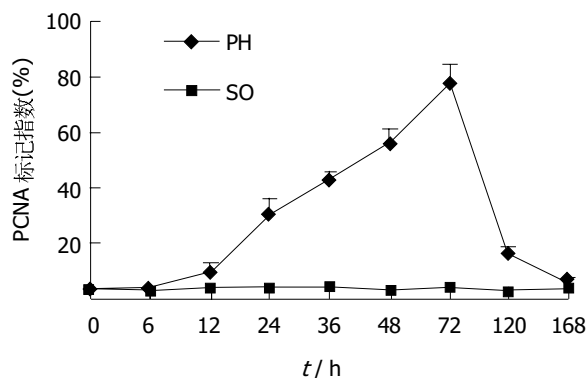


图6 大鼠肝组织PCNA标记指数的变化.

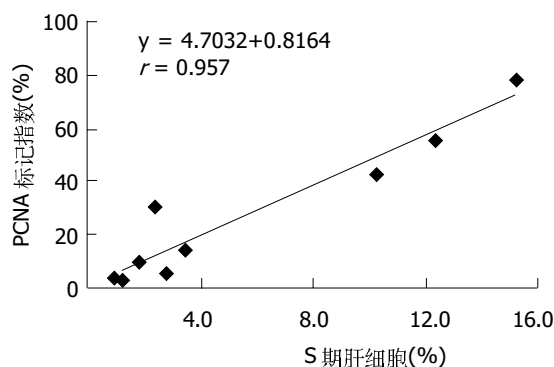


图7 肝组织S期细胞百分含量与PCNA标记指数相关.

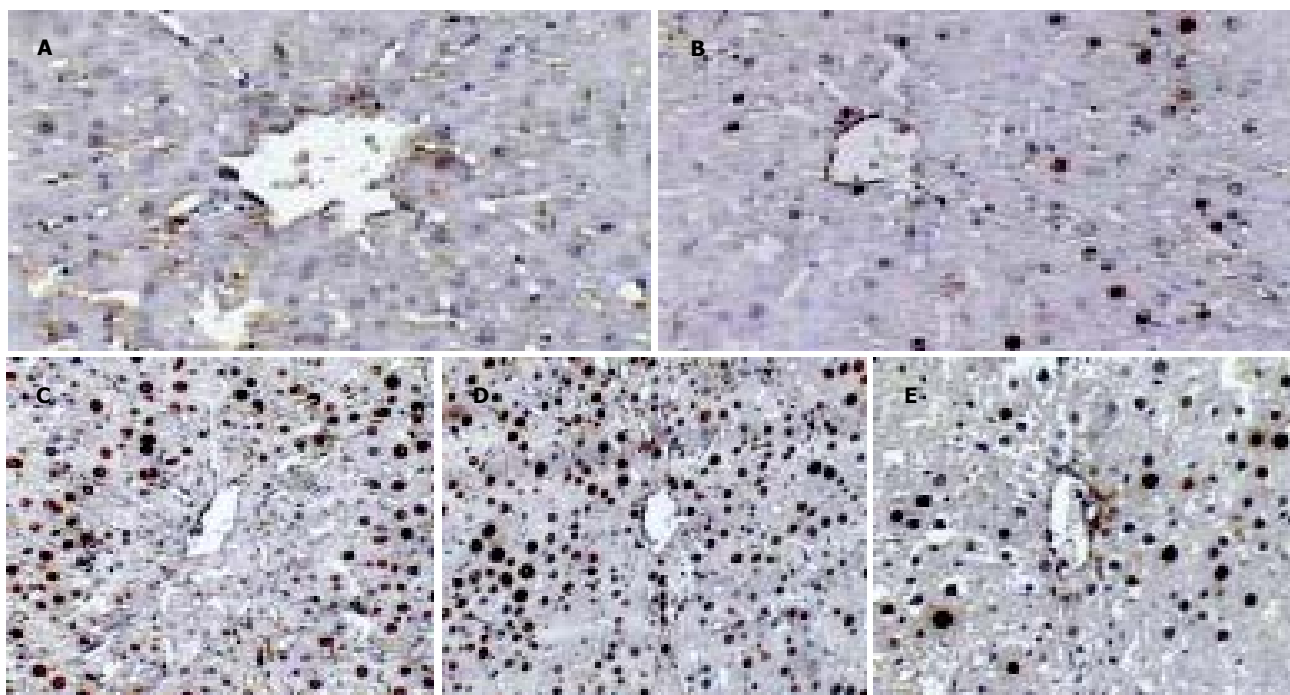


图8 PH大鼠肝PCNA表达SABC  $\times 100$ . A: NC大鼠; B: 术后24 h; C: 术后48 h; D: 术后72 h; E: 术后120 h.

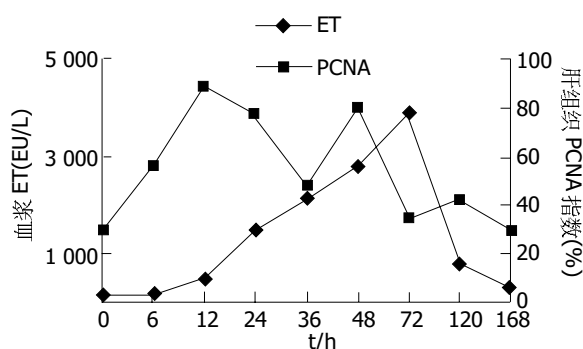


图9 PH大鼠肝组织PCNA阳性率与血浆ET变化趋势。

### 3 讨论

近年来, IETM在慢性肝病发生发展中的作用越来越受到关注, 韩德五 *et al*<sup>[5-9]</sup>认为 IETM是肝功能衰竭发生的物质基础. 肝组织的再生功能与肝功能衰竭的发生有密切的关系, 目前有关 ET与肝再生关系的系统研究大多基于外源性给予被研究动物 LPS<sup>[10-11]</sup>. 对肠源性内毒素与肝再生关系的系统研究未见报道. 我们通过建立大鼠 PH模型, 检测血浆 ET变化情况与衡量肝再生相关指标的改变, 评价 PH后 IETM与残余肝组织再生程度的关系, 旨在明确肠源性内毒素对肝再生的影响, 为延缓慢性肝病时肝功能衰竭的发生提供理论依据. 结果表明, PH组血浆 ET水平在 PH后 6-72 h升高, 期间出现2次峰值, 第1次在 PH后 12 h, 第2次在 PH后 48 h, 分别与 NC及 SO组相应时相点比较 ( $P < 0.01$ ), 72 h后迅速下降至 NC组水平.

残肝质量变化是较直观、简单的方法, 但准确性不高. 肝再生率排除了肝再生过程中体质量变化的影响, 能比较准确地反映肝再生情况. 本实验 PH后肝脏质量

的变化大致可以分为3个快速增长时期, 即 24-48 h, 48-72 h, 72-168 h, 而且 48 h后, 残肝的质量增长加速, 72 h后增长最为显著. PH后残肝再生率随时间的延长也显示增高趋势, 与肝脏质量的变化趋势相似. PH后残肝质量变化、肝再生率变化均出现增高趋势, 但分别与血浆内毒素水平的变化趋势经直线相关回归分析, 相关系数分别为  $-0.408 (P > 0.05)$ ,  $-0.167 (P > 0.05)$ , 提示血浆 ET水平的变化与肝脏质量、体积的增长变化无关.

PCNA是与细胞增生密切相关的核内酸性蛋白质, 存在并合成于核内, 静止细胞中PCNA含量很少, 增生细胞和转化细胞中其含量发生明显变化, 大部分 G0-G1期细胞无明显的PCNA表达, G1晚期其表达度增加, S期达到高峰, G2-M期下降, 其含量和表达强弱的变化与DNA合成及DNA复制的活跃程度是一致的, 同时这个变化与再生肝组织DNA合成S期肝细胞的数量变化一致, 因此, PCNA是评价肝脏再生的一个客观指标. 本实验中再生肝细胞DNA合成S期肝细胞的数量变化以 24, 48, 72 h变化最明显, 残肝组织PCNA的标记指数也是在这3个时间点变化最显著, 二者的动态变化具高度显著相关正 ( $r = 0.957$ ,  $P < 0.01$ ). 这些事实说明肝细胞的再生在 24-72 h之内是DNA合成最活跃的时期, 也反映了DNA合成的活跃程度. 而 72 h-1 wk时, 残肝体积增长迅速, 质量明显增加, 1 wk时基本上已恢复到术前水平, 这说明肝细胞的再生在这一时期内, 以细胞的分裂增生为主. 但将再生肝组织DNA合成S期肝细胞的数量变化、再生肝组织PCNA的标记指数变化分别与血浆 ET水平的变化经直线相关与回归分析, 显示均无相关关系 ( $r = 0.062$ ,  $r = 0.058$ ;  $P > 0.05$ ). PH后 IETM的

动态变化与残肝再生的程度及肝细胞增生的活跃程度不存在相关关系, 提示 PH 后 IETM 的变化没有对肝再生程度产生直接影响. 但由于肝再生是多阶段、多因素参与的精确、有序的调节过程, 且肝细胞增生与肝再生微环境密切相关. 故本实验结果并不能否认因 IETM 所引起 KC 的激活、细胞因子的释放而导致的对肝再生的影响作用<sup>[12]</sup>.

#### 4 参考文献

- 1 Cornell RP, Liljequist BL, Bartizal KF. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology* 1990;11:916-922
- 2 Alexandris IH, Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Patsoukis N, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Oxidative state in intestine and liver after partial hepatectomy in rats. Effect of bombesin and neurotensin. *Clin Biochem* 2004;37:350-356
- 3 Houdijk AP, Meijer C, Cuesta MA, Meyer S, Van Leeuwen PA. Perioperative anti-endotoxin strategies. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997;222:93-97
- 4 Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 1997; 26:945-952
- 5 韩德五. 肝功能衰竭的发病机制的研究 - 肠源性内毒素血症假说. *中华肝脏病杂志* 1995;3:134-137
- 6 赵龙凤, 韩德五. 肝病患者内毒素血症的临床意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:391-393
- 7 韩德五. 肠源性内毒素血症所致“继发性肝损伤”的临床依据. *世界华人消化杂志* 1999;9:1055-1058
- 8 Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002;8:961-965
- 9 韩德五. 肠源性内毒素血症与肝病. 第 1 版. 北京: 中国科学技术出版社, 2004:78-109
- 10 Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S. Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. *Gastroenterology* 2002;123:352-364
- 11 Sakaguchi T, Nakamura S, Suzuki S, Oda T, Ichiyama A, Baba S, Okamoto T. Participation of platelet-activating factor in the lipopolysaccharide-induced liver injury in partially hepatectomized rats. *Hepatology* 1999;30:959-967
- 12 Straatsburg IH, Boermeester MA, Houdijk AP, Frederiks WM, Wesdorp RI, Van Leeuwen PA, Van Noorden CJ. Endotoxin- and cytokine-mediated effects on liver cell proliferation and lipid metabolism after partial hepatectomy: a study with recombinant N-terminal bactericidal/permeability-increasing protein and interleukin-1 receptor antagonist. *J Pathol* 1996; 179:100-105

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

• 消息 •

### *World Journal of Gastroenterology* 栏目设置

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

### *World Journal of Gastroenterology* 稿件管理

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

# 急性重症胰腺炎血液滤过治疗的机制

李磊, 汤耀卿, 毛恩强, 秦帅, 陈胜, 张明钧

李磊, 汤耀卿, 毛恩强, 秦帅, 陈胜, 上海第二医科大学附属瑞金医院外科 上海市 200025

张明钧, 上海第二医科大学附属瑞金医院上海消化外科研究所 上海市 200025

李磊, 男, 1972-10-23 生, 山东省青岛市人, 上海第二医科大学博士生, 主要从事外科危重病研究。

项目负责人: 汤耀卿, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学附属瑞金医院外科。yaoqt@medmail.com.cn

电话: 021-643 70045-666068

收稿日期: 2004-09-29 接受日期: 2004-10-27

## Mechanism of hemofiltration in treatment of severe acute pancreatitis

Lei Li, Yao-Qing Tang, En-Qiang Mao, Shuai Qin, Sheng Chen, Ming-Jun Zhang

Lei Li, Yao-Qing Tang, En-Qiang Mao, Shuai Qin, Sheng Chen, Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China

Ming-Jun Zhang, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Yao-Qing Tang, Department of Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, 197 Second Ruijin Road, Shanghai 200025, China. yaoqt@medmail.com.cn

Received: 2004-09-29 Accepted: 2004-10-27

## Abstract

AIM: To study the mechanism of hemofiltration in the reduction of systemic inflammatory response in severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: A mixture composed of sodium taurocholate (50 g/L) and bile was antidromically injected into pancreatic duct of dogs to establish SAP model. Two hours later, hemofiltration was performed (last 2 h). Heart rate, as well as the acute injury scores of lung, liver and pancreas were compared between model and test groups. Nuclear translocation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) was detected by Western blotting, and TNF- $\alpha$  mRNA expression was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. Then the therapeutic mechanism of hemofiltration in SAP was analyzed.

RESULTS: Significant decrease of heart rates was observed 8 and 12 h after the hemofiltration ( $P=0.0181<0.05$ ,  $P=0.0141<0.05$  respectively). Hemofiltration resulted in reduction of pulmonary pathological score ( $1\pm0.63$  vs  $2.83\pm0.75$ ,  $P=0.001<0.01$ ), but did not affect hepatic and pancreatic ones. NF- $\kappa$ B nuclear translocation and TNF- $\alpha$  expression were inhibited by hemofiltration both in lung and in liver.

CONCLUSION: Hemofiltration ameliorates pulmonary and hepatic inflammatory response induced by SAP. This may relate to removal of the over-produced pro-inflammatory

cytokines from circulation.

Li L, Tang YQ, Mao EQ, Qin S, Chen S, Zhang MJ. Mechanism of hemofiltration in treatment of severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(12):2822-2825

## 摘要

目的: 探讨血液滤过减轻急性重症胰腺炎(SAP)全身炎症反应的机制。

方法: 逆行性胰管注射50 g/L牛黄胆酸钠自身胆汁制备犬SAP动物模型, 2 h后实施血液滤过2 h, 并设立对照组(制模后仅给予深静脉穿刺插管而不血液滤过)。记录不同时间段心率, 12 h处死动物后通过病理学评分评价肺、肝脏和胰腺组织损伤情况, Western blotting法检测肺和肝脏组织核转录因子NF- $\kappa$ B的核移位及RT-PCR检测肿瘤坏死因子TNF- $\alpha$  mRNA表达, 通过比较血滤组和对照组脏器组织炎性激活和损伤的情况, 分析血液滤过的作用机制。

结果: 血滤前心率两组之间无显著差异, 血滤后各时间点均为对照组显著高于血滤组。病理学评分显示血滤减轻肺脏的损伤, 而对肝脏和胰腺损伤作用不明显。NF- $\kappa$ B核移位和TNF- $\alpha$  mRNA表达均为血滤组低于对照组。

结论: 血液滤过减轻肺、肝脏等远离病灶器官的炎症激活和损伤, 这一作用可能同血液中致炎因子的滤过清除有关。

李磊, 汤耀卿, 毛恩强, 秦帅, 陈胜, 张明钧. 急性重症胰腺炎血液滤过治疗的机制. *世界华人消化杂志* 2004;12(12):2822-2825

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2822.asp>

## 0 引言

血液滤过(hemofiltration, HF)可以缓解急性全身炎症反应综合征(SIRS)病情, 在急性重症胰腺炎(SAP)等危重疾病治疗中的应用价值已经得到广泛的认可<sup>[1-4]</sup>。一般认为这种作用同血液滤过清除血液循环中的炎症递质有关<sup>[5]</sup>。但目前尚没有研究进一步探讨血液滤过对远离原发病灶器官炎症激活和损伤的影响。我们观察血液滤过对犬SAP时肺脏和肝脏的保护作用, 就血液滤过的作用机制进行进一步探索。

## 1 材料和和方法

1.1 材料 杂种犬12只, 质量体重20-30 kg, 雌雄兼有, 无基础病变。急性重症胰腺炎制模前12 h禁食, 自由饮水; im 盐酸氯安酮0.2 g, 阿托品0.5 mg 诱导麻

醉, iv 25 g/L 异戊巴比妥维持麻醉. 气管插管, 连接心电监护仪, 开放静脉通路, 必要时用呼吸机; 取上腹部正中切口进入腹腔, 找到胆囊后抽取动物自身胆汁 5 mL; 纵行切开十二指肠降部对系膜面, 寻找主乳头开口, 将一硬膜外麻醉管插入主胰管内约 5 cm, 然后加压注入 50 g/L 牛黄胆酸钠 0.7 mL/kg 和自身胆汁 2–3 mL 混合液, 注射时间为 20 s, 停留 5 min 后拔出麻醉管, 缝合十二指肠壁; 行膀胱造漏置管; 关闭腹部切口. 动物共分两组, 每组 6 只: 对照组制模后给予常规补液、呼吸机等处理, 维持各项生命体征稳定; 血滤组除给予补液、呼吸机等处理外, 制模 2 h 后开始血液滤过.

**1.2 方法** 采用宁波亚泰医疗有限公司出品的 YT-120 聚砜血滤器, 普通肝素抗凝, 前置换方式补充置换液. 置换液流速: 2 000 mL/h (1 700–2 400 mL/h); 血液流速: 180 mL/h (160–200 mL/h); 超滤速度: 50 mL/h; 治疗时间: 2 h. 记录心电监护设备显示各时间点数值; 12 h 处死动物后收集腹水并计算腹水量 (mL/kg). 处死动物后取出胰腺、肝脏、肺脏以及肾脏组织, 40 g/L 甲醛保存; 病理组织石蜡包埋和 HE 染色由瑞金医院病理科完成; 病理学评分由本院病理科医生盲态下完成. 评分标准参照文献<sup>[6–8]</sup>. 待测脏器组织取出后立刻置于冻存管并在液氮中保存; 检测时取组织约 150 mg, 加入匀浆缓冲液 A 0.5 mL, 冰中匀浆 10 min, 取上清液; 10 000 g 离心 10 min, 去除上清液后加入匀浆缓冲液 B 混匀, 10 000 g 离心 2 min, 取上清液为核内容物,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存. 配制分离胶和积层胶, 样品变性, 加样, 每个加样孔加样 15  $\mu\text{L}$  (总蛋白量 100  $\mu\text{g}$ ), 80V SDS-PAGE 电泳; 电泳后将条带转移到硝酸纤维膜上, 去离子水洗膜, 20 g/L 白蛋白常温封闭 1 h, 分别加入 1:500 的一抗和二抗 (美国 Santa cruz 公司), NBT/BCIP 显色. 免疫印迹法 (Western blotting) 检测组织细胞核内 NF- $\kappa\text{B}$  蛋白总量. RT-PCR 比较 IL-10

和 TNF- $\alpha$  组织中表达 IL-10 上游引物和下游引物分别为 5' -GAC AAG CTG GAC AAC ATA CTG CTG ACC-3' 和 5' -TCC TAG AGT CGA GAA GAG TTG CCA TCC-3'; TNF- $\alpha$  的上游引物和下游引物分别为 5' -ACT CTT CTG CCT GCT GCA CTT TGG-3' 和 5' -GTT GAC CTT TGT CTG GTA GGA GAC GG-3' 内参照 G3PDH 的上游引物和下游引物分别为 5' -GAA CGG GAA GCT CAC TGG CAT GGC-3' 和 5' -TGA GGT CCA CCA CCC TGT TGC TG-3'. 引物由上海生工生物工程研究所合成. TRIzol (美国 GIBCO 公司) 法抽提总 RNA, 步骤参照试剂盒提供方法进行. 抽提的 RNA 经紫外分光光度仪检测  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ . 一步法 RT-PCR 按照试剂盒 (美国 Promega 公司) 说明进行扩增. 产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳 30 min, 计算机扫描.

**统计学处理** 计量资料以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示; 数据比较采用团体  $t$  检验;  $P < 0.05$  有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 心率、腹水** 血滤前 (制模后 2 h) 两组心率无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 制模后 4 h HF 组较 NHF 组低但无显著差异 ( $P = 0.0515$ ), 8 h 和 12 h 均是 HF 组显著低于 NHF 组 ( $P = 0.0181$  和  $0.0141$ ). HF 组和 NHF 组动物腹水量分别为  $31.1 \pm 5.6$  和  $12.7 \pm 2.9$ , 两组间有显著性差异 ( $P = 0.001$ ).

**2.2 肝、肺、胰急性损伤评分** HF 组肺脏急性损伤评分显著低于 NHF 组 ( $1 \pm 0.63$  vs  $2.83 \pm 0.75$ ,  $P = 0.001$ ) (图 1A, B); 肝 ( $2.17 \pm 0.75$  vs  $2.83 \pm 0.75$ , 图 1C) 和胰 ( $10 \pm 1.30$  vs  $10.83 \pm 1.78$ , 图 1D) 急性损伤评分两组无显著差异 ( $P = 0.1561$  和  $0.3766$ ).

**2.3 肝、肺组织细胞核 NF- $\kappa\text{B}$  含量和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达** HF 组 NF- $\kappa\text{B}$  细胞核含量较 NHF 组低 (图 2A, B).

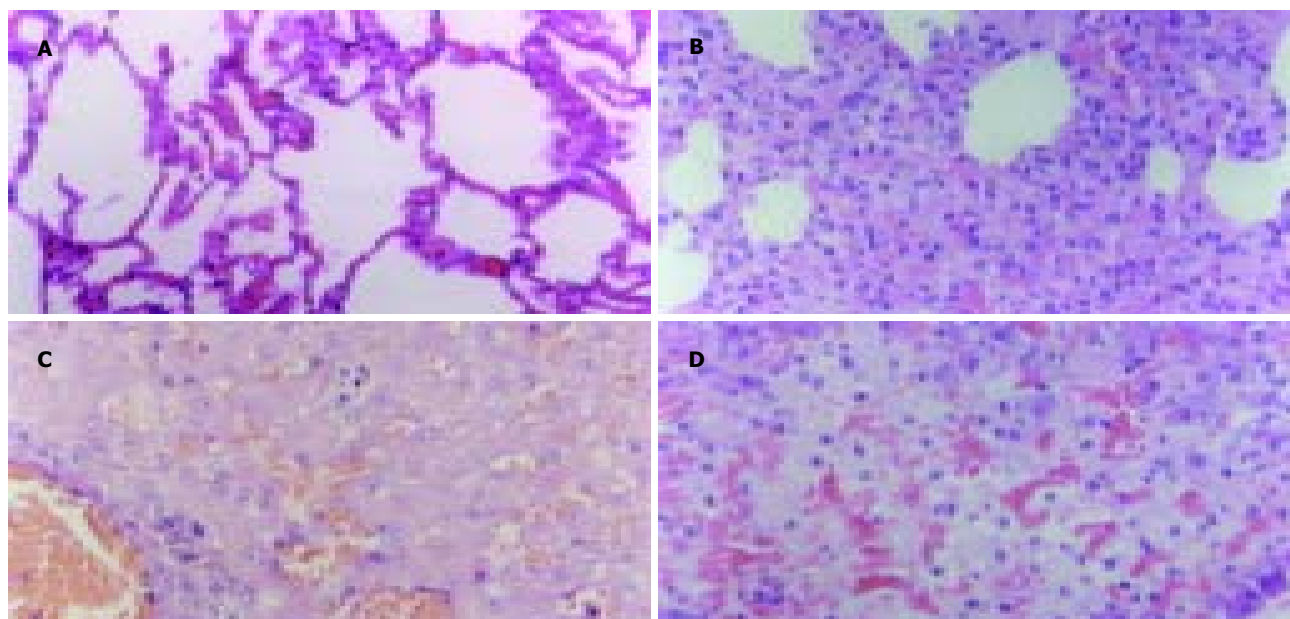


图1 肺、肝、胰病理学改变 HE  $\times 400$ . A:  $400 \times$  HF 组肺泡结构清楚, 少量炎性细胞浸润; B:  $400 \times$  NHF 组可见严重肺实变及多量炎性细胞浸润; C  $400 \times$  NHF 组和 HF 组肝脏坏死均不明显; D:  $400 \times$  NHF 组和 HF 组胰腺均出现大量出血坏死和炎性细胞浸润.



半定量 RT-PCR 显示 HF 组肝(图 3A)、肺(图 3B)TNF- $\alpha$  mRNA 表达较 NHF 组低。

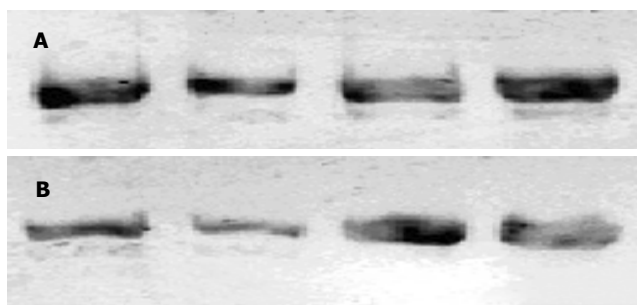


图2 肝、肺组织细胞核 NF- $\kappa$ B 含量 1, 2 HF 组; 3、4 NHF 组。A: 肝脏; B: 肺脏。

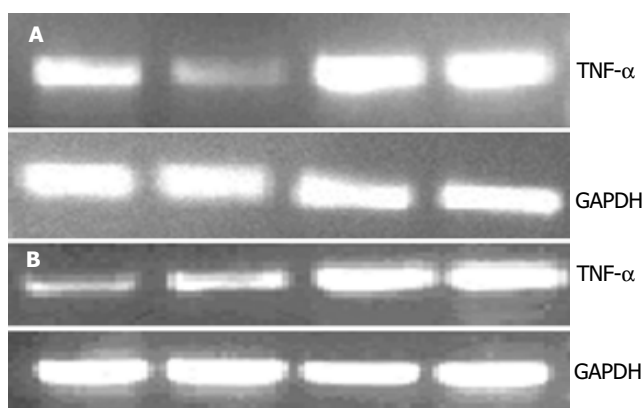


图3 肝、肺组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达 1、2 HF 组; 3、4 NHF 组。A: 肝脏; B: 肺脏。

### 3 讨论

我们曾发现短时血液滤过显著降低 SAP 患者血液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、8 等促炎细胞因子水平, 而以 IL-10 为主的抗炎细胞因子却呈上升趋势<sup>[9]</sup>。全身炎症反应过度激活造成肺、肝脏及肾脏等远离胰腺病灶器官的炎性损伤是多脏器功能障碍综合征(MODS)发生的直接原因。在本研究中我们观察到: 在血液滤过过程中, SAP 犬的心率呈下降的趋势, 在血滤停止后轻度上升, 而对照组在制作模型后全程呈现上升的趋势, 且在 4、8 和 12 h 心率对照组均较血滤组高, 其中 8 和 12 h 两组之间差异显著。腹水的量是判断腹膜炎严重程度的一项重要指标。血滤组的腹水/kg 比值显著低于对照组, 说明血液滤过能减轻腹膜炎程度。我们还通过病理学评分比较了制模 12 h 后两组动物肺、肝和胰腺的急性损伤情况, 结果显示血液滤过减轻远隔脏器, 特别是肺脏的损伤。以上结果表明, 血液滤过达到减轻全身炎症反应和远离胰腺病灶器官炎症反应的目的。血液滤过减轻急性胰腺炎初期全身炎症反应程度可能同清除了血液中的促炎递质有关<sup>[5, 10-11]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-1、6 等促炎细胞因子的分子量集中在  $M$  10 000–30 000, 而半透膜滤过孔径的上限是  $M$  30 000<sup>[12]</sup>, 这样通过过度释放入血的细胞因子可能通过滤过膜的微孔而被清除出体外。为增加炎

性物质的清除效率, 近年来的多项研究采用多粘菌素 B 纤维血液灌流和活性炭血液灌流等方法, 取得了更加显著的效果<sup>[13-14]</sup>。

在本研究我们观察血液滤过是否能影响到远离病灶器官的炎症反应激活程度。Western blot 法检测肺脏和肝脏组织细胞核提取物核转录因子 NF- $\kappa$ B 含量显示血滤组低于对照组; 半定量 RT-PCR 检测肝脏和肺脏组织 TNF- $\alpha$  表达同样显示血滤组低于对照组。NF- $\kappa$ B 是促炎细胞因子的总开关, 参与调节 TNF- $\alpha$ 、IL-1、6、8 以及 NOS, 黏附因子等大多数重要炎症递质 mRNA 转录<sup>[15-16]</sup>。其水平下降说明血液滤过能减轻远隔脏器的炎症反应程度。由此, 我们进一步提出 SAP 全身炎症反应激活和血液滤过的作用机制是: SAP 早期胰腺坏死局部产生和释放过多的促炎物质入血是引起全身炎症反应的根源, 可能包括细胞因子和其他中、小分子物质, 通过血液滤过清除这些物质能减轻远隔脏器的炎症反应激活。在 SAP 起病早期最先出现损害的脏器常是肺<sup>[17]</sup>。在本研究中我们观察到血液滤过对肺的保护作用最为明显。肝脏是受累最早的器官之一, 但表现出受损的时间要迟于肺。发病 12 h 后肝脏损害可能还不能充分表现出来, 因此虽然处理组和对照组之间病理学评分差别不大, 但 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  水平已经有显著差异。

胰腺作为原发病灶, 血液滤过对其影响不大, 血滤组和对照组均观察到明显坏死。原因可能是血液滤过对胰腺原发病灶局部促炎物质清除作用有限。但血滤组腹水显著少于对照组, 证实胰性腹水不仅仅是局部胰腺坏死渗出刺激的结果, 还是全身炎症反应的一部分, 血液中炎症递质的清除有助于减轻腹膜炎程度。

### 4 参考文献

- Yekebas EF, Treede H, Knoefel WT, Bloechle C, Fink E, Izbicki JR. Influence of zero-balanced hemofiltration on the course of severe experimental pancreatitis in pigs. *Ann Surg* 1999;229: 514-522
- Wang H, Li WQ, Zhou W, Li N, Li JS. Clinical effects of continuous high volume hemofiltration on severe acute pancreatitis complicated with multiple organ dysfunction syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:2096-2099
- Kellum JA, Song M, Venkataraman R. Hemoadsorption removes tumor necrosis factor, interleukin-6, and interleukin-10, reduces nuclear factor-kappaB DNA binding, and improves short-term survival in lethal endotoxemia. *Crit Care Med* 2004;32:801-805
- Oliver WC Jr, Nuttall GA, Orszulak TA, Bamlet WR, Abel MD, Erath MH, Schaff HV. Hemofiltration but not steroids results in earlier tracheal extubation following cardiopulmonary bypass: a prospective, randomized double-blind trial. *Anesthesiology* 2004;101:327-339
- Teraoka S, Mineshima M, Hoshino T, Ishimori I, Kaneko I, Sato Y, Haruguchi H, Agishi T. Can cytokines be removed by hemofiltration or hemoadsorption? *ASAIO J* 2000;46:448-451
- Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26:1513-1520
- Kiyonari Y, Nishina K, Mikawa K, Maekawa N, Obara H. Lidocaine attenuates acute lung injury induced by a combination of phospholipase A2 and trypsin. *Crit Care Med* 2000; 28:484-489



- 8 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215:44-56
- 9 Mao EQ, Tang YQ, Zhang SD. Formalized therapeutic guideline for hyperlipidemic severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2622-2626
- 10 Su X, Bai C, Hong Q, Zhu D, He L, Wu J, Ding F, Fang X, Matthey MA. Effect of continuous hemofiltration on hemodynamics, lung inflammation and pulmonary edema in a canine model of acute lung injury. *Intensive Care Med* 2003; 29:2034-2042
- 11 De Vriese AS, Colardyn FA, Philippe JJ, Vanholder RC, De Sutter JH, Lameire NH. Cytokine removal during continuous hemofiltration in septic patients. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 846-853
- 12 Schetz M, Ferdinande P, Van den Berghe G. Renal of pro-inflammatory cytokines with renal replacement therapy: Sense or nonsense? *Inten Care Med* 1995;21:169-176
- 13 Kodama M, Hanasawa K, Tani T. Blood purification for critical care medicine: endotoxin adsorption. *Ther Apher* 1997;1:224-227
- 14 Winchester JF, Salsberg JA. Sorbents in the treatment of renal failure. *Minerva Urol Nefrol* 2004;56:215-221
- 15 Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK. Increased nuclear factor kappa b activation in critically ill patients who die. *Crit Care Med* 2000;28:1047-1051
- 16 Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* 2003;31(1 Suppl 1):S105-111
- 17 Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004;202:145-156

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

• 消息 •

## *World Journal of Gastroenterology* 编辑

经《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》编委审稿后, 非常优秀的论文可直接录用, 通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改, 符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版. 排版后校样由责任编辑审读全文, 无语法及拼写错误方可付印. WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量, 特制定了编辑要点.

### 1 题名

应简明扼要有特色, 突出主题, 不宜过长; 应直入主题, 避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The, 一般不使用缩写字(常用缩写字例外). 具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>.

### 2 摘要

采用结构式摘要. 目的部分应直入主题, 如 To investigate the, 可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时, 结论部分使用一般现在时. 人称和语态使用应自然, 避免使用“悬垂分词”. 摘要的第一句不要重复文章题名, 应增加变化, 补充一些细节. 具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>.

### 3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子, 尽量避免一个句子使用多个从句. 拼写正确, 时态一致、准确. 方法及结果部分一般使用过去时. 讨论部分, 引用文献叙述一般使用过去时, 结论性语言使用一般现在时. 要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时, 一定要注意其语态的正确使用, 以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中, 一定要核对各基本数据及其百分比. 此外, 还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数. (2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases... 或 A total number of 16 cases 而不能写为: 16 cases, 100 patients, 等. (3) 缩略词: 首次使用词语时, 应先写出全称然后在括号内写出其缩写词. (4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前3个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*, *in situ*, *et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体. (5) 图表: 不要重复使用, 已用图表示的内容不再使用表格. 表和图题的说明应与正文的文题一样, 文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时, 如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内, 图表内注解首字母大写, 其余小写.

### 4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出. 参考文献全体作者是否与首页一致, 题名与首页是否一致, 刊名与首页是否一致, 年与首页是否一致, 卷号与首页是否一致, 起页 - 止页与首页是否一致, PMID 号是否与首页一致.

### 5 其他

(1) 注意字符间空格, 文稿要隔行打印. (2) 使用正式文体, 不用口语体和非规范缩写词. 如 isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory) 等. (3) 要客观地叙述方法和结果, 用词要质朴无华, 避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语. (4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式. (5) 正确使用冠词, 对可数词应尽量使用复数形式. (6) 应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组, 避免使用长系列形容词或名词修饰名词. (7) 尽量应用重要的事实开头, 避免短语或从句开头. (8) 涉及他人的工作或研究成果时, 尽量列出其姓名, 两名以上的作者一定要用 “et al”. 具体写作要求见《科技论文的写作要点》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>.

# 直肠癌行 TME 术癌组织及周围组织 CEA 检测的意义

刘 阳, 田素礼

刘阳, 田素礼, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科  
黑龙江省哈尔滨市 150086

刘阳, 男, 1979-05-03 生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2002 年哈尔滨医科大学硕士生。主要从事大肠癌基因方面的研究。

项目负责人: 田素礼, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科。pwtsl@public.hr.hl.cn

电话: 0451-86605575 传真: 0451-86672339

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-11

## Clinical significance of carcinoembryonic antigen detection in rectal cancer patients with total mesorectal excision

Yang Liu, Su-Li Tian

Yang Liu, Su-Li Tian, Third Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Dr. Su-Li Tian, Third Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xue Fu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. pwtsl@public.hr.hl.cn

Received: 2004-09-18 Accepted: 2004-10-11

## Abstract

AIM: To detect the carcinoembryonic antigen (CEA) in rectal cancer patients with total mesorectal excision (TME), and to prove the significance of TME in the treatment of rectal cancer.

METHODS: Pathological specimens were selected from tissues of cancer, distal mesorectal margin (DMM), circumferential resection margin (CRM) and outer pelvic fascia in rectal cancer ( $n = 52$ ) patients with TME. CEA was detected in these specimens using immunohistochemical method, and the data were analyzed with SPSS software.

RESULTS: CEA expression was significantly higher in tissues of rectal cancer (47/52) than that in normal tissues (2/20). There was significant difference between them ( $P < 0.001$ ). CEA expression also existed in tissue of CRM (8/52). However, no CEA expression was observed in tissues of DMM and outer pelvic fascia.

CONCLUSION: CEA is highly expressed in tissues of rectal cancer. This provides scientific evidence for TME in the treatment of rectal cancer.

Liu Y, Tian SL. Clinical significance of carcinoembryonic antigen detection in rectal cancer patients with total mesorectal excision. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(12):2826-2828

## 摘要

目的: 对直肠癌及其周围组织进行 CEA 检测, 证明全直肠系膜切除术(TME)治疗直肠癌的科学性。

方法: 行 TME 手术的直肠癌患者 52 例直肠癌组织、直肠系膜远端、环周切缘、盆筋膜壁层取病理标本采用免疫组化 S-P 法对标本进行 CEA 检测, 应用 SPSS 软件进行统计学分析。

结果: 直肠癌组织中 CEA 高度表达(47/52), 肿瘤相对的盆筋膜脏层(环周切缘)中有 CEA 存在(8/52), 在直肠系膜远端及盆筋膜壁层标本中未见 CEA 表达。

结论: 直肠癌组织中 CEA 高度表达, 检测直肠癌及周围组织中 CEA 的表达情况为 TME 手术的科学性提供理论依据。

刘阳, 田素礼. 直肠癌行 TME 术癌组织及周围组织 CEA 检测的意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(12):2826-2828

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2826.asp>

## 0 引言

直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-3]</sup>, 发病率逐年上升<sup>[4-5]</sup>, 手术是治疗直肠癌的主要方法<sup>[6-9]</sup>. 全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)也称直肠周围系膜全切除术(complete circumferential mesorectal excision, CCME)<sup>[10]</sup>使直肠癌的外科治疗得到迅速发展. 近 10 a 来, TME 成功应用于临床, 既能保证将直肠后间隙的脂肪和淋巴血管和淋巴结完整切除, 又尽可能地保留盆神经丛<sup>[11-12]</sup>, 有效降低局部复发率至 3-7%<sup>[13-14]</sup>, 目前正在被越来越多的外科临床医师所接受, 已经成为直肠癌手术的金标准<sup>[15-16]</sup>. 目前, 国内外对 TME 的研究主要在临床观察及病理组织学检查, 尚缺乏分子水平的理论依据. 我们对 TME 手术后对肿瘤组织、系膜远端切缘、环周切缘、盆筋膜壁层组织 CEA 进行免疫组化的检测, 为证实 TME 手术的科学性提供分子水平上的理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 我科 2003-04/2004-02 行 TME 手术的直肠癌患者 52 例为试验组, 男 27 例, 女 25 例, 年龄 34-78 岁, 其中腺瘤癌变 4 例(7.7%), 腺癌 38 例(73.1%), 黏液腺癌 10 例(19.2%), Dukes A 期 2 例(3.8%), B 期 21 例(40.4%), C 期 24 例(46.2%), D 期 5 例(9.6%); 直肠腺瘤、直肠息肉手术治疗患者 20 例为对照组, 男 11 例, 女 9 例, 年龄 22-70 岁, 其中直肠息肉 11 例(55%), 直肠腺瘤 9 例(45%), 均经手术及病理检查证实. 试验组术中分别于直肠癌组织(I)、直肠系膜远端

(II)、环周切缘(III)、盆筋膜壁层(IV)取病理标本(大小约1 cm<sup>3</sup>);对照组术中于直肠腺瘤(直肠息肉)组织(I)、直肠系膜远端(II)、环周切缘(III)、盆筋膜壁层(IV)切取病理标本(大小约1 cm<sup>3</sup>).标本置于40 g/L中性缓冲甲醛固定液中固定24 h,石蜡包埋,连续切片2张,切片厚4 μm.抗CEA和UltraSensitive™ S-P超敏试剂盒均购于福州迈新生物技术开发有限公司.

1.2 方法 进行常规HE染色组织学分析和CEA免疫组化S-P法检测.观察HE染色片细胞着色为阳性(有癌细胞存在),细胞未着色为阴性(无癌细胞存在);组织CEA主要在细胞质中着色,故无着色细胞为(-),阳性判断标准分3级,主要依靠镜下阳性细胞数目的计数方法:<25%为(+),25-50%为(++),>50%为(+++).

**统计学处理** 所有数据均用SPSS软件在计算机上进行统计,分析组织CEA表达情况及其与组织取材部位、肿瘤分期、病理类型的关系.

## 2 结果

试验组直肠癌组织(I)标本染色为阳性,其余标本染色为阴性;对照组各个标本染色均为阴性.组织学上可以证明直肠癌行TME术式切除的组织范围足够,未有癌细胞残存.

CEA在癌组织中的表达与良性肿瘤组织中的表达存在显著差异( $P<0.001$ 表1),说明CEA在直肠癌组织中的表达有高度特异性.在环周切缘(III)标本中检测出CEA的存在,但在直肠系膜远端(II)、盆筋膜壁层(IV)标本中未检测出CEA的存在,可以说明直肠癌存在直肠周围的局部病变,包括直接侵犯(T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>)或周围淋巴结,直肠血管周围淋巴结转移(任何TN<sub>1-2</sub>M<sub>0</sub>),但所有这些局部病变均在盆腔脏层筋膜范围之内<sup>[17-22]</sup>.

表1 直肠癌组织CEA表达

分组	CEA 表达强度(n)			
	-	+	++	+++
试验组 I	5	15	25	7
II	52			
III	44	8		
IV	52			
对照组 I	18	2		
II	20			
III	20			
IV	20			

直肠癌组织中的CEA表达与直肠癌的病理类型、临床分期密切相关( $P<0.05$ ).肿瘤分化越差,癌组织中CEA的表达越强;肿瘤临床分期越晚,癌组织中CEA的表达越强(表2).

表2 不同病理类型、临床分期的组织CEA表达情况

病变		CEA 表达强度(n)			
		-	+	++	+++
腺瘤癌变 4例	I	2	1		1
	II	4			
	III	4	0		
	IV	4			
腺癌 38例	I	3	12	21	2
	II	38			
	III	33	5		
	IV	38			
黏液腺癌 10例	I		2	4	4
	II	10			
	III	7	3		
	IV	10			
Dukes A 2例	I	2			
	II	2			
	III	2			
	IV	2			
Dukes B 21例	I	3	7	10	1
	II	21			
	III	19	2		
	IV	21			
Dukes C 24例	I		7	13	4
	II	24			
	III	20	4		
	IV	24			
Dukes D 5例	I		1	2	2
	II	5			
	III	3	2		
	IV	5			

## 3 讨论

直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-3]</sup>,在我国近年来其发病率、死亡率都有上升趋势,发病年龄也有明显提前<sup>[4-5]</sup>.手术仍是治疗直肠癌的首选方法<sup>[6-9]</sup>,但常需永久性造口,且有较高的局部复发率及术后对性功能和泌尿功能的影响,因此,找到一种适合的手术方法对于直肠癌的治疗具有重要意义.癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)正常存在于胚胎组织中,在直肠癌中有高于70%的病例CEA表达<sup>[23-26]</sup>.CEA也是一种同嗜型黏附分子<sup>[27-30]</sup>,在不同细胞中的定位也不一样.在癌细胞中CEA分布失去极向性<sup>[31-34]</sup>.本研究表明CEA的表达强度与肿瘤分化程度和临床分期关系密切,通过对直肠癌组织及其周围组织的CEA检测,证明直肠癌存在局部病变,但大多数病变均局限在盆腔脏层筋膜范围之内<sup>[17-22]</sup>,从分子水平上证明TME手术切除范围达到根治的标准.TME的方法是具有科学性的.我们用常

规组织学方法和免疫组化的方法分别对实验组环周切缘(Ⅲ)进行检测,发现常规组织学检查在所有环周切缘(Ⅲ)标本中未见癌细胞存在,但免疫组化法检测CEA阳性结果有8例(15.38%),与以往方法相比,本试验快捷、检出率高,更能说明直肠癌存在局部病变,TME彻底切除了直肠癌的局部病变.通过精确取材、减少试验步骤,降低了假阴性和假阳性的发生率,提高了试验的准确性.

我们在对环周切缘(Ⅲ)标本进行检测时,发现常规组织学检查在所有环周切缘(Ⅲ)标本中未见癌细胞存在,但免疫组化法检测CEA阳性结果有8例,这8例阳性结果是否能说明存在直肠癌的微小转移灶,尚需要进一步对组织CEA进行定量分析.

#### 4 参考文献

- Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25
- 吴群英,吕回. 结肠癌的早期诊断和辅助治疗. *现代诊断与治疗* 2000;11:340-342
- 张智渊,李世荣. 大肠癌诊断新技术. *世界华人消化杂志* 2004;12:1202-1206
- 喻德洪,刘连杰. 进一步提高我国大肠癌疗效的几点意见. *腹部外科* 2000;13:121-123
- Zheng S, Liu XY, Ding KF, Wang LB, Qiu PL, Ding XF, Shen YZ, Shen GF, Sun QR, Li WD, Dong Q, Zhang SZ. Reduction of the incidence and mortality of rectal cancer by polypectomy: a prospective cohort study in Haining County. *World J Gastroenterol* 2002;8:488-492
- Zhou ZG, Wang Z, Yu YY, Shu Y, Cheng Z, Li L, Lei WZ, Wang TC. Laparoscopic total mesorectal excision of low rectal cancer with preservation of anal sphincter: A report of 82 cases. *World J Gastroenterol* 2003;9:1477-1481
- 谢正勇,卿三华. 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势. *世界华人消化杂志* 2003;11:1050-1053
- 卿三华. 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:1760-1763
- 朱建华,罗伟伦. 直肠癌全直肠系膜切除术. *中国胃肠外科杂志* 2000;3:209-212
- 郁宝铭. 直肠系膜全切除的意义与评价. *大肠肛门病外科杂志* 2002;8:67-68
- Dong XS, Xu HT, Yu ZW, Liu M, Cu BB, Zhao P, Wang XS. Effect of extended radical resection for rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:970-973
- Hu JK, Zhou ZG, Chen ZX, Wang LL, Yu YY, Liu J, Zhang B, Li L, Shu Y, Chen JP. Comparative evaluation of immune response after laparoscopic and open total mesorectal excisions with anal sphincter preservation in patients with rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2690-2694
- Morino M, Parini U, Giraudo G, Salval M, Brachet R, Garrone C. Laparoscopic total mesorectal excision: a consecutive series of 100 patients. *Ann Surg* 2003;237:335-342
- 毕建军,邵永孚. 影响直肠癌局部切除的预后因素. *世界华人消化杂志* 2002;10:1458-1459
- Makin GB, Breen DJ, Monson JR. The impact of new technology on surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:612-621
- Zheng YC, Tang YY, Zhou ZG, Li L, Wang TC, Deng YL, Chen DY, Liu WP. Tumor micrometastases in mesorectal lymph nodes and their clinic significance in patients with rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:3369-3373
- 葛智成,王宇. 消化道肿瘤标志物研究和临床应用进展. *中国实用外科杂志* 2001;21:556-558
- 刘永昌,刘清俊,孙俊宁. 角蛋白19、癌胚抗原 mRNA 的表达与微转移的探测. *中国肿瘤临床与康复* 2001;8:37-39
- 刘连杰,王灏,喻德洪. 基因检测肿瘤微转移. *中国肿瘤* 2000;9:460-461
- 张子祥,吕光成,管洪庚. 胃肠道肿瘤微转移灶的检测及意义. *中国普外基础与临床杂志* 1999;6:60-61
- 刘连杰,王颢,景在平,孟荣贵. 大肠癌微转移的基因检测. *中华普通外科杂志* 2000;15:434-435
- Wang Z, Zhou ZG, Wang C, Zhao GP, Chen YD, Gao HK, Zheng XL, Wang R, Chen DY, Liu WP. Microscopic spread of low rectal cancer in regions of mesorectum: pathologic assessment with whole-mount sections. *World J Gastroenterol* 2004;10:2949-2953
- 来茂德. 中国结直肠癌发生发展相关基因. *世界华人消化杂志* 2001;9:1227-1232
- Wu WX, Sun YM, Hua YB, Shen LZ. Laparoscopic versus conventional open resection of rectal carcinoma: A clinical comparative study. *World J Gastroenterol* 2004;10:1167-1170
- Waisberg J, Palma RT, Neto LC, Martins LC, Oliveira MS, Nagashima CA, Godoy AC, Goffi FS. Biliary carcinoembryonic antigen levels in diagnosis of occult hepatic metastases from colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1589-1593
- 黄雅萍,仇玲岭. 大肠癌 P53 蛋白和 CEA 表型与其预后的关系. *中国肿瘤临床与康复* 2002;9:26-27
- 曾屈波. 癌胚抗原与大肠癌关系. *大肠肛门病外科杂志* 2001;7:58-61
- Zheng CX, Zhan WH, Zhao JZ, Zheng D, Wang DP, He YL, Zheng ZQ. The prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:431-434
- Fuszek P, Lakatos P, Tabak A, Papp J, Nagy Z, Takacs I, Horvath HC, Lakatos PL, Speer G. Relationship between serum calcium and CA19-9 levels in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:1890-1892
- Zhang B, Chen JY, Chen DD, Wang GB, Shen P. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls. *World J Gastroenterol* 2004;10:1643-1646
- Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2642-2649
- Wang M, Vogel I, Kalthoff H. Correlation between metastatic potential and variants from colorectal tumor cell line HT-29. *World J Gastroenterol* 2003;9:2627-2631
- Li L, Chen Y, Dilley J, Arroyo T, Ko D, Working P, Yu DC. Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2003;2:1003-1009
- Bessa X, Pinol V, Castellvi-Bel S, Piazuelo E, Lacy AM, Elizalde JJ, Pique JM, Castells A. Prognostic value of postoperative detection of blood circulating tumor cells in patients with colorectal cancer operated on for cure. *Ann Surg* 2003;237:368-375

# 慢性胰腺炎 294 例的病因学及临床诊治

陈 浮, 李兆申, 李淑德, 王洛伟, 许国铭

陈浮, 李兆申, 李淑德, 王洛伟, 许国铭, 中国人民解放军第二军医大学  
长海医院消化内科 上海市 200433  
陈浮, 女, 1977-10-19 生, 江苏省仪征市人, 汉族, 2003 年第二军医大学长  
海医院消化内科硕士, 主要从事慢性胰腺炎的临床研究。  
项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长  
海医院消化内科, zhsl@81890.net  
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-09

## Etiology, diagnosis and treatment of chronic pancreatitis: an analysis of 294 cases

Fu Chen, Zhao-Shen Li, Shu-De Li, Luo-Wei Wang,  
Guo-Ming Xu

Fu Chen, Zhao-Shen Li, Shu-De Li, Luo-Wei Wang, Guo-Ming Xu,  
Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military  
Medical University, Shanghai 200433, China.  
Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology,  
Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai  
200433, China. zhsl@81890.net  
Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-09-09

## Abstract

AIM: To investigate the associated factors, diagnosis and treatment of chronic pancreatitis in Shanghai, China.

METHODS: Two hundred and ninety four patients with confirmed chronic pancreatitis in Changhai Hospital were retrospectively studied, including investigation of their associated etiological factors, diagnostic and therapeutic methods.

RESULTS: Of all the 294 patients, there were 89 with biliary chronic pancreatitis (30.3%) and 84 with alcoholic pancreatitis (28.6%). The rest included idiopathic chronic pancreatitis, abnormality of pancreatic duct, hereditary pancreatitis and autoimmune pancreatitis. The most common symptom of chronic pancreatitis was abdominal pain. A few patients were accompanied by steatorrhea and decrease body weight. Forty-nine patients were diagnosed by histopathology. Others were diagnosed by imaging procedures. The positive rate for imaging diagnosis was 88.0% on average. Most patients suffered less after non-operation therapies.

CONCLUSION: Biliary diseases are still the most common etiological factors of chronic pancreatitis, but its rate has significantly decreased in Shanghai. Meanwhile, the rate of alcoholic chronic pancreatitis is increasing gradually. Imaging procedures play the most important role in diagnosis, and non-operation therapies are the main methods to treat chronic pancreatitis.

Chen F, Li ZS, Li SD, Wang LW, Xu GM. Etiology, diagnosis and treatment of chronic pancreatitis: an analysis of 294 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(12):2829-2832

## 摘要

目的: 研究我国慢性胰腺炎的相关因素及诊治特点。

方法: 回顾分析长海医院近10 a确诊为慢性胰腺炎的294例住院患者, 调查其相关病因、诊断及治疗措施。

结果: 在294例患者中, 胆源性89例(30.3%), 酒精性84例(28.6%), 其他病因包括腹部手术后、胰腺外伤、胰管先天异常、自身免疫病、先天因素以及特发性等, 均较少见。大部分患者表现为反复发作性腹痛, 少数伴有脂肪泻及体重减轻等症状。49例患者通过组织学检查确诊, 其他均通过影像学检查及BT-PABA试验诊断。大部分患者(81.0%)经非手术治疗症状缓解。

结论: 慢性胆道系统疾病仍是我国慢性胰腺炎的主要致病因素, 但其比例明显下降, 而酒精性慢性胰腺炎明显增多。影像学检查在慢性胰腺炎诊断中具有重要作用, 非手术治疗是目前治疗慢性胰腺炎的主要方法。

陈浮, 李兆申, 李淑德, 王洛伟, 许国铭. 慢性胰腺炎 294 例的病因学及临床诊治. *世界华人消化杂志* 2004;12(12):2829-2832  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2829.asp>

## 0 引言

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是指胰腺实质内腺泡和小管的反复或持续性损害, 胰腺广泛性纤维化、局灶性坏死及胰管内结石形成或弥漫性钙化, 可引起腺泡和胰岛细胞萎缩或消失, 常有假性囊肿形成<sup>[1]</sup>. CP的发病率地区间差别很大<sup>[2]</sup>, 欧美国家发病率较高, 我国发病率较低, 近年来有升高趋势. CP的病因复杂, 可由多种因素引起, 发病的确切机制尚未完全阐明. 因此其治疗仍是目前的难题之一. 在欧美等西方国家, 酗酒是CP的最常见病因, 占60-90%<sup>[3-5]</sup>. 我国CP的病因特点与西方国家不同, 既往资料显示各种胆道系统疾病引起者占47-65%, 而由酒精引起者仅占6-17%<sup>[6]</sup>. 近年来, 我们在医疗实践中发现与酒精相关的CP病例越来越多, 有资料显示我国的病因构成已有所变化, 但尚缺乏大样本资料的研究. 随着影像学和内镜技术的发展, CP的诊治也日趋完善, 但对于CP各种诊断与治疗方法的比较, 尚缺乏大宗病例报道. 我们从流行病学角度对上海市长海医院近10 a 294例患者进行病因学研究, 并对CP的诊断与治疗方法进行比较分析, 以期阐明CP的相关病因, 优化CP诊断与治疗。

## 1 材料和方法

1.1 材料 上海长海医院 1994-05/2004-05 确诊为 CP 的住院患者共 294 例。

1.2 方法 参照 2000 年亚太共识会上制定的 CP 诊断标准<sup>[7]</sup>, 以胰腺组织病理学检查和影像学检查结果为主要指标, 对全部病例进行评估。入选病例必须具备下列之一: (1)ERCP 显示胰管有改变; (2)促胰泌素试验阳性; (3)胰腺钙化; (4)提示 CP 的 EUS 异常; (5)组织学检查显示 CP 特征。调查患者的年龄、性别、住址、职业、血型、体重指数(BMI)。根据国内外公认的 CP 病因<sup>[6]</sup>, 记录下列项目: (1)胆道系统疾病史及发病时间, 包括胆石症、胆道感染、胆道蛔虫病、Oddi 括约肌功能紊乱(SOD); (2)长期饮酒史, 包括酒龄和酒精摄入量; (3)胰腺外伤史; (4)胰管先天异常史; (5)腹部手术史; (6)高甘油三酯血症; (7)高钙血症; (8)自身免疫病; (9)遗传因素。采用的诊断方法, 包括: (1)尿 BT-PABA 试验; (2)影像学表现(B 超、CT、MRI 或 MRCP、ERCP 及 EUS); (3)胰腺组织病理学。对患者实施药物治疗、介入治疗和手术治疗。

**统计学处理** 按资料类型对各项病因行单因素分析, 并计算各相关因素、诊断方法及治疗措施占全部病例的构成比。

## 2 结果

294 例患者来自 16 个省市, 分别为上海 126 例, 江苏 56 例, 浙江 46 例, 黑龙江 12 例, 安徽 11 例, 江西 8 例, 山东 6 例, 河南 4 例, 新疆 4 例, 广东 4 例, 甘肃 4 例, 其他省市 13 例。男 172 例, 女 122 例; 发病时年龄 5-75 (平均  $46.6 \pm 16.3$  岁); 男( $42.4 \pm 15.7$  岁), 女( $46.6 \pm 16.3$  岁)。A 型血患者相对较多, 78 例(26.4%); B 型 68 例(23.1%); O 型 49 例(16.6%); AB 型 18 例(6.1%); 未测血型 82 例(27.8%)。

2.1 职业 在 294 例患者中工人和干部较多, 分别为 91 例(30.8%)、56 例(19.0%)。其他农民 44 例(14.9%)、学生 25 例(8.5%)、技术人员 24 例(8.1%)、教师 19 例(6.4%)、商人 16 例(5.4%)、家务 10 例(3.4%)、医务人员 8 例(2.7%), 还有 2 例(0.7%)因资料缺失没有统计。

2.2 BMI 发病时 294 例患者 BMI 最小为 14.8, 最大为 30.0。分布为( $20.3 \pm 2.4$ )。

2.3 CP 相关病因构成比 294 例 CP 患者中合并胆道系统疾病和饮酒史的分别为 89 例和 84 例, 占 30.3% 和 28.6%。其中, 30 例患者同时存在以上 2 种病因, 占 10.2%。在 89 例胆源性 CP 患者中, 发病前均伴有胆囊或胆管结石, 48 例为胆囊切除术后, 53 例有急性胰腺炎发作或血淀粉酶升高史, 未发现胆道蛔虫病及 SOD 患者。84 例酒精性 CP 患者均有长期饮酒史, 超过 10 a 者 75 例, 占 89.3%, 每日酒精摄入量  $>150$  g 者 48 例, 占 57%。9 例患者自幼反复腹痛发作, 确诊时年龄分别为 9 岁(2 例)、11 岁(2 例)、15 岁(2 例)、17 岁和 18 岁

(2 例), 病因与先天遗传因素有关。伴有 Crohn 病和风湿病的各 2 例, 病因与免疫性有关。58 例病史记录和住院后检查完整, 未发现上述病因, 为特发性。还有 6 例伴胰腺外伤史、4 例伴胰管先天异常、10 例有关病因的记录和检查不完整。另外 40 例检查血脂和血钙的患者中未发现高血脂和高血钙的病例, 其余患者未作相应检查。294 例 CP 患者中伴有吸烟史的 98 例, 占 33.3%, 但均非独立致病因素。

2.4 性别间病因变化 本组 294 例患者中男 172 例, 年龄( $42.4 \pm 15.7$  岁), 女 122 例, 年龄( $46.6 \pm 16.3$  岁), 男性患者约为女性患者的 1.5 倍。男性的相关致病因素以酒精为主, 占男性患者的 50.6%。而女性以慢性胆道系统疾病为主, 占女性患者的 53.3%。所有女性 CP 患者中, 女性饮酒者仅 3 例, 较男性患者少 84 例, 男女患者数的差异由此产生。

2.5 诊断 在 294 例 CP 患者中, 有 258 例患者(87.8%)确诊前均伴有反复发作的上腹部隐痛, 腹痛指数均  $<5$ ; 150 例(51.0%)伴腰背放射痛; 133 例(45.2%)伴腹胀和腹部不适; 105 例(35.7%)伴明显体重减轻; 30 例(10.2%)伴腹泻(脂肪泻); 26 例(8.8%)伴糖尿病症状, 血糖控制后症状消失; 11 例(3.7%)伴皮肤及巩膜黄染。目前我院常用的方法有胰腺外分泌试验(BT-PABA)、腹部平片、腹部 B 超、CT、MRI、ERCP、EUS 及组织学检查。294 例患者中仅 49 例因胰腺手术或剖腹探查, 而行组织学检查。其余均通过影像学检查, 参考临床症状及 BT-PABA 试验明确诊断。其中 BT-PABA 检查 142 例, 异常者 118 例, 平均值为 39.3%(我院 BT-PABA 正常值为  $>60\%$ , 即尿中 PABA 回收率  $>60\%$ ); 腹部 B 超检查 280 例、ERCP 185 例、CT 80 例、EUS 64 例、MRI 59 例、腹部平片 53 例; EUS 检出率最高, 为 87.5%, 检出胰腺钙化 31 例、胰管结石 17 例、胰管扩张 34 例、胰腺假性囊肿 18 例; 其他诊断的检出率分别为腹部 B 超 68.9%、ERCP 87.0%、CT 61.3%、MRI 76.3%、腹部平片 32.1%。

2.6 治疗 在 294 例患者中非手术治疗 238 例(81.0%), 其中, 胰酶制剂(得每通)口服 195 例、内镜下胰管括约肌切开术(EPSt)59 例、内镜下取石 21 例及内镜下胰管支架置入 66 例; 手术治疗 56 例(19.1%), 包括胰管空肠 Rou-X-Y 吻合术 22 例、胰十二指肠切除术 22 例、胰体尾切除术 7 例、胰管切开取石术 3 例、胰腺假性囊肿内引流术 2 例。随访发现治疗后 84% 的患者症状缓解, 另有 45 例患者症状较轻, 经戒烟、戒酒及改变饮食习惯后能自行缓解。

## 3 讨论

既往资料报道, CP 在国外多见, 据欧美资料统计, 发病率高达 0.01%, 男性好发年龄为 45-54 岁, 女性相对晚 10 a, 男女发病率之比为 4.7:1<sup>[8]</sup>。近年来, 随着我国居民生活水平的改善, CP 发病明显增多, 我

分析近 10 a 的 CP 患者, 共计 294 例, 男性多于女性, 并且男性发病的平均年龄早于女性, 为 42.4 岁. 体重指数(BMI)平均为 20.3, 个别患者消瘦明显, BMI 仅 14.8. A 型血患者相对较多, 占 26.4%. 工人和干部相对较多, 可能与他们的饮酒习惯有关. CP 病因复杂, 由多种因素造成, 在西方国家以慢性酒精中毒为主要病因, 大约 80% 的 CP 患者有长期酗酒史<sup>[9]</sup>. CP 发生的危险性与酒精摄入量及酒龄明显相关, 每天摄入 150 g, 甚至 75–100 g 就可引起酒精性胰腺炎, 而 5–15% 可导致 CP<sup>[10]</sup>. Sarles 报道的一组酒精性 CP 患者平均每日饮酒量在 150–175 g, 发展为 CP 的平均酒龄男性为(18 ± 11 a), 女性(11 ± 8 a). 其他少见病因包括遗传性胰腺炎、热带性胰腺炎、自身免疫性胰腺炎以及特发性慢性胰腺炎. 西方国家虽不认为胆道疾病是慢性胰腺炎的病因, 但文献中有 8–12% 的病例合并胆系疾病<sup>[11]</sup>, 美国马萨诸塞州和罗德岛对 1975/1979 年 CP 病例的分析发现, 男性病例中有 45%、女性病例中有 60% 伴有胆道系统疾病. 在我国, 一向认为 CP 的发生与慢性胆道系统疾病有关, 而由酒精引起者少见<sup>[12]</sup>, 1990/2000 年北京协和医院 215 例 CP 患者中, 由胆系疾病引起的 CP 就占 36.7%<sup>[13]</sup>. 但近年来, 我们在医疗实践中发现与酒精相关的 CP 越来越多, 我国的病因构成已有所变化. 北京协和医院统计的 1982/2002 年 321 例 CP 患者的病因中胆源性为 31.2%、酒精性为 34.6%, 酒精性已成为 CP 的主要病因<sup>[14]</sup>. 我们的研究显示慢性胆道系统疾病仍是我国导致 CP 的一个主要致病因素, 但其所占比例已明显下降(30.3%), 而酒精因素(28.6%)明显增多. 这一比例较 1987 年北大医院(胆道疾病 64.2%, 酒精性 16.2%)和上海仁济医院(胆道疾病 59.1%, 酒精性 8.2%)的报道已有显著变化. 关于酒精引起 CP 的机制国外已有很多研究<sup>[15–16]</sup>, 在我国, CP 合并胆道系统疾病者众多, 机制可能系由于共同通道的存在, 胆道疾病引起胰液的流出受阻, 导致慢性炎症的发生. 自 1996 年 Whitcomb *et al*<sup>[17]</sup>发现遗传性 CP 患者中位于第 7 染色体长臂(7q35)上的阳离子胰蛋白酶原基因(PRSS1)突变, 自身免疫在 CP 发病中的作用日益受到了人们的重视<sup>[18–19]</sup>. 我们的调查中有 9 例(3.1%)患者自幼反复发作腹痛, 不伴其他因素, 考虑为遗传性 CP, 患者可能存在遗传缺陷, 但不足的是未行遗传学的检查. 另外, 有报道显示吸烟与 CP 也有关, 可能促进胰腺钙化的形成<sup>[20]</sup>, 我们调查的病例中, 伴有吸烟史的有 98(33.3%)例, 但均非独立致病因素. 总之, 近 10a 我院的 CP 相关因素已有所变化, 但慢性胆系疾病仍是主要致病因素.

CP 症状繁多而无特异性<sup>[21]</sup>, 诊断尚缺乏统一标准, 也无评价疾病轻重的统一指标<sup>[22]</sup>. 2000 年亚太共识会上提出的 CP 诊断标准<sup>[6]</sup>增加了 EUS 的诊断, 而日本的标准更详尽一些<sup>[23]</sup>. 随着影像技术及内镜技术的发展, 我国的诊断标准还需要进一步修改. 无论采用那种标准, 影像检查对 CP 诊断都具有重要意义<sup>[24–25]</sup>. 2002 年,

Bernhard *et al*<sup>[26]</sup>发现诊断方法中, 腹部 B 超和 CT 的敏感性仅 70%, 而 EUS 的敏感性可达 94%, 从而得出对于长期慢性腹痛的患者, 可以先行腹部 B 超检查进行筛选, 对于 B 超检查阳性的患者, 可接着行 ERCP 及 EUS 检查, 如果患者伴有长期饮酒史, 还需接着进行胰腺外分泌功能的试验室检查<sup>[27]</sup>. 在我国, CP 患者以胆道结石引起的梗阻性胰腺炎为主, 表现为胰腺钙化、囊肿, 胰管扩张、扭曲以及胆道病变, 影像检查显得尤其重要. B 超的诊断率相对较低, 敏感性较差, 而 EUS 的敏感性最高, 检出率高达 88%, 提示联合检测有望提高 CP 诊断阳性率.

长期困扰 CP 患者的多为慢性腹痛症状, 故补充胰酶、解除胰管梗阻、降低胰管压力, 从而缓解腹痛就成为治疗 CP 的主要目标. 目前国内外对 CP 腹痛的治疗主要包括非手术治疗及手术治疗. 本组 294 例 CP 患者中非手术治疗 238 例(81.0%), 包括戒烟、戒酒、口服胰酶制剂(得每通)及内镜下介入治疗. 其中, 介入治疗又包括胰管括约肌切开术(EPS)59 例、内镜下取石 21 例及内镜下胰管支架置入 66 例. 经以上治疗后随访病例的腹痛症状均能缓解. 采用手术治疗的仅 56 例(19.1%), 手术方式有胰管空肠 Rou-Y 吻合术、胰十二指肠切除术、胰体尾切除术、胰管切开取石术及胰腺假性囊肿内引流术. 显然, 非手术治疗已替代许多手术治疗, 成为大部分 CP 患者的治疗方式. 随着内镜技术的发展, 内镜下介入治疗以其损伤小、缓解率高而日益受到人们关注<sup>[28–30]</sup>. 尤其是我国, 胆源性为 CP 主要病因, 选择内镜下介入治疗可以同时解除胆道疾病诱因, 并缓解腹痛症状, 因此内镜下治疗已成为我国 CP 的主要治疗手段.

#### 4 参考文献

- 1 林庚金, 陈灏珠. 慢性胰腺炎. 实用内科学. 第 11 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:1832
- 2 Garg PK, Tandon RK. Survey on chronic pancreatitis in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:998-1004
- 3 Hayakawa T, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Jin CX, Kondo T. Clinical evidence of pathogenesis in chronic pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:669-674
- 4 Dufour MC, Adamson MD. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2003;27:286-290
- 5 Zildzic M. Diseases of the pancreas. *Med Arh* 2003;57(1 Suppl 2):91-92
- 6 周志超, 潘国宗, 曹世植. 慢性胰腺炎. 现代胃肠病学. 北京: 科学出版社, 1994:1840-1852
- 7 Tandon RK, Sato N, Garg PK. Chronic pancreatitis: Asia-Pacific consensus report. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:508-518
- 8 Dite P, Stary K, Novotny I, Precechtelova M, Dolina J, Lata J, Zboril V. Incidence of chronic pancreatitis in the Czech Republic. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:749-750
- 9 Strate T, Knoefel WT, Yekebas E, Izbicke JR. Chronic pancreatitis: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:97-106
- 10 徐家裕, 池肇春. 慢性胰腺炎. 实用临床胃肠病学. 第 1 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2001:1158
- 11 Lankisch MR, Imoto M, Layer P, DiMaggio EP. The effect of small amounts of alcohol on the clinical course of chronic pancreatitis. *Mayo Clin Proc* 2001;76:242-251

- 12 钱家鸣. 慢性胰腺炎的病因. 胃肠病学 2001;6:173-174
- 13 钱家鸣, 李景男, 田自力, 吕红, 陶丽萍. 215例慢性胰腺炎病因学分析. 胃肠病学 2001;6:153-155
- 14 孙钢, 宁晓红, 钱家鸣. 慢性胰腺炎 321例致病因素分析. 中国医刊 2002;37:30-32
- 15 Apte MV, Wilson JS. Alcohol-induced pancreatic injury. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:593-612
- 16 Singer MV. Effect of ethanol and alcoholic beverages on the gastrointestinal tract in humans. *Rom J Gastroenterol* 2002;11:197-204
- 17 Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14:141-145
- 18 Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Nakae Y, Kondo T, Hayakawa T. Chronic pancreatitis: overview of medical aspects. *Pancreas* 1998;16:323-328
- 19 Witt H. Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut* 2003;52:31-41
- 20 Rayford PL. Alcohol, tobacco (nicotine) and pancreatic pathophysiology. *J Assoc Acad Minor Phys* 2001;12:91-94
- 21 Lankisch PG. Natural course of chronic pancreatitis. *Pancreatol* 2001;1:3-14
- 22 中华内科杂志编委会. 全国胰腺疾病座谈会纪要. 中华内科杂志 1987;26:667-668
- 23 Otsuki M. Chronic pancreatitis in Japan: epidemiology, prognosis, diagnostic criteria, and future problems. *J Gastroenterol* 2003;38:315-326
- 24 Kahl S, Glasbrenner B, Zimmermann S, Malfertheiner P. Endoscopic ultrasound in pancreatic diseases. *Dig Dis* 2002;20:120-126
- 25 De Backer AI, Morteles KJ, Ros RR, Vanbeckevoort D, Vanschoubroeck I, De Keulenaer B. Chronic pancreatitis: diagnostic role of computed tomography and magnetic resonance imaging. *JBR BTR* 2002;85:304-310
- 26 Glasbrenner B, Kahl S, Malfertheiner P. Modern diagnostics of chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:935-941
- 27 Chowdhury RS, Forsmark CE. Pancreatic function testing. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:733-750
- 28 李兆申, 许国铭. 胰腺疾病内镜诊断与治疗学. 第1版, 上海: 第二军医大学出版社, 2004:190-232
- 29 Delhay M, Matos C, Deviere J. Endoscopic management of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2003;13:717-742
- 30 Mergener K, Kozarek RA. Therapeutic pancreatic endoscopy. *Endoscopy* 2003;35:48-54

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004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年7月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评价, 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, 采用了被引量、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)



# HBcAg生物学特性研究进展

徐志强, 成军, 张鸿飞

徐志强, 成军, 张鸿飞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室、感染三科  
北京市 100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队九五科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队十五科技攻关项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室、感染三科.  
cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

## 摘要

HBcAg存在于Dane颗粒的核心,是HBV的结构蛋白即病毒核壳蛋白,具有重要的生物学特性和临床病理意义. HBcAg由HBV基因组的C开放读码区(ORF)编码,具有高度免疫原性,对HBcAg的免疫应答在病毒清除中有重要作用. 血清HBcAg阳性可提供肝内HBV合成的信息,是病毒存在的直接标志. HBcAg感染的肝细胞是细胞免疫效应攻击的靶细胞,肝细胞溶解后HBcAg可直接释放入血,故能直接反映肝细胞损害和病情进展的程度. 检测肝组织HBcAg有助于确定乙型肝炎病原学诊断和评估肝细胞坏死炎症性活动的程度及病变发展的趋向,推测慢性乙型肝炎的预后. 血清和肝组织HBcAg检测具有多种实用价值,值得推荐.

徐志强, 成军, 张鸿飞. HBcAg生物学特性研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(12):2833-2836  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2833.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝DNA病毒,完整的HBV颗粒又称Dane颗粒,球形,直径约42 um. HBV核心抗原(Hepatitis B Core Antigen, HBcAg)存在于Dane颗粒的核心,是HBV的结构蛋白即病毒核壳蛋白,主要存在于受感染的肝细胞核内,他反映血清中Dane颗粒的存在及肝内HBV的复制. 存在于乙型肝炎患者血液和肝组织内的HBcAg具有重要的生物学特性和临床病理意义.

## 1 生物学特性

1.1 一般特性 HBcAg由HBV基因组的C开放读码区(ORF)编码,从第二个ATG(1 901 nt)起始翻译(终止密码子在2 458 nt). HBcAg有保守的三维结构,可因血清型不同而有183-185个氨基酸残基(aa),相对分子质量 $M_r$ 21 000,180个HBcAg形成27 nm的正20面体以构成核心颗粒. HBV核心部分含有环状双股DNA、DNA

聚合酶、HBcAg和e抗原(HBeAg),是病毒复制的主体. HBcAg包装HBV DNA,在病毒成熟过程中起重要作用. HBcAg已被证明<sup>[1]</sup>含有HBV特异性DNA聚合酶,是HBV复制的标志.

HBcAg可在受染的肝细胞核中查到,但他主要在胞质中产生,由胞核定位序列(nuclear localization sequences, NLS)<sup>[2]</sup>介导HBcAg进入细胞核中. 胞核定位序列位于HBcAg的羧基末端区(C端区)第145-156位和第172-183位的氨基酸序列<sup>[3]</sup>,具有与细胞核特异性结合,并将与之相连的蛋白或DNA转运到细胞核中的功能.

1.2 免疫反应 HBcAg具有高度免疫原性,在T细胞和B细胞水平上,HBcAg的抗原性较HBeAg强100倍<sup>[4]</sup>,几乎所有HBV感染者都产生抗-HBc,同时有T细胞免疫应答. 对HBcAg的免疫应答在病毒清除中可能有重要作用<sup>[5-11]</sup>. 这对HBcAg DNA<sup>[12]</sup>疫苗研究有重要的指导意义.

Th细胞根据其分泌细胞因子不同可分为Th1和Th2亚群. Th1细胞主要产生白介素-2(IL-2),干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )等促进细胞免疫反应; Th2细胞主要产生白介素-6(IL-6)、白介素-4(IL-4)、白介素-10(IL-10)等促进体液免疫反应. Th1和Th2细胞通过分泌的细胞因子相互下调对方的生长分化,刺激自身的增生. 机体的Th1型免疫反应可促进病原体的清除,而Th2型免疫反应则可加重机体的病理损害. 在HBcAg诱导下<sup>[7,13]</sup>,外周血单个核细胞(PBMC)产生Th1类细胞因子量明显增高;在HBeAg诱导下,Th2类细胞因子量明显增高. 慢性HBV感染进行免疫调节治疗的一个目标就是使HBeAg特异性T细胞由Th2细胞主导型转化为Th1细胞型,HBcAg有望打破HBeAg诱导的免疫耐受状态而增强Th1细胞优势表达达到治疗的目的. 慢性乙型肝炎患者和HBV慢性携带者体内针对HBV的特异性CTL应答明显低下,纠正这种CTL低反应状态,对于机体有效地清除HBV至关重要<sup>[14]</sup>.

DNA疫苗(基因疫苗)是近几年免疫学和分子生物学研究的新兴领域,他作为一种全新的高效免疫方法,已在许多难治性感染性疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病和肿瘤性疾病的预防及治疗领域显示出较好的应用前景. DNA疫苗可刺激机体特异性CTL功能的特性给HBV慢性持续感染的治疗带来新的希望.

采用治疗性疫苗打破宿主对HBV的免疫耐受状态来治疗慢性乙型肝炎和慢性乙型肝炎病毒携带者是一新的

有效途径<sup>[15]</sup>. HBV 核心抗原区 AA1-AA151 段含有多个不连续的抗原表位, 对刺激机体产生特异性的体液免疫和细胞免疫均具有重要作用<sup>[16]</sup>. Kuhober 和 Geissler *et al*<sup>[17-18]</sup>作了 HBcAg DNA 疫苗肌肉注射法免疫小鼠的初步观察. 该 DNA 疫苗具有良好的细胞免疫原性, 确可刺激宿主产生较强的 CTL 反应. 这一结果为我们进一步探索该 DNA 疫苗在治疗主要因机体 CTL 功能低下所致 HBV 慢性持续感染方面的应用前景奠定了初步的实验研究基础.

## 2 临床应用

2.1 血清 HBcAg HBsAg、HBeAg、抗-HBe 等免疫学指标都是体内存在乙型肝炎病毒颗粒的间接标志, 而 HBcAg 则是 HBV 存在的直接标志. 所以, HBcAg 测定更能反映 HBV 的存在及其复制程度, 比其他各种免疫学指标更灵敏、更特异. HBcAg 是乙型肝炎病毒(HBV)的核心成分, 若在血清中检出 HBcAg 则说明有 HBV 复制.

2.1.1 检测 血中的 HBcAg 是作为 Dane 颗粒内部成分存在. 极少有游离的 HBcAg, 故用常规方法不易检出. 在血清中不能直接检出 HBcAg<sup>[19]</sup>, 需加用开壳剂, 使 HBcAg 释放于溶液中然后进行测定. 检测 HBcAg, 目前多采用间接的方法, 即首先在试管内将 Dane 颗粒沉淀, 再用裂解剂裂解 Dane 颗粒外壳, 使 HBcAg 暴露游离, 并经过多次洗涤处理后, 用放免或酶免方法检测. 如用 EIA 微板法<sup>[20]</sup>检测血清 HBcAg, 被检标本无须任何处理, 直接在微孔板内进行检测, 应用于临床, 可与乙型肝炎病毒标志物同步检测.

2.1.2 血 HBcAg 与 HBsAg 的关系 HBcAg 出现的阳性率与 HBsAg 的出现密切相关. 往往 HBcAg(+) 与 HBsAg(+) 同时存在, 而 HBsAg(+) 时不一定会出现 HBcAg(+). 抗-HBs 的出现并不标志着 HBV 复制的中止, 而是复制水平减低. 不能以 HBsAg 阴性就排除 HBV 感染, 临床上 HBsAg 阴性的患者, 只要 HBcAg 检出阳性, 说明仍有乙型肝炎病毒复制. 以往认为血清中仅 HBsAg 阳性者, 病毒为非复制相, 无传染性, 但这种患者中, 也有检测出 HBcAg、HBV DNA 阳性者, 故判断单项血清 HBsAg 阳性者的传染性时应慎重.

2.1.3 血 HBcAg 与 e 系统的关系 HBeAg 阳性是 HBV 持续高水平复制和传染性强的标志, 其与 HBcAg、HBV DNA 密切相关, 并具有明显的平行关系. 多年来, 一直认为 e 抗原复制是复制标记物, 由于 HBeAg 是 HBcAg 的降解产物, 以可溶性蛋白形式存在, 在结构上不及 HBcAg 与病毒颗粒关系密切, 对判断病毒复制、评估传染性不及 HBcAg 敏感可靠.

一般认为, 当 HBeAg/ 抗-HBe 转换后, HBV 复制趋于减少, 没有传染性或传染性很小. HBeAg 被公认为是 HBV 复制的标志物. 但部分 HBeAg 阴性者的血清中仍可检出 HBcAg 和(或)HBV DNA, 说明 HBeAg 的表达可能不是 HBV 复制的必然结果, 对 HBeAg 阴性

感染者的带毒状态及抗-HBe 表达的临床意义必须重新认识, 不能忽视其具有传染性的可能.

2.1.4 血 HBcAg 与 HBV DNA、HBV DNA-P 的关系 在慢性乙型肝炎患者中, 血 HBcAg 与血 HBV DNA 有很好的相关性; 而在急性期, 尤其是在肝损害极期时, 往往血 HBcAg 阳性, 而血 HBV DNA 阴性, 考虑为 HBcAg 从受免疫损伤的被感染的肝细胞内释放入血, 这种情况甚至在病毒已终止复制后也可出现. 对 HBsAg 慢性携带状态患者, 判断 HBV 复制及传染性, HBcAg 的敏感性最高, HBV DNA 和 HBV DNA-P 次之, HBeAg 敏感性低.

2.1.5 慢性活动性肝炎中血 HBcAg 阳性率明显高于 ASC (无症状病毒携带者). 说明血 HBcAg 阳性较多见于病变活动较重的慢性肝炎而较少见于病变较静止的 ASC. 血清中的 HBcAg 阳性与肝脏病变活动程度有关, 且对估计预后有很好的价值. HBcAg 检出结果是: 肝硬化>慢性乙型肝炎中>慢性乙型肝炎轻型.

2.1.6 检测血 HBcAg 的临床意义 (1)对血液内 HBV 的开壳处理, 能直接检测 HBcAg, 能比 HBeAg 更客观地反映血 HBV 的存在, 以及作出数量多少的判断, 可替代 HBeAg 而作为病毒复制和传染性的敏感指标, 是病毒存在的直接标志. 他与 HBV 复制标志呈正相关, 可以反映 HBV 活动的复制程度. HBeAg 与乙型肝炎病毒其他五项标志物相比更是反映 HBV 复制的直接证据. 他可与其他的 HBV 血清学标志物起到相互配合和相互补充的作用. (2)有助于对乙型肝炎病情和预后的判断, HBcAg 感染的肝细胞是细胞免疫效应攻击的靶细胞, 肝细胞溶解后 HBcAg 可直接释放入血, 故能直接反映肝细胞损害和病情进展的程度. 在急性乙型肝炎早期 HBcAg 亦达高峰值, 而且病情严重者的 HBcAg 水平也相应提高. 慢性乙型肝炎患者, 血 HBcAg 阴性者比阳性者有明显的临床及生化指标的改善. HBcAg 含量与肝脏损害的情况有关, 有助于抗病毒药物及免疫治疗的疗效评价. (3)从理论上讲, 聚合酶链反应(PCR)检测法比固相放射免疫法灵敏度高, 但实际上可出现 HBcAg 阳性而 HBV DNA 阴性的结果. 因此, 两种检测方法可以互补使用, 以减少漏检. 在不具备 PCR 检测条件的单位, 以酶联(ELISA)法试剂盒在检测血清 HBV 五项标志的同时, 检测 HBcAg 不仅能进一步了解病毒的复制情况, 还可了解肝细胞损害和病情进展的程度, 且检测费用低廉, 有临床实用价值. (4)在对献血员的筛选中, 单凭 HBsAg 的测定来判断是否受 HBV 感染也是不够的, 会漏诊 HBsAg 阴性而 HBcAg 和抗-HBe 阳性的乙型肝炎患者, 只有三者同时检测, 才能更好地诊断乙型肝炎并防止在输血中传播, 降低输血后肝炎的发生率.

## 2.2 肝组织 HBcAg

2.2.1 分布 HBcAg 主要存在于 HBV 颗粒和受染的肝细胞中, HBV 复制时 HBcAg 表达于肝细胞内, 分胞核型、胞质型和胞膜型. Delladetsima *et al*<sup>[21]</sup>发现胆管上皮细

胞也是 HBV 的适合宿主, HBV 能够在其中复制并表达 HBcAg 和 HBsAg 抗原。

2.2.2 肝内 HBcAg 与 HBV DNA 关系 肝内 HBcAg 与 HBV DNA 的分布区域常较一致<sup>[22-24]</sup>, 有的肝细胞可同时检出 HBcAg 和 HBV DNA, 但多数 HBV DNA(+)肝细胞并不同时含有 HBcAg。HBV 高复制期 HBcAg 以胞核表达为主, 无或很少在胞质内表达; 而低复制期时相反, HBcAg 在肝细胞核内而不是细胞质内的表达程度能够精确地反映慢性乙型肝炎患者的病毒复制水平<sup>[25]</sup>。肝 HBcAg 与血清 HBV DNA 水平呈正相关。经干扰素  $\alpha$  治疗后的慢性活动性乙型肝炎患者, HBcAg 发生从核内向胞质的转换<sup>[26]</sup>。

2.2.3 肝内 HBcAg 与 HBeAg 关系 HBcAg 与 HBeAg 常同时表达在肝细胞内<sup>[23, 27-28]</sup>, 但在亚细胞水平有重要差异。在病毒活跃复制的 ASC, 常有较强的 HBcAg 胞核表达和 HBeAg 胞质表达; 活动性慢性乙型肝炎时常有 HBcAg 的胞质表达, 因免疫清除而病毒减少, 难以检出 HBeAg。作为免疫攻击的靶抗原, HBeAg 不及 HBcAg 重要。

2.2.4 肝内 HBcAg 与肝组织炎症活动关系 血清 HBV DNA、HBeAg 和定位于核内的 HBcAg 都与肝组织的损害程度无关<sup>[29]</sup>。慢性 HBV 感染者肝组织中浆膜型 HBcAg 的表达强度随肝组织病变活性积分(HAI)评分值的增高而增强<sup>[23, 30]</sup>, HAI 评分值低者核型 HBcAg 的表达增强。HBcAg 在核内或胞质内同时表达的其“炎症活动指数”高于 HBcAg 在胞质内和膜内表达。光镜下发现浆膜型 HBcAg 多分布于碎屑样坏死及灶性坏死区, 浆膜型 HBcAg 阳性肝细胞常有各种变化, 或明显萎缩, 或肿胀变形。增生胞核抗原(PCNA)<sup>[23, 27]</sup>是再生肝细胞的标志, 代表肝组织的炎症活性, PCNA 与胞质 HBcAg 表达程度正相关, 但不是胞核型 HBcAg 的独立影响因素。发生前 -C 区突变的 HBV 与未发生突变的野生株相比 HBcAg 在胞质内表达显著增高<sup>[31]</sup>, 并伴有较明显的肝组织炎症活动。HBcAg 在胞质内表达预示预后不良。

乙型肝炎引起的肝硬化肝组织中 HBcAg、HBV DNA 的阳性率较高。HBcAg 颗粒在肝组织中主要呈弥漫的浆膜型分布, HBcAg 和 HBV DNA 呈浆、膜型分布者, 其肝组织中 HBV DNA 表达程度、炎症活动度和纤维组织增生程度, 明显较呈核型分布者高。HBcAg 及 HBV DNA 阳性的肝组织, 炎症活动明显, 界面呈碎屑坏死, 灶性坏死。

观察肝内 HBcAg 颗粒的分布类型, 有助于判断 HBV 在肝组织中的复制状况; 肝组织病变的活动程度。这可能是由于机体对呈浆、膜型分布的 HBcAg 和 HBV DNA 具有更加强烈的免疫反应, 将肝内含活跃复制的 HBV DNA 和靶抗原 HBcAg 表达的肝细胞溶解破坏, 以清除病毒所致。

2.2.5 合并丁型肝炎时, 肝内 HBcAg 表达特点 HBV 合并 HDV 感染者的肝组织中, HBcAg 和 HDAg 阳性细胞分布关系不密切, HBcAg 阳性细胞明显少于 HDAg 阳

性细胞, HBcAg 主要呈核型表达, 胞质中阳性颗粒较少见到。表达强度也较弱, 表明 HDV 感染者 HBV 是低水平复制, HDV 可能有抑制 HBV 基因复制或病毒抗原表达的作用, 特别是在 HDV 复制活跃的阶段, 即 HDAg 大量表达时, HBV 复制受到的抑制最为明显。

2.2.6 儿童肝内 HBcAg 表达特点 儿童肝内 HBcAg 主要表达于核内。肝内 HBcAg 呈弥漫性分布者, 多见于 10 岁以内的较小儿童; 而呈局灶性分布者, 多见于 10 岁以上的较大儿童。HBcAg 呈局灶性分布比弥漫性分布者, ALT 水平较高并伴有较明显的肝脏炎症活动。在儿童慢性乙型肝炎患者中, 肝内 HBcAg 呈弥漫性分布者为病毒感染早期, HBcAg 呈局灶性分布并伴随 HBeAg 阳性者为疾病短期内进展的标志。

2.2.7 肝组织 HBcAg 检测的应用价值 (1)检测肝组织 HBcAg 有助于确定乙型肝炎病原学诊断, 尤其是对于血清乙型肝炎病毒标志物阴性病例, 在病原学诊断中弥补血清学诊断乙型肝炎的不足。(2)有助于评估肝细胞坏死炎症活动的程度及病变发展的趋向, 推测慢性乙型肝炎的预后。肝细胞内 HBcAg 转阴和肝细胞坏死病变减轻具有一致性。HBcAg 浆膜型者显示此种一致性, 而核型则否, 可能由于肝细胞质、膜上的 HBcAg 作为靶抗原易受到杀伤性 T 淋巴细胞的攻击, 导致肝细胞损害, 而核型 HBcAg 则不具有此种作用。(3)HBcAg 检测也是判断 HBV 复制状态的一项重要指标。肝组织 HBcAg 与 HBV DNA 两种病毒复制标志物相关。研究结果证实肝组织 HBcAg 检测具有多种实用价值, 值得推荐。

2.3 其他组织 HBcAg 的表达 国内学者<sup>[32]</sup>对乙型肝炎孕妇所分娩的死胎进行研究, 发现 HBcAg 在多种脏器内均可表达, 其中以肺、肝、肾脏、脐带为最高, 胸腺、心脏、脾、胎盘次之, 大脑最低。说明 HBV 有可能在多种组织内复制并表达抗原。这可能是 HBV 通过产妇传播, 导致新生儿乙型肝炎的高发病率、新生儿发育不良和死亡的重要因素。

总之, 充分认识 HBcAg 的生物学特点和其在血液、肝组织内表达的规律, 有助于我们通过对 HBcAg 的检测而正确判断是否有 HBV 的复制以及复制的强度, 正确评估肝病活动及肝组织损害的程度, 从而指导制定有效的治疗方案。对 HBcAg 的强免疫原特性的认识, 可以指导我们研制更有效的预防或治疗乙型病毒性肝炎的疫苗。

### 3 参考文献

- 1 Abbott WG, Geursen A, Fraser JD, Marbrook J, Skinner MA, Tan PL. The influence of a maternal chronic hepatitis B virus infection on the repertoire of transcribed T-cell receptor beta chain variable region genes in human cord blood. *Hepatology* 1995;22:1034-1039
- 2 Yeh CT, Liaw YF, Ou JH. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol* 1990;64:6141-6147
- 3 Eckhardt SG, Milich DR, McLachlan A. Hepatitis B virus core

- antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol* 1991;65:575-582
- 4 Bonino F, Brunetto MR. Hepatitis B virus heterogeneity, one of many factors influencing the severity of hepatitis B. *J Hepatol* 1993;18:5-8
  - 5 Marinos G, Torre F, Chokshi S, Hussain M, Clarke BE, Rowlands DJ, Eddleston AL, Naoumov NV, Williams R. Induction of T-helper cell response to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B: a major factor in activation of the host immune response to the hepatitis B virus. *Hepatology* 1995;22:1040-1049
  - 6 Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, Hata H, Nakayama E, Shiratori Y. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-232
  - 7 Milich DR, Schodel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J Virol* 1997;71:2192-2201
  - 8 Townsend K, Sallberg M, O'Dea J, Banks T, Driver D, Sauter S, Chang SM, Jolly DJ, Mento SJ, Milich DR, Lee WT. Characterization of CD8+ cytotoxic T-lymphocyte responses after genetic immunization with retrovirus vectors expressing different forms of the hepatitis B virus core and e antigens. *J Virol* 1997;71: 3365-3374
  - 9 Paul S, Tabassum S, Islam MN. A study on interferon-gamma (IFN-gamma) response by T cells stimulated by hepatitis B virus core antigen. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 2004;30:9-15
  - 10 Hyodo N, Nakamura I, Imawari M. Hepatitis B core antigen stimulates interleukin-10 secretion by both T cells and monocytes from peripheral blood of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Exp Immunol* 2004;135:462-466
  - 11 Tang TJ, de Man RA, Kusters JG, Kwekkeboom J, Hop WC, van der Molen RG, Schalm SW, Janssen HL. Intrahepatic CD8 T-lymphocytes and HBV core expression in relation to response to antiviral therapy for chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 2004;72:215-222
  - 12 Chen X, Li M, Le X, Ma W, Zhou B. Recombinant hepatitis B core antigen carrying preS1 epitopes induce immune response against chronic HBV infection. *Vaccine* 2004;22:439-446
  - 13 Szkaradkiewicz A, Jopek A, Wysocki J, Grzymislawski M, Malecka I, Wozniak A. HBcAg-specific cytokine production by CD4 T lymphocytes of children with acute and chronic hepatitis B. *Virus Res* 2003;97:127-133
  - 14 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60
  - 15 Shao HJ, Chen L, Shen MS, Yu GF. Enhancement of immune responses to the hepatitis B virus core protein through DNA vaccines with a DNA fragment encoding human IL-1beta 163-171 peptide. *Acta Virol* 2003;47:217-221
  - 16 Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. *Hum Immunol* 1999;60:1013-1017
  - 17 Kuhober A, Pudollek HP, Reifenberg K, Chisari FV, Schlicht HJ, Reimann J, Schirmbeck R. DNA immunization induces antibody and cytotoxic T cell responses to hepatitis B core antigen in H-2b mice. *J Immunol* 1996;156:3687-3695
  - 18 Geissler M, Tokushige K, Chante CC, Zurawski VR Jr, Wands JR. Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural proteins in mice after DNA-based immunization. *Gastroenterology* 1997;112:1307-1320
  - 19 Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, Maki N. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and Relation between Levels of HBcAg and HBV DNA. *J Clin Microbiol* 2003;41:1901-1906
  - 20 胡蔡香. 用 ELISA 微板法检测乙型肝炎病毒核心抗原. *中华实验和临床病毒学杂志* 1994;8:262-265
  - 21 Delladetsima JK, Vafiadis I, Tassopoulos NC, Kyriakou V, Apostolaki A, Smyrnof T. HBcAg and HBsAg expression in ductular cells in chronic hepatitis B. *Liver* 1994;14:71-75
  - 22 Wu PC, Fang JW, Lai CL, Lau SS, Lo CK, Lai A, Lau JY. Hepatic expression of hepatitis B virus genome in chronic hepatitis B virus infection. *Am J Clin Pathol* 1996;105:87-95
  - 23 Serinoz E, Varli M, Erden E, Cinar K, Kansu A, Uzunalimoglu O, Yurdaydin C, Bozkaya H. Nuclear localization of hepatitis B core antigen and its relations to liver injury, hepatocyte proliferation, and viral load. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:269-272
  - 24 Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, Maki N. Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load. *J Clin Microbiol* 2002;40:439-445
  - 25 Chu CM, Yeh CT, Chien RN, Sheen IS, Liaw YF. The degrees of hepatocyte nuclear but not cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen reflect the level of viral replication in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 1997;35:102-105
  - 26 Vrettou E, Tzioufa V, Raptopoulou M, Fragoudi K, Goulis G, Papadimitriou CS. Changes of hepatitis B core antigen (HBcAg) in liver biopsies of patients with chronic active hepatitis B treated with interferon. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1995;5:108-112
  - 27 Chu CM, Yeh CT, Sheen IS, Liaw YF. Subcellular localization of hepatitis B core antigen in relation to hepatocyte regeneration in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1995;109:1926-1932
  - 28 Karpinska E, Wawrzynowicz-Syczewska M, Chosia M, Jurczyk K, Urbanowicz W, Boron-Kaczmarek A. Hepatitis B core antigen in liver tissue from HBs-positive, HBe-negative patients. *Hepatogastroenterology* 2004;51:709-712
  - 29 Sharma RR, Dhiman RK, Chawla Y, Vasistha RK. Immunohistochemistry for core and surface antigens in chronic hepatitis. *Trop Gastroenterol* 2002;23:16-19
  - 30 Jazayeri MS, Dornan ES, Boner W, Fattovich G, Hadziyannis S, Carman WF. Intracellular distribution of hepatitis B virus core protein expressed in vitro depends on the sequence of the isolate and the serologic pattern. *J Infect Dis* 2004;189:1634-1645
  - 31 Park YN, Han KH, Kim KS, Chung JP, Kim S, Park C. Cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B virus infection: role of precore stop mutants. *Liver* 1999;19:199-205
  - 32 赵伟, 刘伟, 罗娟. 死胎多脏器组织中 HBcAg 表达的初步探讨. *临床肝胆病杂志* 2002;18:222-223

# 核因子 $\kappa$ B在急性胰腺炎全身炎症反应综合征中的作用

毕慧英, 夏时海

毕慧英, 夏时海, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科  
天津市 300162  
国家自然科学基金资助课题, No. 30300456  
项目负责人: 夏时海, 300162, 天津市, 中国人民武装警察部队医学院附属  
医院消化内科, xshhcx@sina.com  
电话: 022-60578765 传真: 022-24370605  
收稿日期: 2004-10-18 接受日期: 2004-10-27

## 摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP), 特别是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)病情凶险, 死亡率高。在AP从胰腺局部病变至全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)再至MODS的发展过程中, 核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)的过度活化可引起多种炎症反应相关基因的表达上调, 导致炎症递质、细胞因子的大量产生, 并在细胞因子网络调节中起重要作用, 直接影响着AP的发生发展和预后。

毕慧英, 夏时海. 核因子 $\kappa$ B在急性胰腺炎全身炎症反应综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2837-2841  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2837.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP), 特别是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)病情凶险, 死亡率高。过度活化的炎性细胞及其炎症因子决定了AP的临床进程。这些炎性递质进入血液循环后可激活机体其他炎症细胞释放大量炎性递质, 引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 而SIRS是AP发生MODS的必由之路。虽然SIRS缺乏显著的临床特征, 但其在AP的疾病发展过程中的作用却越来越受到关注; 进一步研究发现TNF- $\alpha$ 、IL-1、CAM1等多种细胞因子及黏附分子在基因水平上受到核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)的调节<sup>[1-2]</sup>。AP发生时NF- $\kappa$ B在其发病的早期即被激活, 从而诱导细胞因子、趋化因子、氧自由基、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)等表达, 促进局部的炎症病变向全身多系统多脏器发展<sup>[3]</sup>。本文着重从NF- $\kappa$ B与炎症反应、胰外脏器损伤及网络调节的关系出发, 就NF- $\kappa$ B在AP时与SIRS发生的关系综以论述。

## 1 NF- $\kappa$ B的结构及生物学特征

1.1 NF- $\kappa$ B的结构 NF- $\kappa$ B是由NF- $\kappa$ B/Rel蛋白家族成员, 包括RelA(P<sup>65</sup>)、RelB、cRel、NF- $\kappa$ B1(P<sup>50</sup>/P<sup>105</sup>)和NF- $\kappa$ B2(P<sup>52</sup>/P<sup>100</sup>)组成的同源或异源二聚体<sup>[4]</sup>。这些蛋

白的N端均有一个约300个氨基酸的Rel同源区(Rel homology domain, RHD), 内含DNA结合区、二聚体化区及核定位信号(NLS), 分别具有与DNA $\kappa$ B序列结合、形成二聚体及与NF- $\kappa$ B抑制蛋白(I $\kappa$ B)相互作用等功能。Rel蛋白因结构、功能等方面的不同, 可分为二类<sup>[5]</sup>: 一类是RelA(P<sup>65</sup>)、RelB及cRel, 其C端含反式激活区(transactivating domain), 具有激活基因转录的功能; 另一类是NF- $\kappa$ B1(P<sup>50</sup>/P<sup>105</sup>)和NF- $\kappa$ B2(P<sup>52</sup>/P<sup>100</sup>), 其C端含锚蛋白重复区(ankin repeat domain), 缺乏转录激活区, 无独立激活基因转录的功能。NF- $\kappa$ B/Rel蛋白间可形成多种二聚体, 如P<sup>50</sup>/RelA、P<sup>52</sup>/RelA、RelA/cRel、P<sup>50</sup>/P<sup>50</sup>、P<sup>52</sup>/P<sup>52</sup>、及RelA/RelA, 其中发挥主要功能的是P<sup>50</sup>/RelA异源二聚体, 他几乎存在于体内所有细胞。通常说的NF- $\kappa$ B一般即指P<sup>50</sup>/RelA。

1.2 NF- $\kappa$ B的生物学特征 在静息状态时, NF- $\kappa$ B通常与其抑制物I $\kappa$ B结合形成三聚体以无活性的复合体而被“囚禁”在细胞质中(P<sup>50</sup>/P<sup>50</sup>不受I $\kappa$ B的囚禁), 当细胞受到胞外信号刺激时, 通过一个或多个信号转导途径激活一系列激酶, 使I $\kappa$ B两个保守的N端丝氨酸残基磷酸化, 随后赖氨酸残基发生泛素化, 最后在26S蛋白酶体的作用下, I $\kappa$ B降解, 使NF- $\kappa$ B与I $\kappa$ B发生解离, 并迅速从胞质易位至胞核, 在胞核内与相应基因上的 $\kappa$ B位点发生特异性的结合, 调控细胞因子、化学趋化因子、细胞黏附分子、iNOS和协同刺激分子等相关基因的表达。目前认为NF- $\kappa$ B可能选择性地与某些 $\kappa$ B位点结合并产生反式激活作用, 从而促进某一类型的细胞因子产生。不同的二聚体与不同的DNA序列结合, 且亲和力和转录激活能力是不一样的, 如P<sup>50</sup>/RelA与 $\kappa$ B序列5' GGGRNYYCC 3'的亲和力高; RelA/cRel与 $\kappa$ B序列5' HGGARNYYCC3'的亲和力高(R代表嘌呤, Y为嘧啶, N为任意碱基, H为碱基A, C或T)。

## 2 NF- $\kappa$ B的活化及调节

2.1 NF- $\kappa$ B的活化 目前已发现多种因素可以诱导NF- $\kappa$ B的活化<sup>[6]</sup>, 包括肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、脂多糖(LPS)、氧化剂、放射线、紫外线、病毒及其代谢产物、抗原受体交联、钙离子载体、蛋白激酶(PKC)、抗原、植物凝集素(PHA)、刀豆素(CONA)和佛波醇(PMA)等与细胞分裂、增生有关的因素也可促进NF- $\kappa$ B的活化。其激活机制是一个复杂的过程, 尚

未完全阐明,但至少需要两个步骤:(1) I $\kappa$ B 从 NF- $\kappa$ B 复合体上解离降解,暴露 NF- $\kappa$ B 的核定位序列;(2) NF- $\kappa$ B 发生核易位并与特定的 DNA 序列结合,其中 I $\kappa$ B 的蛋白磷酸化和蛋白水解是两个主要环节.各种刺激信号(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等)通过细胞膜上的受体或配体将信号传至胞质,通过 NF- $\kappa$ B 的诱导酶(NIK)的磷酸化,激活 I $\kappa$ B 激酶复合体(IKK),使 I $\kappa$ B 蛋白上的 Ser32 和 Ser36 磷酸化,基于 26S 蛋白酶体的 I $\kappa$ B 成员随之被降解, NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 解离后迅速从胞质易位至细胞核,与调控细胞因子表达的基因启动子或增强子上的特异性序列结合,调节相关基因转录. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 通过氧化应激活化 NF- $\kappa$ B 的途径则例外,他是通过磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  上的 Tyr 残基,促使 I $\kappa$ B $\alpha$  从 NF- $\kappa$ B/Rel 复合体中解离,而不是使 I $\kappa$ B $\alpha$  降解.

自科学家发现丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的上游激活酶 raf-1(即 mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK)与 NIK 有一定的序列同源性和结构相似性,二者属于同一家族成员;并发现, TNF- $\alpha$ 、IL-1 等胞外刺激可通过不同的信号转导途径激活 MAPKKK<sup>[7-9]</sup>.许多学者认为 MAPK 在激活 NF- $\kappa$ B 中发挥重要作用.人们用牛磺胆酸钠诱导 AP 模型鼠发现巨噬细胞 MAPK 活性增强,同时伴有 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[9]</sup>. Chen *et al*<sup>[10]</sup>认为 MAPK 家族中的 P<sup>38</sup> 才是 MAPK 激活 NF- $\kappa$ B 过程中的主角,而非其他成员(P<sup>44</sup>/P<sup>42</sup> MAPK).因为他们发现用 P<sup>38</sup> MAPK 的抑制剂 SB203580 能明显抑制 LPS 对 NF- $\kappa$ B 的活化,而 P<sup>44</sup>/P<sup>42</sup> MAPK 抑制剂 PD98095 则无此作用.但 Murr *et al*<sup>[11]</sup>用弹性蛋白酶刺激 Kuffer 细胞,在 7 min 时既可检测出磷酸化的 P<sup>38</sup>-MAPK, SAPK/JNK 和 ERK1/2,以及活化的 NF- $\kappa$ B,和 TNF- $\alpha$  的表达;在 60 min 时 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  回落,而 P<sup>38</sup>-MAPK, SAPK/JNK 和 ERK1/2 仍处于活性状态.抑制 MAPK 只能部分抑制 NF- $\kappa$ B 活性.认为 MAPKKK-MAPKK-MAPK 级联反应并不完全会聚 NF- $\kappa$ B,但 NF- $\kappa$ B 在细胞因子瀑布效应中却发挥着开关(switching off)作用.

许多研究已证实感染、内毒素血症参与了 AP 的发病机制,内毒素的结构成分 LPS 进入血液循环后与 LPS 结合蛋白(LPB)结合,然后再结合细胞膜表面的受体 CD14 分子, LPS 以 LPS-LBP-CD14 三体复合物形式活化 Toll 样受体 4(TLR4)的信号传导,其信号传导可以通过 NF- $\kappa$ B 激活细胞因子(如 IL-1、IL-6 和 IL-8)基因转录<sup>[12]</sup>. Hietaranta *et al*<sup>[13]</sup>发现胰弹性蛋白酶可以促进人骨髓培养细胞(THP-1)TNF- $\alpha$  的产生,其过程可以被 NF- $\kappa$ B 抑制剂和 TLR4 抗体抑制,认为胰弹性蛋白酶是通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路发挥其促炎作用.血清中磷脂酶 A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)的催化活性与胰腺炎严重程度密切相关,尤其当胰腺炎并发出血坏死时,其活性升高最为显著. PLA<sub>2</sub> 主要包括磷脂酰胆碱和溶血磷脂胆碱,研究发现后者在多种细胞(如血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和

单核细胞等)中可活化 NF- $\kappa$ B 并诱导基因表达、编码各种黏附分子、细胞因子和生长因子. Masamune *et al*<sup>[14]</sup>用溶血磷脂胆碱处理 AR42J 细胞,发现其浓度在大于或等于 10 mmol/L 时可诱导细胞发生凋亡,在 10 和 25 mmol/L 时可提高 NF- $\kappa$ B 和活化蛋白-1(activating protein-1, AP-1)的 DNA 结合活性,并促进 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 调控的基因转录.因而,认为溶血磷脂胆碱通过诱导 NF- $\kappa$ B 的活化促进多种参与 AP 病理生理过程的物质的表达,在炎症反应过程中起到重要作用,其结果是大量促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、黏附分子、脂类递质和凝血因子的过度表达,从而引起 SIRS.

**2.2 NF- $\kappa$ B 的调节** 体内 NF- $\kappa$ B 的活化调控包括两条途径:(1)经细胞外的正反馈途径. NF- $\kappa$ B 活化后,可增强 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的基因转录,使 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  产生和释放增多,进而再次激活 NF- $\kappa$ B,使 IL-6 和 IL-8 产生和释放增多,导致最初的炎症信号进一步放大;(2)经细胞内、外的负反馈途径.细胞内 NF- $\kappa$ B 活化后,在启动炎症递质基因转录的同时, I $\kappa$ B $\alpha$  和 P<sup>105</sup> 的基因转录亦被上调,这是由于这两种基因的启动子均含有 NF- $\kappa$ B 反应元件,这将有助于将 NF- $\kappa$ B 限制在细胞质,下调细胞核中 NF- $\kappa$ B 的活性,从而终止炎症递质的生成;另外, NF- $\kappa$ B 的活化,也使同源二聚体生成增多.此种二聚体易位于细胞核后,虽然能与 NF- $\kappa$ B 竞争性地结合  $\kappa$ B 序列,抑制 NF- $\kappa$ B 的活性,但是由于该二聚体无转录激活区,所以可减少炎症递质及黏附分子的表达. Hoffmann *et al*<sup>[15]</sup>研究 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 负反馈调节通路时,发现 I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  和 I $\kappa$ B $\epsilon$  都具有抑制 NF- $\kappa$ B 的功能,但 NF- $\kappa$ B 激活后仅上调 I $\kappa$ B $\alpha$  的基因表达,却不上调 I $\kappa$ B $\beta$  和 I $\kappa$ B $\epsilon$  的基因表达,这说明在 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 负反馈调节通路上主要发挥作用的是 I $\kappa$ B $\alpha$ .细胞外也存在负反馈调节.刺激 NF- $\kappa$ B 活化的因素如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  也可导致反向调节细胞因子如 IL-10、IL-13 等的产生,他们可抑制炎症细胞因子的产生.这种作用是 IL-10、IL-13 通过阻断 NF- $\kappa$ B 活化而产生的.

### 3 NF- $\kappa$ B 在急性胰腺炎全身炎症反应综合征中的作用

**3.1 NF- $\kappa$ B 与 AP 炎症反应的关系** SIRS 发生和发展的病理生理基础在于过度失控的炎症反应.已证明 AP 时伴有促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 等)升高,而且其升高幅度与 AP 的严重程度密切相关<sup>[16]</sup>. NF- $\kappa$ B 作为一个重要的调控因子,调节多种参与炎症反应相关基因的转录.在 AP 发生、发展过程中, NF- $\kappa$ B 的过度活化可引起多种炎症反应相关基因的表达上调,导致炎症递质、细胞因子的大量产生.许多动物实验及体内外细胞实验证实, AP 时胰腺内 NF- $\kappa$ B 激活伴有过度活化的炎症细胞,主要有中性粒细胞、单核/巨噬细胞、内皮细胞等,他们可释放多种炎性递质,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、细胞间黏附分子

(ICAM1)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM1)、氧自由基 (ROS)、iNOS、血小板活化因子 (PAF)、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、环氧化酶 2 (COX2) 及 P、E 选择素等. 这些炎性递质基因上的启动子和增强子中都存在一个或多个  $\kappa$ B 序列即 NF- $\kappa$ B 的结合位点<sup>[17]</sup>, 活化的 NF- $\kappa$ B 可单独或与其他转录因子协同参与上述炎症递质基因的诱导表达. Krappmann *et al*<sup>[18]</sup>进一步发现 LPS 可活化 TLR4 信号传导, 在 B 细胞前体和树状细胞通过 IKK/NF- $\kappa$ B 通路上调 AP-1 的表达, 他们认为 AP-1 是 NF- $\kappa$ B 的靶基因. Fujioka *et al*<sup>[19]</sup>也通过体外实验得出同样的结果. NF- $\kappa$ B 和 AP-1 均是调节炎性递质产生和释放的重要转录因子, 共同参与 SIRS 的发生和发展, 其中 LPS 通过早期激活 NF- $\kappa$ B 和继发激活 AP-1 加重炎性反应, 进一步说明 NF- $\kappa$ B 在炎性递质调节网络中发挥主要作用.

Chen *et al*<sup>[13]</sup>采用腺病毒作为载体, 使目的基因 (NF- $\kappa$ B 活性亚单位 RelA/P65 的基因) 与腺病毒的 DNA 片段发生整合, 而后经胰管注射的方法直接将含有目的基因的腺病毒 (Ad p65) 注入胰腺, 发现注入 Ad p65 后, 大量胰腺细胞被感染, NF- $\kappa$ B 目的基因在胰腺内表达、产生大量活化的 NF- $\kappa$ B, 并伴有严重的炎症反应发生, 在胰腺内可以见到大量中性粒细胞浸润及广泛的组织病理损伤; 而整合了对照基因的腺病毒未见引起胰腺内 NF- $\kappa$ B 的表达、活化, 以及胰腺的组织病理损伤. Altavilla *et al*<sup>[20]</sup>用雨蛙素诱导 NF- $\kappa$ B 基因敲除鼠, 与同胎 WT 小鼠对照, 发现其 TNF- $\alpha$  水平及血清淀粉酶水平下降, 为 NF- $\kappa$ B 活化与 AP 的炎症反应之间的相关性提供了直接的证据.

Grewal 和 Norman *et al*<sup>[21-22]</sup>研究发现, SAP 时首先在胰腺内产生, 然后在肺肝内产生, Gukovsky *et al*<sup>[23]</sup>在胰腺炎的动物模型中发现, 建立模型后 30 min NF- $\kappa$ B 即有强烈的表达, 指出 NF- $\kappa$ B 的早期高表达在诱发 AP 的炎症反应中至关重要. Ethridge *et al*<sup>[24]</sup>发现在 3-6 h NF- $\kappa$ B 表达又会出现第二个高峰, NF- $\kappa$ B 的第一个高峰的出现是第二个高峰出现的基础, 且由 NF- $\kappa$ B 调控的基因产物与 NF- $\kappa$ B 的激活相平行<sup>[25]</sup>. 提示 NF- $\kappa$ B 的两次激活与 AP 的 SIRS 密切相关. 我们是否可以认为 NF- $\kappa$ B 首先在胰腺激活, 释放细胞因子可以通过“扳机样作用”触发炎症递质的“瀑布样级联反应”, 炎性递质释放入血. 胰内通过 NF- $\kappa$ B 的细胞内、外的负反馈途径抑制 NF- $\kappa$ B 的激活. 但炎性递质又可再度激活胰外脏器 (中性粒细胞、Kuffer 细胞、肝、肺、肠等) 的 NF- $\kappa$ B, 导致大量炎性递质产生, 从而引起 SIRS.

### 3.2 NF- $\kappa$ B 与胰外脏器损伤

AP 相关肝、肺及肠黏膜的损伤为 SIRS 的发生提供了直接证据. 许多研究显示在肝、肺和肠黏膜都发现有 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[26-28]</sup>, 其参与了 SIRS 的发生和发展, 而随后发生的 ARDS 和 MODS 成为胰腺炎的主要死亡原因. Masamune *et al*<sup>[29]</sup>将急性坏死性胰腺炎的腹水注入健康大鼠腹腔后, 引起大鼠肺

内粒细胞 NF- $\kappa$ B 的激活, 提示 SAP 时, 腹水对远处器官的损害是通过 NF- $\kappa$ B 的激活及随后产生的细胞因子起作用的.

#### 3.2.1 NF- $\kappa$ B 与 AP 相关肺损伤

Pastor *et al*<sup>[30]</sup>认为急性肺损伤是 AP 的常见并发症, 并是 AP 早期死亡原因, 在 SAP 早期发生 SIRS 患者中 50% 死于相关肺损伤, 其发病机制不甚清楚, 但许多动物实验发现炎性细胞及炎性递质 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM-1, IL-10, PAF) 参与了肺损伤的发生. Jaffray *et al*<sup>[31]</sup>发现弹性蛋白酶可激活 NF- $\kappa$ B 促进白细胞产生细胞因子, 从而引起类似胰腺炎相关 ARDS 的肺损伤. 进一步研究发现弹性蛋白酶可诱导肺 IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  的降解 (30 min), NF- $\kappa$ B 的激活 (60 min) 和 TNF- $\alpha$  基因的表达 (60 min), 并导致中性粒细胞的浸润 (4 h) 和肺泡毛细血管渗出 (24 h). AP 病程中, NF- $\kappa$ B 激活后可启动 iNOS 基因转录, 使一氧化氮 (NO) 产生显著增加, NO 不仅是一种舒血管因子, 也是一种较强的炎症递质, 他可发挥强烈的舒血管作用, 导致肺血管通透性增加, 同时大量产生的 NO 亦可以通过其细胞毒作用直接造成肺细胞损伤<sup>[32]</sup>.

#### 3.2.2 NF- $\kappa$ B 与 AP 相关肝损伤

Murr *et al*<sup>[33]</sup>发现胰弹性蛋白酶可诱导远处器官巨嗜细胞产生 TNF- $\alpha$ , 从而引起胰腺炎相关肝损伤, 其可能的机制是通过激活 NF- $\kappa$ B 作用于肝 Kupffer 细胞, 从而刺激细胞因子的产生. 研究表明 SAP 时肝组织产生细胞因子并介导肝损伤. 研究进一步证实, 正常肝组织内很少见 NF- $\kappa$ B 活化, AP 肝组织内 NF- $\kappa$ B 活化, 活化的 NF- $\kappa$ B 主要位于肝细胞核内. 研究结果还表明, 给予 NF- $\kappa$ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 预处理后, 再制备 SAP 模型, 大鼠的谷草转氨酶 (AST) 明显降低, 说明抑制 NF- $\kappa$ B 活化可降低 AST 水平, 对肝损伤具有保护作用. Gray *et al*<sup>[34]</sup>构建表达 photinus 萤光素酶的转基因鼠模型, 该酶受到依赖于 NF- $\kappa$ B 启动子的调控, 可以间接反映 NF- $\kappa$ B 的活性, 用缺乏胆碱而辅加乙硫氨酸 (CDE) 饮食诱导转基因鼠 AP 后, 测定活体和胰、肝、肺组织匀浆的萤光素酶活性, 结果发现在 CDE 饮食 48 h 和 60 h 后活体动物上腹部萤光素酶活性明显升高, 60 h 和 72 h 可观察到胸腔萤光素酶活性明显升高; 胰、肝、肺组织匀浆的萤光素酶活性在 48 h 和 60 h 后均明显升高, 支气管肺泡灌洗液中总的有核细胞数在 72 h 明显增多, 表明肝脏通过激活 NF- $\kappa$ B 活性在 AP 的 SIRS 中发挥重要作用. Folch-Puy *et al*<sup>[35]</sup>用胰腺相关蛋白 (PAP) 腔静脉注射诱导大鼠胰腺炎肺损伤, 对照牛磺胆酸钠诱导大鼠胰腺炎, 3 h 后检测肝肺的 TNF- $\alpha$ 、P-选择素、热休克蛋白 (HSP-70) 的 mRNA 表达和细胞外超氧化歧化酶 (EC-SOD) 水平. 发现肺内 P-选择素高表达, 坏死渗出、氧化反应明显. 血清 TNF- $\alpha$  水平增高, TNF- $\alpha$  mRNA 在肝过度表达伴随 NF- $\kappa$ B 的激活, 原位杂交显示 TNF- $\alpha$  过度表达定位于肝细胞. 由 PAP 诱导的肺损伤能被抗 TNF- $\alpha$  抗体抑制, 表明



PAP对胰腺炎的肺损伤是通过激活肝细胞TNF- $\alpha$ 的表达和TNF- $\alpha$ 释放入血液循环后作用于肺,激活机体其他炎症细胞释放而形成的。

3.2.3 NF- $\kappa$ B与AP相关肠黏膜损伤 SIRS的发生与感染密切相关,虽然AP感染不是产生SIRS的首发因素,但对SIRS的发展却起着推波助澜的作用,AP患者SIRS伴有感染者的死亡率高于不伴感染者。Kazantsev *et al*<sup>[36]</sup>曾在16条犬中利用标记pUC4K质粒的大肠杆菌研究坏死型胰腺炎时细菌的移位及感染源,提出肠道是胰腺感染的发源地,且AP时肠黏膜的缺血性损伤将促进细菌移位的发生。Ogawa<sup>[37]</sup>认为SAP时可继发肠道屏障功能衰竭,肠腔内细菌及毒素易位至胰腺和其他脏器,导致细菌感染移位,造成第二次打击,并进一步激发SIRS的发生。研究表明,用牛磺胆酸钠诱导的急性坏死型SD大鼠模型NF- $\kappa$ B于3 h即大量激活,主要位于肠绒毛上皮的细胞核靠近肠绒毛顶端的单核细胞,并介导炎症反应<sup>[28]</sup>。NF- $\kappa$ B一方面加重肠道屏障功能衰竭,另一方面则促使SIRS不断扩大。

3.3 NF- $\kappa$ B的网络调节 目前AP的确切发病机制仍未完全阐明,自身消化学说、细菌移位和继发感染-第二次打击学说、微循环障碍学说、白细胞过度激活学说、细胞因子和炎症递质学说以及免疫机制、细胞凋亡和氧自由基学说等均在某个侧面对AP的发病机制进行了阐述,而各学说都承认NF- $\kappa$ B具有细胞信号传导的作用。NF- $\kappa$ B作为一种转录因子是影响细胞因子产生的重要调节剂。在体内,NF- $\kappa$ B的活化过程受到精细调控。Kunsch *et al*<sup>[38]</sup>发现,不同的 $\kappa$ B位点与不同的NF- $\kappa$ B间具有不同的亲和力。Lin *et al*<sup>[39]</sup>证实,不同的NF- $\kappa$ B与同一 $\kappa$ B位点结合后激活转录的能力也不同。Yeger-Lotem *et al*<sup>[40]</sup>认为蛋白间的作用(protein-protein interaction, PPIs)和基因转录调节(transcription-regulation interaction, TRI)是细胞内网络修饰的两大方式,NF- $\kappa$ B的激活物通过PPIs构成的网络,而NF- $\kappa$ B通过TRI又可再次作用于其激活物,构成一个更庞大的网络,而NF- $\kappa$ B就处于转录调节环节上,发挥重要作用。

总之,细胞因子网络的失衡在AP的发生占有极其重要的地位,ARDS、MODS与细胞因子等炎症递质的高表达之间存在明显的关系。NF- $\kappa$ B可在转录水平上调控这些炎症递质的基因表达,并在细胞因子瀑布样级联反应中起着中心作用。一项前瞻性的临床研究结合体外实验也表明,外周血单核细胞NF- $\kappa$ B激活的患者,其并发症的风险显著提高,并与NF- $\kappa$ B的激活程度相关<sup>[41]</sup>。从理论上讲,如果能有效拮抗NF- $\kappa$ B的活化,则可起到以一当十,事半功倍的抗炎效果。因此将NF- $\kappa$ B作为研究AP发病机制及调节器官功能的方向,选用特异性的NF- $\kappa$ B抑制剂,截断NF- $\kappa$ B激活的信号转导途径从而拮抗SIRS的发生发展,有可能成为今后治疗AP的重要手段之一<sup>[42]</sup>。

#### 4 参考文献

- Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF- $\kappa$ B. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:226-232
- Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF- $\kappa$ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-860
- Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF- $\kappa$ B activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002;122:448-457
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-455
- Chapman NR, Perkins ND. Inhibition of the RelA(p65) NF- $\kappa$ B subunit by Egr-1. *J Biol Chem* 2000;275:4719-4725
- 朱斌, 孙家邦. 核因子- $\kappa$ B及炎症递质与急性胰腺炎. *中华肝胆外科杂志* 2002;8:126-128
- Mercurio F, Manning AM. NF- $\kappa$ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 1999;18:6163-6171
- Delfino F, Walker WH. Hormonal regulation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol* 1999;157:1-9
- Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2513-2518
- Chen CC, Wang JK. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* 1999;55:481-488
- Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR Jr, Norman JG. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF- $\kappa$ B. *J Gastrointest Surg* 2003;7:20-25
- Nishimune H, Vasseur S, Wiese S, Birling MC, Holtmann B, Sendtner M, Iovanna JL, Henderson CE. Reg2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nat Cell Biol* 2000;2:906-914
- Hietaranta A, Mustonen H, Puolakkainen P, Haapiainen R, Kempainen E. Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF- $\kappa$ B. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:192-196
- Masamune A, Sakai Y, Yoshida M, Satoh A, Satoh K, Shimosegawa T. Lysophosphatidylcholine activates transcription factor NF- $\kappa$ B and AP-1 in AR42J cells. *Dig Dis Sci* 2001;46:1871-1881
- Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The IkappaB-NF- $\kappa$ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 2002;298:1241-1245
- 夏时海, 赵晓晏, 郭萍. 急性胰腺炎促炎细胞因子和抗炎细胞因子的动态变化及其作用. *临床消化病杂志* 2001;13:51-53
- Abraham E. NF- $\kappa$ B activation. *Crit Care Med* 2000;28:N100-104
- Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, Esen M, Thiel A, Mordmuller B, Scheidereit C. The IkappaB kinase complex and NF- $\kappa$ B act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol Cell Biol* 2004;24:6488-6500
- Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. NF- $\kappa$ B and AP-1 connection: Mechanism of NF- $\kappa$ B-dependent Regulation of AP-1. *Mol Cell Biol* 2004;24:7806-7819
- Altavilla D, Famulari C, Passaniti M, Galeano M, Macri A, Seminara P, Minutoli L, Marini H, Calo M, Venuti FS, Esposito M, Squadrito F. Attenuated cerulein-induced pancreatitis in nuclear factor-kappaB-deficient mice. *Lab Invest* 2003;83:1723-1732
- Grewal HP, Kotb M, el Din AM, Ohman M, Salem A, Gaber L, Gaber AO. Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage. *Surgery* 1994;115:213-221
- Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG. Tissue specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. Aprobable

- mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci* 1997; 42:1783-1788
- 23 Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandolfi SJ. Early NF  $\kappa$ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998;275:1402-1414
  - 24 Ethridge RT, Hashimoto K, Chung DH, Ehlers RA, Rajaraman S, Evers BM. Selective inhibition of NF- $\kappa$ B attenuates the severity of cerulein induced acute pancreatitis. *J Am Coll Surg* 2002;195:497-505
  - 25 Han SJ, Ko HM, Choi JH, Seo KH, Lee HS, Choi EK, Choi IW, Lee HK, Im SY. Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Biol Chem* 2002;277:44715-44721
  - 26 纪龙, 徐家裕, 袁耀宗, 章永平, 翟祖康, 涂水平. 核因子- $\kappa$ B 在重症急性胰腺炎肺损伤发病机制中的作用. *胰腺病学* 2001;1:11-14
  - 27 袁耀宗, 纪龙, 朱颖, 翟祖康, 章永平, 徐家裕. 核因子- $\kappa$ B 在重症急性胰腺炎肝损伤中的作用研究. *上海医学* 2002;25:172-175
  - 28 王兴鹏, 王冰娴, 吴恺, 徐选福, 谢传高, 徐敏. 急性坏死性胰腺炎肠黏膜 NF- $\kappa$ B 介导的细胞因子过渡表达及生长激素的作用. *中华肝胆外科杂志* 2003;9:45-49
  - 29 Masamune A, Shimosegawa T, Fujita M, Satoh A, Koizumi M, Toyota T. Ascites of severe acute pancreatitis in rats transcriptionally up-regulates expression of interleukin 6 and 8 in vascular endothelium and mononuclear leukocytes. *Dig Dis Sci* 2000;45:429-437
  - 30 Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003;124:2341-2351
  - 31 Jaffray C, Yang J, Carter G, Mendez C, Norman J. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappaB and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000;128:225-231
  - 32 朱斌, 孙家邦, 张淑文, 李非, 刘爽, 崔叶青, 孙海晨. NF- $\kappa$ B 活化及 iNOS 基因表达在急性胰腺炎肺损伤中的作用. *中华肝胆外科杂志* 2004;10:248-251
  - 33 Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production with in Kupffer cells via nuclear factor kappaB. *J Gastrointest Surg* 2002;6:474-480
  - 34 Gray KD, Simovic MO, Chapman WC, Blackwell TS, Christman JW, Washington MK, Yull FE, Jaffal N, Jansen ED, Gautman S, Stain SC. Systemic nf kappaB activation in a transgenic mouse model of acute poancreatitis. *Surg Res* 2003; 110:310-314
  - 35 Folch-Puy E, Garcia-Movtero A, Iovanna JL, Dagorn JC, Prats N, Vaccaro MI, Closa D. The pancreatitis-associated protein induces lung inflammation in the rat through activation of TNF alpha expression in hepatocytes. *J Pathol* 2003;199:398-408
  - 36 Kazantsev GB, Hecht DW, Rao R, Fedorak JJ, Gattuso P, Thompson K, Djuricin G, Prinz RA. Plasmid labeling confirms bacterial translocation in pancreatitis. *Am J Surg* 1994;167:201-206
  - 37 Ogawa M. Acute pancreatitis and cytokines: "second attack" by septic complication leads to organ failure. *Pancreas* 1998; 16:312-315
  - 38 Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:4412-4421
  - 39 Lin R, Gewert D, Hiscott J. Differential transcriptional activation in vitro by NF-kappa B/Rel proteins. *J Biol Chem* 1995; 270:3123-3131
  - 40 Yeager-Lotem E, Sattath S, Kashtan N, Itzkovitz S, Milo R, Pinter RY, Alon U, Margalit H. Network motifs in integrated cellular networks of transcription-regulation and protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5934-5939
  - 41 Satoh A, Masamune A, Kimura K, Kaneko K, Sakai Y, Yamagiwa T, Satoh M, Kikuta K, Asakura T, Shimosegawa T. Nuclear factor kappa B expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2003;26:350-356
  - 42 Pezzilli R, Ceciliato R, Barakat B, Corinaldesi R. Immune-manipulation of the inflammatory response in acute pancreatitis. What can be expected? *JOP* 2004;5:115-121

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

• 消息 •

## *World Journal of Gastroenterology* 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.

# 骨髓造血干细胞与肝再生的相关性研究

王鹤桦, 潘兴华, 庞荣清, 高士争

王鹤桦, 庞荣清, 高士争, 成都军区昆明总医院医学实验科  
云南省昆明市 650032  
潘兴华, 中山大学医学实验动物中心 广东省广州市 510089  
国家自然科学基金资助项目, No. 30270674  
云南省自然科学基金重点资助项目, No. 2003C013Z  
中国博士后基金资助项目, No. 200334431  
项目负责人: 潘兴华, 650032, 云南省昆明市, 成都军区昆明总医院医学实验科, xinghuapan@yahoo.com.cn  
电话: 0871-5413564 传真: 0871-4074773  
收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-09-30

## 摘要

感染、中毒等引起的急慢性肝损伤治疗是临床医学领域的世界性难题, 干细胞的研究为肝再生提供了全新的思路. 肝再生的细胞学机制涉及肝细胞、肝干细胞和骨髓干细胞等. 新近发现骨髓造血干细胞具有向肝细胞转化的潜能, 可以在体内外被诱导分化为肝样细胞, 移植到肝损伤动物体内可以修复肝组织损伤, 这为肝再生研究开辟了新的途径. 对骨髓造血干细胞参与肝细胞再生的深入研究, 有可能找到肝损伤治疗的有效措施.

王鹤桦, 潘兴华, 庞荣清, 高士争. 骨髓造血干细胞与肝再生的相关性研究. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2842-2844  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2842.asp>

## 0 引言

近年来, 有关干细胞(stem cells, SC)的研究是生物学上最有趣、最复杂、也最有吸引力的领域之一, 几乎涉及了所有的生命科学和生物医药领域. 肝脏疾病是危害人类健康的一类重要疾病, 全球有庞大的肝病人, 其中绝大多数未能得到有效治疗. 肝脏移植术由于供肝匮乏, 免疫排斥及费用昂贵等问题, 一直未能广泛应用. 如何促进肝细胞(liver cells)再生, 寻找有功能的肝细胞来源是亟需解决的医学问题, 而干细胞研究的进展为利用干细胞移植和不同来源干细胞向肝系细胞转化来治疗各种肝病提供了可能性<sup>[1]</sup>. 本文就骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)的生物学特性、肝脏再生及其机制、骨髓 HSC 与肝再生的联系及在肝病治疗中的应用作一综述.

## 1 骨髓 HSC 的生物学特性

SC 是具有自我更新、高度增生和多向分化潜能的细胞群体, 特定条件下可以分化为不同的功能细胞, 形成多种组织和器官<sup>[2]</sup>. 根据其发育阶段, SC 可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)和成体干细胞(adult stem cells, ASC). 按分化潜能的大小, SC 可被分为三种类

型, 全能干细胞(totipotent stem cells)、多能干细胞(multipotent stem cells)和单能干细胞(monopotent stem cells). 这些干细胞在基础研究和临床应用中均具有重要价值, 但人类胚胎在研究中的应用一直倍受争议, 而 ASC 的受重视程度日益增加. 骨髓 HSC 是研究和临床应用最早的 ASC, 由于其具有可塑性即分化为其他类型组织的能力而成为近年来研究的热点, 且由于他来源丰富, 取材相对容易, 可来源于自身, 避免免疫排斥反应, 实现个体化治疗以及无伦理、法律问题而具有广阔的应用前景. 其可塑性不但为组织器官损伤的修复提供了新思路, 而且使其成为一种理想的基因治疗的载体细胞, 并有可能成为干细胞工程用来克隆器官的一种新型“种子”细胞.

骨髓 HSC 与其他多能干细胞相比, 还有一些不同的生物学特性<sup>[2]</sup>: 首先, 在个体发育过程中, HSC 历经多次迁移, 先由卵黄囊转移到胎肝, 再到达骨髓, 在其后的某些条件下又可出现髓外造血的情况, 而其他多能干细胞多在固定的场所发育成特定的组织; 其次, 由于生理需要, HSC 始终处于较为活跃的增生与分化状态, 能从骨髓源源不断地进入外周血而到达全身各处, 而成熟个体中的多能干细胞多局限于相应的组织器官中, 一般情况下处于类似休眠的状态.

随着干细胞技术的发展以及干细胞本身所具有的特性, 使得人类有可能在体外培养某些干细胞, 定向诱导分化为我们所需要的各种组织细胞以供临床所需, 使人类能够实现用干细胞进行治疗疾病和完美替代损伤组织器官的梦想.

## 2 肝脏再生及其生物学机制

肝脏含有多种类型的细胞, 如肝细胞、胆管上皮细胞、肝巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞等. 这些细胞不同程度地参与了肝的消化、代谢、分泌胆汁、合成血浆蛋白、解毒等功能.

正常肝细胞的分裂相是极少见的, 但是在肝脏损伤后(如肝部分切除、化学性或病毒性损伤), 尤其在肝部分切除术后, 残余肝细胞迅速出现快速活跃的分裂增生, 直至肝脏恢复正常体积和功能. 如在大鼠 3/4 肝脏切除术模型中, 术后 5-7 d 即恢复原有肝脏的重量、体积以及肝细胞数量. 肝脏如此惊人的再生潜能使得几十年前就有学者提出可能有肝脏干细胞的存在. 目前已经发现不止一种干细胞参与肝脏再生, 他们的来源与性状各不相同, 但是最终均可分化成为成熟的肝细

胞和/或胆管上皮细胞。

人们通常认为肝再生的细胞学机制涉及肝细胞、肝干细胞和骨髓干细胞等。其中肝干细胞包括卵圆细胞和小肝细胞<sup>[3]</sup>。卵圆细胞是肝脏中一种卵圆形的小的非实质细胞,位于胆管系统的最小分支处,鼠科动物的卵圆细胞沿较小的小叶间胆管和 Hering 管呈放射分布,并且延伸至界板之上,而在人类肝脏中,卵圆细胞沿毛细胆管和 Hering 管分布,可以扩展至最邻近的第三个小叶<sup>[4]</sup>,卵圆细胞在体外可克隆化生长,并且有分化为肝细胞、胆管上皮细胞、胰岛素分泌细胞和肠上皮细胞等的潜能<sup>[5]</sup>。小肝细胞的体积较小、形态类似肝细胞,位于汇管区周围,在体外具有很强的克隆扩增能力,可表达成熟肝细胞及胆管上皮细胞的一些标志。

正常组织更新中的肝脏再生是靠原位肝细胞自身的分裂来介导的<sup>[2]</sup>;在肝脏轻度受损如部分肝组织切除或轻度感染、物理化学损伤时,在多种生长因子和转录因子参与调控下,成熟肝细胞的生长激活,经过1-2次有丝分裂,或通过自身肥大的方式,使肝脏体积与功能得以恢复<sup>[6]</sup>;当肝脏损伤十分严重如大部分肝组织切除、严重肝坏死等,或者由于某种原因如肝毒性物质等的作用阻止肝细胞活化进入分裂周期时,肝细胞的再生则需要动员肝干细胞,激活肝干细胞如卵圆细胞并增生,进一步分化为肝细胞和胆管细胞,从而达到再生肝脏组织结构和功能的目的,且卵圆细胞的数量随肝脏受损伤严重程度的增加而增加<sup>[7]</sup>,在这一过程中,有肝外循环的造血干细胞进入门脉区域而后经卵圆细胞和胆管细胞进一步分化为肝细胞<sup>[8]</sup>。骨髓HSC也可能直接进入肝组织,并被肝组织的特殊微环境诱导分化为肝细胞。在某些特殊情况下,小肝细胞也动员和参与肝细胞再生,比如在肝组织切除2/3并用一种肝特异的长效DNA合成抑制剂-Retorsine抑制成熟肝细胞、肝卵圆细胞生长的情况下,发现小肝细胞在肝板内大量增生,且这类细胞不受Retorsine的生长抑制影响<sup>[9]</sup>。

因此,干细胞参与肝脏损伤的修复可能存在两种方式:一是肝脏内固有的干细胞参与修复;二是肝脏损伤动员骨髓释放HSC,后者通过血液循环到达肝脏,在特定的环境下增生、分化,最终转化成为肝细胞,以完成结构和功能的重建。

### 3 骨髓HSC与肝再生的联系及其在肝病治疗中的应用

最早研究骨髓HSC向肝细胞转分化的学者是Peterson。由于肝卵圆细胞表达HSC的标志物,如CD34、Thy-1、c-kit mRNA及其蛋白、flt-3受体mRNA等,因此Peterson *et al*<sup>[8]</sup>猜想卵圆细胞及其他肝细胞来源于骨髓或至少与骨髓有相关性,并用两个著名的实验来证明他的观点:(1)骨髓移植实验:将雄性大鼠的骨髓移植入经致死剂量放射线照射的雌性大鼠体内,将DPPIV<sup>+</sup>的雄性大鼠的骨髓移植入同系DPPIV<sup>-</sup>的♀大鼠体内,分别用Y染色体原位杂交和DPPIV组织化学染色方法

检测受体肝脏,结果发现,移植后第13 d分别有0.14%和0.16%肝细胞Y染色体及DPPIV<sup>+</sup>,提示有 $9.9 \times 10^5$ 和 $1.0 \times 10^6$ 个肝细胞源于移植骨髓细胞,二者的骨髓源性肝细胞在绝对数和比例上均十分接近;(2)肝移植与肝再生实验:将表达L21-6抗原的Lewis大鼠作为受体,不表达该抗原的同种异体Brown-Norway大鼠作为供体进行全肝移植,检测移植后肝脏中L21-6抗原的表达,结果肝外来源的L21-6<sup>+</sup>细胞可以在移植肝中找到。在实验前,均以CCl<sub>4</sub>和2-AAF诱导药物性肝损害,并阻断成熟肝细胞增生,从而诱导卵圆细胞的增生。经实验发现,部分再生的卵圆细胞及肝细胞来源于骨髓HSC。

Petersen的发现在其他学者的一些研究中被进一步证实。2000年Theise *et al*<sup>[10]</sup>在小鼠骨髓移植中发现,转化肝细胞主要源于CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>骨髓HSC。Lagasse *et al*<sup>[11]</sup>(2000年)用正常成年小鼠骨髓细胞移植治疗模型小鼠I型酪氨酸蛋白血症,观察模型小鼠的生长状况及其肝脏生化功能恢复情况,另一组仅用纯化的HSC(c-kit<sup>high</sup>Thy<sup>low</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>)进行移植,观察其疗效。结果发现,正是骨髓中的HSC在体内转分化为肝细胞,使小鼠产生供体源造血和肝细胞的再生,使受体小鼠肝脏的生化功能得以恢复。

为了研究HSC在肝脏病理生理状态下是否能在肝脏再生过程中起重要作用,也就是说,HSC是否能分化为肝细胞并且这种肝细胞能否扩增达到治疗意义,Mallet *et al*<sup>[12]</sup>利用转移人类Bcl-2基因小鼠模型进行了对比实验,并发现在生理情况下,小鼠骨髓HSC分化为肝细胞的频率低于1/10<sup>7</sup>,但在不断的肝细胞损伤的情况下,大约有不到1/100的骨髓来源干细胞分化为肝细胞,且这部分肝细胞可以扩增到肝细胞总数的80%,这一研究进一步为利用HSC治疗各种严重肝损害提供了可行性的实验依据。

动物实验的结论一致认为,在有或无严重肝脏损害的条件下,骨髓中的HSC均可以分化产生肝细胞/卵圆细胞,参与肝脏的再生,且此类细胞具有成熟肝细胞功能,甚至可以缓解先天遗传缺陷所致的肝脏代谢疾病<sup>[13]</sup>。那么,人类骨髓HSC是否也有此能力呢?

在临床研究中,有多例报道关于性别错配的骨髓移植与肝移植的检测结果,其中骨髓移植供体为男性受体为女性,肝移植则相反,结果所有患者肝组织均见Y染色体阳性肝细胞。实验表明,人和动物一样,在一定条件下,HSC能分化为肝细胞。

从动物实验到人体的病理标本研究均表明,骨髓HSC可以分化为肝细胞,但由于这些实验均为间接检测,受到诸多条件的制约,实验可能存在较大的误差,为了进一步证实这一可能性并进一步研究HSC定向分化为肝细胞的条件,Avital *et al*<sup>[14]</sup>通过两步磁式分离的方法从人和大鼠的骨髓中分离出β2m<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>的细胞,发现这种细胞能持续表达肝脏特异性基因和功能,从

大鼠门静脉注入这种细胞,发现这种细胞和肝板结合并分化成为成熟的肝细胞,用肝细胞生长因子 HGF 和淤胆血清进行体外培养(一种模拟肝再生的培养体系),可以扩增并分化为肝细胞,且这种细胞具有代谢  $\text{NH}_3$  等功能,免疫组化检测出他们表达白蛋白、c/EBP $\alpha$  等肝脏特异性表面标志.这些证据说明骨髓中的  $\beta 2\text{m}^+ \text{Thy-1}^+ \text{HSC}$  在体内外均可分化为具有肝细胞表型和功能的细胞. Jang *et al*<sup>[15]</sup>报道,把来自雄性小鼠的 HSC 与 CCL<sub>4</sub> 损伤的雌性小鼠的肝组织共培养,其中 HSC 置于培养盒的上层,损伤的肝组织置于培养盒的下层,上下层由一层孔径为 0.4  $\mu\text{m}$  的隔膜隔开,经性染色体原位杂交、RT-PCR 检测及免疫组化方法证实, HSC 可转化为肝细胞;把 HSC 移植给肝损伤的小鼠,观察到 HSC 转化为肝细胞的数量随肝脏受损伤严重程度的增加而增加.

2001 年 Theise *et al*<sup>[16]</sup>分离纯化非常原始且数量极少的 HSC 亚群,移植至小鼠体内,发现其可分化为十余种组织细胞. 2002 年, Korbiling *et al*<sup>[17]</sup>报道,在性别错配的骨髓移植患者的肝脏、皮肤、肠上皮等多种组织中均发现来源于供体的组织细胞.表明骨髓干细胞具有强大的多向分化潜能. Theise 认为, HSC 在体内的横向分化需要一个微环境,如分化为肝细胞则需要一个肝损伤与肝再生的微环境刺激,才会引起相应的干细胞应答.

总之,多项研究证实:骨髓中确实存在能分化为肝细胞的干细胞,直接将其移植到肝脏,在肝脏微环境调节下可分化为肝细胞;将骨髓干细胞作为肝细胞移植的细胞来源有重要的临床意义,从患者体内分离获取骨髓 HSC 比获取肝干细胞相对要容易得多<sup>[4]</sup>,而且具有免疫耐受性,不必进行免疫抑制.

#### 4 应用前景及存在的问题

目前的动物实验、人类骨髓移植和肝移植研究及干细胞体外培养结果均提示 HSC 是肝细胞来源之一,表明 HSC 可用于肝损伤的修复. HSC 的潜在应用范围有: (1)利用 HSC 在一定条件下能在体内分化为有功能肝细胞,用以治疗急/慢性肝衰竭; (2)通过体外扩增和诱导 HSC 分化为肝细胞,获得用于人工肝的肝细胞来源; (3)用修饰过基因的 HSC 进行移植,如先天性单基因缺损的疾病、糖尿病、高血压病、自身免疫病和恶性肿瘤的基因治疗都可以用 HSC 做宿主细胞,在患者体内长期表达所转导的治疗基因.然而,目前的研究仍存在许多问题: (1)虽已明确肝细胞的再生途径并非单一,但其具体途径仍不完全清楚; (2)HSC 向肝细胞分化的过程受到哪些体内外条件的调控,其分子机制有待进一步研究; (3)肝干细胞和骨髓 HSC 之间的关系如何,肝损伤一旦发生,二者如何协调进行增生和代偿; (4)既然大块或亚大块肝坏死时已有肝干细胞再生,为何常常未能

实现再生; (5)同样存在肝干细胞,为何会发生肝再生、纤维化或/和癌变等截然不同的转归; (6)肝损伤类型很多,不同因素所激发的肝再生中肝干细胞增生及演变的差异尚不清楚; (7)骨髓 HSC 用于肝细胞移植具有广阔的前景,但移植后细胞功能如何,是否达到完全意义上的转化尚需进一步研究.

如何促进干细胞向肝细胞完全意义上的转化,以便更有效改善病变肝组织的结构和功能将成为今后相关研究的重点,这具有不可估量的医学价值.

#### 5 参考文献

- 1 孙嫣,段芳龄.不同来源干细胞向肝系细胞转化的研究进展及应用前景. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003;12:1-4
- 2 裴雪涛.干细胞生物学.第1版.北京:科学出版社,2003:3-60
- 3 潘兴华,陈系古,庞荣清,靳杭红.肝干细胞与肝再生、肝癌的关系. *世界华人杂志* 2004;12:1925-1927
- 4 刘天会,贾继东,阎钟钰.肝脏干细胞研究进展与治疗前景. *临床和实验医学杂志* 2002;1:166-169
- 5 Vessey CJ, De la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001;33:130-141
- 6 闵军.肝干细胞的研究进展及其应用前景.广州:广东省人体生物组织工程 2003:81-91
- 7 Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* 1999;30:112-117
- 8 Peterson BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- 9 Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Temporal analysis of hepatocyte differentiation by small hepatocyte-like progenitor cells during liver regeneration in retrorsine-exposed rats. *Am J Pathol* 2000;157:771-786
- 10 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240
- 11 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
- 12 Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002;35:799-804
- 13 张旻,唐晓鹏,杨旭.造血干细胞-肝病治疗新希望. *国外医学·流行病学传染病学分册* 2003;30:91-93
- 14 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferraresso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetris AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164
- 15 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature Cell Biol* 2004;6:532-539
- 16 Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:367-377
- 17 Korbiling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;346:738-746

# 肠道分泌型 IgA 的成分及功能

刘冬妍, 刘 沛

刘冬妍, 刘沛, 中国医科大学附属第二医院传染科 辽宁省沈阳市 110004  
项目负责人: 刘沛, 110004, 辽宁省沈阳市三好街, 中国医科大学附属第二医院传染科. syliupeil2003@yahoo.com.cn  
电话: 83956962  
收稿日期: 2004-09-23 接受日期: 2004-11-12

## 摘要

分泌型IgA是肠道黏膜表面的第一道免疫防线, 主要由肠黏膜中的IgA浆细胞分泌, SIgA的分泌受神经、内分泌、和免疫系统的调节. SIgA能抑制肠道内的细菌黏附肠道黏膜表面, 中和肠道内的毒素、酶和病毒, 对肠道菌群中的G-杆菌具有特殊的亲和力, 对一些抗原物质具有封闭作用, 同时具有对嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒作用和ADCC作用. J链由浆细胞合成, 和SC是“锁和钥”的关系, 介导SC的转运和影响IgA在细胞内的装配. SC由上皮细胞产生, 参与SIgA形成和到固有层的运输, 并使SIgA对蛋白酶的敏感性下降, 增强了黏附作用及防御能力.

刘冬妍, 刘沛. 肠道分泌型 IgA 的成分及功能. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2845-2848  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2845.asp>

## 0 引言

消化道感染的发病率在感染性疾病中居第二位, 在感染过程中肠道黏膜的免疫屏障被破坏, 造成临床各种症状, 因此研究肠道黏膜的免疫屏障至关重要. 在肠道黏膜免疫中起重要作用的是分泌型IgA(secretory immunoglobulin A, SIgA), 他是肠道黏膜表面的第一道免疫防线, 抵抗各种内源及外源性病原体.

## 1 SIgA

**1.1 IgA 的组成和结构** 人类 IgA 由两个同种型, IgA1 和 IgA2. IgA1 是黏膜分泌物的成分之一, 对细菌性蛋白酶比较敏感, 受酶作用后活性下降; IgA2 主要存在于黏膜分泌物中, 对蛋白酶有较强的耐受性. 按照 IgA 的产生部位和体内分布的特点分成两型即血清型和分泌型(SIgA). 血清型主要由骨髓产生, 直接释放入血, 一般为 IgA 单体; 分泌型主要由黏膜产生, 然后转运到黏膜腔, 与 J 链和分泌片(secretory component, SC)即多聚免疫球蛋白受体(polymeric immunoglobulin receptor, PIgR)结合形成 SIgA, 主要是二聚体.

**1.2 IgA 的合成、转运及调节** 肠道 SIgA 主要由肠黏膜中的 IgA 浆细胞分泌, 浆细胞首先分泌出聚合 IgA, 然后在上皮细胞的嗜碱性一侧以共价键的形式与 SC 结

合, 继之被上皮细胞以内化的方式携入胞内形成吞饮小泡, 在小泡内被转运至上皮细胞的顶端, 并以 IgA-SC 复合物的形式经胞吐释放入黏膜腔.

SIgA 浆细胞在黏膜淋巴滤泡中发育, 都沿上皮层分布, 弥散定居于黏膜下层各位点. 通常 IgM<sup>+</sup>B 细胞遭遇抗原刺激或 / 和在开关 T 细胞调节下, 可分化为 IgA<sup>+</sup>B 细胞. 有两种 T 细胞影响 B 细胞的发育成熟: 一种 T 细胞诱导 SIgM<sup>+</sup>B 细胞转换为 SIgA<sup>+</sup>B 细胞, 通过释放转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )和 IL-4 起作用, TGF- $\beta$  是重要的 IgA 转化生长因子, 是比其他因子更加活跃的 IgA 诱导因子<sup>[1]</sup>; 另一种 T 细胞促进 SIgA<sup>+</sup>B 细胞发育成熟为产生抗体的浆细胞, 主要通过产生 IL-5 和 IL-6 发挥作用, IL-6 能加强人类 IgA 的产生, 对小鼠 B 细胞的成熟起重要作用<sup>[2]</sup>. 这两种 T 细胞主要是 TH<sub>2</sub> 细胞, 直接促进 SIgA<sup>+</sup> 浆细胞分泌 IgA.

肠黏膜 SIgA 免疫系统受神经、内分泌和免疫系统的调节, 肠道黏膜神经内分泌系统主要包括血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)、P 物质(substance P, SP)、生长抑素(somatostatin, SS)和细胞因子. 其中 VIP 和 SS 抑制 SIgA 合成, SP 促进 Ig 的合成. 细胞因子中 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  对 IgA 的分泌有下调作用, IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 对 IgA 的分泌有增强和诱导作用, 分泌这些因子的细胞主要存在于固有层内, 与 IgA 浆细胞有着密切的空间关系. 近期研究<sup>[3]</sup>发现, 在黏膜组织内 IL-15 是 SIgM<sup>+</sup>SIgA<sup>-</sup> 和 SIgM<sup>-</sup>SIgA<sup>+</sup>B-1 细胞转化为产生 IgA 细胞的重要因子, IL-15 同 IL-5 一样在调节 B-1 细胞分化成产生 IgA 浆细胞过程中起重要作用, 他是调节 IgA 反应的重要细胞因子.

**1.3 SIgA 功能** 当肠黏膜受到不同程度的侵袭时, 黏膜便产生大量的 SIgA, 以抵抗各种病原体的入侵. 其功能如下: SIgA 可抑制肠道内的细菌黏附肠道黏膜表面. SIgA 在黏膜表面是通过黏膜内蠕动和绒毛清除来阻止黏膜与病原体的接触<sup>[4]</sup>, SIgA 直接阻止或在空间上干涉微生物与介导上皮黏附的蛋白接触, 甚至在上皮细胞泡状间隙内阻止入侵的病原体<sup>[5-7]</sup>. 他还可中和肠道内的毒素、酶和病毒, 并结合抗原形成免疫复合物由吞噬细胞吞噬清除, 使已被肠道酶类改变的病原体毒力降低. SIgA 中和的毒素不仅有病原体产生的毒素, 还有饮食中的植物毒素, 最近文献[8]报道, 人类的 SIgA H 链和 SC 能与蓖麻子蛋白相连, 抑制蓖麻子蛋白黏附于十二指肠固有层. 我们认为, SIgA 是蓖麻子蛋白的受体, 减少了毒素与上皮细胞表面的糖脂和糖蛋白的接触.

SIgA 能抑制病毒的装配和在细胞间的释放,对减少病毒在黏膜的转换起重要作用<sup>[9-10]</sup>,尤其对肠道菌群中的 G<sup>-</sup> 杆菌具有特殊的亲和力,能包被细菌,封闭细菌与肠上皮细胞结合的特异部位,阻止其与肠上皮细胞的黏附,避免细菌穿透肠上皮发生移位,是阻止细菌移位的重要环节.用糖皮质激素、胃肠外营养等干扰 SIgA 的合成过程,发现 SIgA 减少而导致肠道免疫功能的降低,可引起肠道菌群失调、消化吸收障碍,肠道细菌易位而发生肠源性全身感染.由于 SIgA 不能捕捉补体诱发炎症反应,并且主要是抑制细菌或病毒黏附在上皮表面,因此被认为是良性的抗体<sup>[11-12]</sup>.但 Maaser *et al*<sup>[13]</sup>研究侵袭性枸橼酸菌(一种鼠类致病菌类似于人类的大肠杆菌)发现,仅仅 B 细胞在抵抗此菌中起作用而 SIgA 在此过程中不起作用.至于是否 SIgA 对一些细菌具有选择性抵抗作用还有待探讨.最近研究<sup>[14]</sup>证明,被 Peyer's Patch 内 M 细胞转运的 SIgA 进入黏膜对维持黏膜表面的稳定性是必要的,因此认为 SIgA 是维持肠道屏障的重要调节因子.有学者<sup>[15]</sup>用缺乏聚合免疫球蛋白受体(PIgR<sup>-/-</sup>)鼠做实验,发现 SIgA 参与维持肠道黏膜的稳定性,SIgA 此调节作用在因 IgA 缺陷的人类自身免疫性疾病和炎症条件下已推断出来<sup>[16-18]</sup>.还有研究证实,在 IgA<sup>-/-</sup>鼠<sup>[19]</sup>、J 链<sup>-/-</sup>鼠<sup>[20]</sup>、PIgR<sup>-/-</sup>鼠<sup>[21]</sup>仅产生单体 IgA,因此不能形成 SIgA.近期研究<sup>[22]</sup>显示上呼吸道抗鼻腔病毒感染的交叉保护与特异型病毒 IgA 有关,说明 SIgA 是一种抗病毒感染交叉保护的重要调节分子,PIgR<sup>-/-</sup>小鼠诱导的交叉保护也证明了此论点<sup>[20]</sup>.Slivey *et al*<sup>[23]</sup>研究 SIgA 对保护 Payer's 结抗病毒入侵中发现,肠道 SIgA 是一个至关重要的免疫保护组成部分,对阻止呼肠病毒侵袭起关键作用.SIgA 还有明显的对嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒作用<sup>[24]</sup>.SIgA 对由食物摄入或空气吸入的一些抗原物质具有封闭作用,使这些抗原游离于分泌物,便于排除,或使抗原物质限于黏膜表面,不进入机体,使超敏反应不能发生.小肠淋巴细胞表达 IgA 的 Fc 受体(FcR),因此 SIgA 具有抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)作用.

## 2 SIgA 的 J 链

在分泌型免疫中 J 链起了重要作用,他是被两种 Ig 即 IgA 和 IgM 分享的 15 kd 的肽,由浆细胞合成.J 链有 8 个半胱氨酸残基,两个 Cys14 和 Cys68、Cys495、Cys575、Cys414、Cys337、Cys309 各一个,他们形成二硫化物相互或与 IgA 相连接,Cys414 和 Cys309 可形成二硫化物连接到 PIgR.有学者认为 J 链和 SC 是“锁和钥”的关系<sup>[26]</sup>,大量研究证明此观点是成立的<sup>[27-29]</sup>,并且 PIg 与 SC/PIgR 结合位点能被 J 链抗体及他的部分片段 F(ab')<sub>2</sub> 和 Fab' 阻断<sup>[27-28]</sup>.用 J 链<sup>-/-</sup>鼠实验<sup>[28]</sup>发现 PIgA 不能与 SC 结合,也不能被表达 SC 的上皮细胞有效转运,这说明 J 链参与了 SC 介导的转运.J 链来源于固有的免疫系统,他在 PIgA 非共价结合 SC 中至关重

要<sup>[26]</sup>,这已在 J 链<sup>-/-</sup>鼠<sup>[30]</sup>和转基因细胞表达 Ig、J 链和 PIgR/SC 基因实验中证实<sup>[29,31]</sup>.J 链不仅是 SC 结合 IgA 必要组成部分,而且还在通过调节 IgA 结构而影响 IgA 在细胞内装配中起重要作用.在分泌型免疫中 J 链的重要角色与一个重要的事实相符合,即在分泌效应位置进行晚期分泌的 B 细胞表达大量的 J 链,因此认为黏膜 B 细胞与分泌上皮之间在机体发育过程中存在复杂关系.通常情况下 J 链表达与 IgA 无关,而与 IgG 和 IgD 有关.目前在微环境中如何诱导 J 链的表达了解较少,还有待进一步探讨.

## 3 SIgA 的分泌片即多聚免疫球蛋白受体

SC 是上皮细胞产生的分子质量约 95 ku 的蛋白分子,属于免疫球蛋白超家族.SC 与 PIgA 特别是二聚体 IgA 相结合,成为 IgA 聚合体的转运受体,是 SIgA 的重要组成部分.正是 SC 的存在,使 SIgA 对蛋白酶的敏感性下降,黏液更黏稠,增强了黏附作用及防御能力.

正常情况下,多聚 IgA 与 SC 在分泌上皮细胞的基底外侧形成 PIg-PIgR 复合物,然后通过内吞作用和转运作用被运输到固有层,此后 SIgA 在表面顶端通过 PIgR 分裂释放出来,仅有 C 端的跨膜部分和受体的细胞质部分在上皮细胞内降解,每天大量 PIgA 通过此过程转运到固有层,形成 SIgA.在运输过程中,80 ku 的 PIgR 的细胞外部分与分泌性抗体结合成为固定 SC,即我们经常所指的 SC,可抵抗蛋白酶的降解;而没有与分泌性抗体结合的 SC 即称为游离 SC,与固定 SC 相似,亦为 80 ku 的蛋白,常存在于外分泌区,对内部黏膜防御有重要作用,具有抗炎症和抗感染的特征.

上皮的 SC 通过介导激活和选择运输连接 J 链的多聚 IgA 起作用,他是分泌性免疫系统的重要因子.SC 的功能现已明了<sup>[32]</sup>:即参与 SIgA 形成和到固有层的运输.在 SC<sup>-/-</sup>鼠没有多聚 IgA 的选择性上皮运输<sup>[21]</sup>,完全没有分泌性免疫功能.此外有研究<sup>[33-34]</sup>显示游离 SC 能阻止上皮与大肠杆菌和梭状芽孢杆菌的毒物相黏附,De Araujo *et al*<sup>[35]</sup>研究大肠杆菌引起腹泻的婴儿发现,游离 SC 是抗大肠杆菌的重要非特异性防御因素.还有研究<sup>[36]</sup>证实,肺炎球菌的表面蛋白能直接与游离和固定 SC 作用.在黏膜表面的感染中 SC 增强了 SIgA 的最佳保护作用,此作用是通过保护 Ab 分子的氨基酸残基起作用<sup>[37]</sup>.由于嗜酸性粒细胞不仅有 Fc $\alpha$  受体 I (Fc $\alpha$ R I) 而且有 SC 的受体<sup>[38]</sup>,所以 SIgA 和 SC 可激活人类的嗜酸性粒细胞.用 SIgA 刺激的嗜酸性粒细胞脱颗粒和过氧化物的产生要比用血 IgA 刺激更明显,但是对中性粒细胞无此作用.SC 能加强各种细胞因子如 IL-5、GM-CSF 对嗜酸细胞的刺激产生过氧化物,而对中性粒细胞没有作用<sup>[24]</sup>,但在没有细胞因子存在时却对嗜酸性细胞没有作用,这说明在嗜酸性粒细胞中,SC 与细胞因子共同作用产生效应.固有分子特别是  $\beta_2$  整合素在嗜酸性粒细胞被细胞因子激活中起重要作用<sup>[24]</sup>,用 CD18mAb 阻断 SIgA



和SC刺激嗜酸性粒细胞过氧化物的产生, 这更证明 $\beta_2$ 整合素参与此反应. 一个可能的原因是SC特异地刺激了嗜酸性粒细胞 $\beta_2$ 整合素的亲和性, 另一个可能原因是SC是 $\beta_2$ 整合素的一个配体, 因为SC含有五个免疫球蛋白类似区域, 此结构被普遍认为是细胞表面受体和黏附分子. 已有学者证明<sup>[39]</sup>SIgA和SC在黏膜嗜酸性粒细胞增多和过敏性疾病中起重要作用.

人类的PIgR甚至在胎儿时就持续地表达, 在发育过程中被不同的细胞因子自发地上调, 如IFN- $\gamma$ 和IL-4<sup>[40]</sup>. 在HT-29的腺癌细胞内炎症性因子TNF- $\alpha$ 和IL-1可加强SC的表达<sup>[41-42]</sup>, 特别是IFN- $\gamma$ 和丁酸盐结合时此作用更明显, 但是IL-4与丁酸盐一齐刺激时此作用却相对减缓<sup>[41]</sup>.

作为肠道免疫的重要组成部分, SIgA的特性及功能已被了解, 但还有许多问题有待探讨, 如SIgA与游离SC的平衡关系等. 随着对SIgA研究的深入, 这些问题将得到解决.

#### 4 参考文献

- Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, Schafer A, Casali P. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF- $\beta$ : evidence for TGF- $\beta$  but not IL-10 dependent direct  $\Sigma\mu$ - $\Sigma\alpha$  and sequential  $\Sigma\mu$ - $\Sigma\gamma$ ,  $\Sigma\gamma$ - $\Sigma\alpha$  DNA recombination. *J Immunol* 1998;161:5217-5225
- Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS* 1995;103:1-19
- Hiroi T, Yanagita M, Ohta N, Sakaue G, Kiyono H. IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses. *J Immunol* 2000;165:4329-4337
- Lamm ME. Interactions of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:311-340
- 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
- Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 1996;272:104-107
- Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6901-6905
- Mantis NJ, Farrant SA, Mehta S. Oligosaccharide side chains on human secretory IgA serve as receptors for ricin. *J Immunol* 2004;172:6838-6845
- Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today* 1993;14:430-435
- Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 1997;3:42-47
- Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 2001;3:1021-1035
- Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol* 2001;21:303-309
- Maaser C, Housley MP, Iimura M, Smith JR, Vallance BA, Finlay BB, Schreiber JR, Varki NM, Kagnoff MF, Eckmann L. Clearance of citrobacter rodentium requires B cells but not secretory immunoglobulin A (IgA) or IgM antibodies. *Infect Immun* 2004;72:3315-3324
- Rey J, Garin N, Spertini F, Cortes B. Targeting of secretory IgA to Peyer's Patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *J Immunol* 2004;172:3026-3033
- Uren TK, Johansen FE, Wijburg OL, Koentgen F, Brandtzaeg P, Strugnell RA. Role of the polymeric Ig receptor in mucosal B cell homeostasis. *J Immunol* 2003;170:2531-2539
- Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in celiac disease: an Italian multicentre study. *Gut* 1998;42:362-365
- Meini A, Pillan NM, Villanacci V, Monafò V, Ugazio AG, Plebani A. Prevalence and diagnosis of celiac disease in IgA-deficient children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:333-336
- Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 2000;120:225-231
- Harriman GR, Bogue M, Rogers P, Finegold M, Pacheco S, Bradley A, Zhang Y, Mbawuike IN. Targeted deletion of the IgA constant region in mice leads to IgA deficiency with alterations in expression of other Ig isotypes. *J Immunol* 1999;162:2521-2529
- Lycke N, Erlandsson L, Ekman L, Schon K, Leanderson T. Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J Immunol* 1999;163:913-919
- Johansen FE, Pekna M, Norderhaug IN, Haneberg B, Hietala MA, Krajci P, Betsholtz C, Brandtzaeg P. Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. *J Exp Med* 1999;190:915-922
- Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol* 2002;168:2930-2938
- Silvey KJ, Hutchings AB, Vajdy M, Petzke MM, Neutra MR. Role of immunoglobulin A in protection against reovirus entry into murine Peyer's patches. *J Virol* 2001;75:10870-10879
- Motegi Y, Kita H. Interaction with secretory component stimulates effector functions of human eosinophils but not of neutrophils. *J Immunol* 1998;161:4340-4346
- Sorensen V, Rasmussen IB, Sundvold V, Michaelsen TE, Sandlie I. Structural requirements for incorporation of J chain into human IgM and IgA. *Int Immunol* 2000;12:19-27
- Brandtzaeg P, Prydz H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature* 1984;311:71-73
- Vaerman JP, Langendries AE, Giffroy DA, Kaetzel CS, Fiani CM, Moro I, Brandtzaeg P, Kobayashi K. Antibody against the human J chain inhibits polymeric Ig receptor-mediated biliary and epithelial transport of human polymeric IgA. *Eur J Immunol* 1998;28:171-182
- Vaerman JP, Langendries A, Giffroy D, Brandtzaeg P, Kobayashi K. Lack of SC/PiGR-mediated epithelial transport of a human polymeric IgA devoid of J chain: in vitro and in vivo studies. *Immunology* 1998;95:90-96
- Johansen FE, Natvig Norderhaug I, Roe M, Sandlie I, Brandtzaeg P. Recombinant expression of polymeric IgA: incorporation of J chain and secretory component of human origin. *Eur J Immunol* 1999;29:1701-1708
- Hendrickson BA, Rindisbacher L, Cortes B, Kendall D, Waltz DA, Neutra MR, Seidman JG. Lack of association of secretory component with IgA in J chain-deficient mice. *J Immunol* 1996;157:750-754
- Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 1995;268:716-719
- Norderhaug IN, Johansen FE, Schjerven H, Brandtzaeg P. Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit Rev Immunol* 1999;19:481-508



- 33 Giugliano LG, Ribeiro ST, Vainstein MH, Ulhoa CJ. Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1995;42:3-9
- 34 Dallas SD, Rolfe RD. Binding of *Clostridium difficile* toxin A to human milk secretory component. *J Med Microbiol* 1998;47:879-888
- 35 De Araujo AN, Giugliano LG. Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. *BMC Microbiol* 2001;1:25
- 36 Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 1997;25:1113-1124
- 37 Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthesy B. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity* 2002;17:107-115
- 38 Lamkhioed B, Gounni AS, Gruart V, Pierce A, Capron A, Capron M. Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *Eur J Immunol* 1995;25:117-125
- 39 Motegi Y, Kita H, Kato M, Morikawa A. Role of secretory IgA, secretory component, and eosinophils in mucosal inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122(Suppl1):25-27
- 40 Denning GM. IL-4 and IFN- $\gamma$  synergistically increase total polymeric IgA receptor levels in human intestinal epithelial cells. Role of protein tyrosine kinases. *J Immunol* 1996;156:4807-4814
- 41 Kvale D, Brandtzaeg P. Constitutive and cytokine induced expression of HLA molecules, secretory component, and intercellular adhesion molecule-1 is modulated by butyrate in the colonic epithelial cell line HT-29. *Gut* 1995;36:737-742
- 42 Hayashi M, Takenouchi N, Asano M, Kato M, Tsurumachi T, Saito T, Moro I. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) in a human intestinal epithelial cell line is up-regulated by interleukin-1. *Immunology* 1997;92:220-225

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

• 消息 •

### *World Journal of Gastroenterology* 影响因子

影响因子是国际通行的期刊评价指标之一, 是反映期刊重要性的宏观定量指标. 通常影响因子越大, 期刊的学术影响力和作用也越大. 总被引频次是指期刊自创刊以来所刊登的全部论文在统计当年被引用的总次数, 是一个非常客观实际的评价指标, 可以显示该刊被使用和重视的程度, 以及在科学交流中的作用和地位. 美国科学信息研究所(ISI)出版的期刊引证报告(JCR): 《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》2002 年影响因子为 2.532, 被引频次为 1 535. WJG 2002 年影响因子在国际胃肠病学和肝病学领域的 45 种期刊中排名第 13 位, 在 SCI 收录的所有 5876 种国际科学期刊中排名第 797 位. WJG 2001 年影响因子 1.445, 被引频次为 722; WJG 2000 年影响因子 0.993, 被引频次 327 次. 1998 年以来发表的全文电子版(ASP, PDF) 已与 PubMed 中的文摘进行了链接, 全世界的读者在利用 PubMed 检索时即可免费阅读到 WJG 发表的全文, 使本刊作者发表的论文在全球得到及时广泛的传播, 期刊的影响因子逐年上升, 国际影响逐年扩大.

### *World Journal of Gastroenterology* 国际检索系统收录

ISI 编制出版的《科学引文索引》(Science Citation Index®-Expanded, SCI-E)是一种大型的综合性检索工具, 收录世界上 5876 多种权威科技期刊. 它具有严格的选刊标准, 是国际公认的进行科学统计与科学评价的主要工具, 是衡量期刊质量和论文学术水平的重要依据. 由于 SCI-E 特有的著者与著者、文献与文献之间的引用与被引用关系, 使之成为目前国际上最具权威性的科研成果评价体系. 一个国家或地区的科技期刊和论文被 SCI-E 收录和引用的多少, 被认为是评价该国或该地区科学研究水平高低的标志之一. 1998 年以来《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》先后被美国《科学引文索引》(SCI-E, Research Alert®, Current Contents/Clinical Medicine®, Journal Citation Reports®, Clinical Medicine Citation Index®), 美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE), 美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA), 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM), 俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journals, AJ) 收录.

# 中药干预肝纤维化的分子机制

吴晓玲, 曾维政, 王丕龙

吴晓玲, 王丕龙, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市 400016  
曾维政, 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083  
项目负责人: 曾维政, 610083, 四川省成都市, 成都军区总医院消化内科.  
zengweizheng@163.com  
电话: 028-83577558  
收稿日期: 2004-10-21 接受日期: 2004-11-04

## 摘要

肝纤维化(hepatic fibrosis)的防治研究是国内外的热点和重点课题, 主要的研究方向有细胞因子、小分子物质、基因干预、信号转导调节剂、中医中药等, 而中药抗肝纤维化研究是我国的特色和优势. 近年来报道的很多单方、复方中药在细胞、动物及临床实验中都观察到一定的抗肝纤维化疗效, 有些中药制剂的研究已深入到分子水平进行了较详尽的抗肝纤维化机制探讨, 取得了初步令人满意的结果. 本文综述中药抗肝纤维化的分子机制研究进展.

吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. 中药干预肝纤维化的分子机制. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2849-2852  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2849.asp>

## 0 引言

肝纤维化是一种可逆性的病变, 及时地干预肝纤维化的病程能够减少肝硬化及其致命并发症的发生. 中药防治肝纤维化的研究在我国取得了比较满意的结果, 近年有关中药防治肝纤维化的研究报道颇多<sup>[1-19]</sup>, 其中不少研究深入到分子水平作用机制的探讨<sup>[20-21]</sup>, 通过中药制剂作用于肝纤维化的一个或多个发病环节, 达到抑制肝纤维化的目的.

## 1 对肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的影响

1.1 抑制 HSC 活化、增生并减少胶原合成 HSC 在肝纤维化发病中具有关键地位<sup>[22-23]</sup>. 当肝脏受到致病因子攻击, HSC 被激活而大量增生, 细胞内脂滴减少, 内质网增多, 转变成肌样成纤维细胞(myofibroblast, MFB), 最后成为成纤维细胞, 合成过量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积于肝脏. 因此, 抑制 HSC 的活化和增生对肝纤维化防治具有举足轻重的意义<sup>[24-26]</sup>.

氧化苦参碱(苦参素, Oxymatrine)是苦参及其同属植物苦豆子等的主要有效成分, 具有保护肝细胞、抗乙肝病毒、调节免疫等多种功效. 卢清 *et al*<sup>[27]</sup>以氧化苦参碱干预体外培养的大鼠急性肝损伤 Kupffer 细胞, 收集其培养液添加于 HSC 培养体系中, 结果显示损伤肝脏的 Kupffer 细胞培养液能促进 HSC 增生, 而氧化苦

参碱干预处理的培养液则可通过旁分泌途径抑制 HSC 的活化与增生. 沈镭 *et al*<sup>[28]</sup>将氧化苦参碱给予四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠, 结果大鼠肝脏胶原沉积减少, 其机制与氧化苦参碱抑制 HSC 增生有关. 焦建中 *et al*<sup>[29]</sup>进行的临床实验显示苦参碱具有良好的保护肝细胞、减轻肝纤维化作用, 其机制可能与抑制 HSC 活化, 促进氧自由基清除等有关. 小柴胡汤(Sho-saiko-to)<sup>[30-31]</sup>是我国传统药方, 日本学者将其应用于慢性肝病的临床防治, 并对其进行了大量的组织、细胞及分子水平研究, 发现其有效的抗肝纤维化成分主要是黄芩甙(baicalin)和黄芩甙元(baicalein), 具有保护肝细胞, 抑制 HSC 活化、增生作用, 可能是通过激活 HSC 的 MAPK 信号转导通路, 使 HSC 增加 MMP-2、减少 TIMP-1 基因表达实现的. 此外, 甘草提取物<sup>[32]</sup>、抗纤复方<sup>[33-34]</sup>、复方 861<sup>[35]</sup>、丹参及其单体<sup>[36-39]</sup>、抗纤软肝颗粒<sup>[40]</sup>等也都具有抑制 HSC 增生、活化及其胶原基因表达的作用.

1.2 对 HSC 凋亡的影响 细胞凋亡是机体维持自身稳定的一种基本的生理机制. 细胞凋亡主要通过死亡受体介导和线粒体介导两种途径进行, 受体介导的死亡信号转导通路主要有 Fas-FasL 系统, TRAIL-DRs 系统和 TNF $\alpha$ -TNFR1 系统; NF $\kappa$ B 分子即位于 TNF $\alpha$ -TNFR1 系统的下游途径, 由 TNF $\alpha$  结合 TNFR1 后经 TRADD (TNFR1-associated protein with DD)传递凋亡信号至胞内, 释放出活性的 NF $\kappa$ B, 并串联多种下游接头分子进入多条凋亡途径.

在急性肝损伤的早期, HSC 活化、增生, 但未见凋亡现象; 至修复期则 HSC 凋亡增加, 肝脏内 HSC 的总数减少. 因此, 凋亡是机体终止活化 HSC 增生的重要机制. 活化的 HSC 可表达 Fas 和 FasL, 而抗凋亡基因 *bcl-2* 和 *bcl-X* 的表达则明显减少, 转化为 MFB 后对 FasL 诱导的凋亡敏感性增加; 另外, HSC 还可表达神经生长因子受体(p75), 该受体是 TNFR 超家族成员, 与死亡域相连, 可诱发细胞凋亡. 肝损伤时 HSC 表达 Fas 和 p75 两种受体与凋亡有关. 对四氯化碳中毒性肝纤维化大鼠的研究表明, 在肝纤维化病变的自发消退过程中, 活化 HSC 的数目减少了 12 倍, 且大量 HSC 凋亡, 因而合成胶原的细胞数量减少, 进而肝纤维化逆转. 因此, MFB 和活化的 HSC 的凋亡可能是机体肝纤维化病变自发逆转的一个机制<sup>[41]</sup>. 研究显示, 复方 861 能够诱导活化 HSC 凋亡, 临床治疗病例肝穿刺标本也可见治疗后 HSC 凋亡明显增加, 可能与中药制剂抑制 NF $\kappa$ B 的作用有关, 诱导活化的 HSC 凋亡可能是中药抗肝纤维化的

一个有效途径。

**1.3 对 iNOS 表达及 NO 合成的影响** 一氧化氮(nitric oxide, NO)是由 NO 合酶(NOS)催化 L-精氨酸生成. NOS 包括三种同工酶:即神经型(cNOS)、内皮型(eNOS)与诱导型(iNOS), iNOS 由内毒素及某些细胞因子诱导产生. NO 与肝硬化时外周动脉扩张、高动力循环状态有关. 肝硬化患者体内 eNOS 和 iNOS 活性均明显增高, 呼出气体中 NO 浓度增加, 证实 NO 的增加参与了肝硬化门脉高压高动力循环的产生. 用猪血清攻击注射复制大鼠肝纤维化, 给予复方中药汉丹肝乐干预性治疗能显著降低大鼠血清 NO 含量, 降低肝脏和食管下段 NOS 的活性, 说明汉丹肝乐防治大鼠免疫性肝纤维化的作用机制可能与抑制 NOS 的活性、减少 NO 合成有关<sup>[42]</sup>.

## 2 干扰肝纤维化的主要信号转导通路

TGF $\beta$ -Smad 是肝纤维化时主要的信号转导通路<sup>[43-48]</sup>. Smad 分子为与线虫 Sma 和果蝇 Mad 蛋白同源的蛋白家族, 可将来自 TGF $\beta$  的信号由胞膜受体传导入胞核内, 调节核内靶基因的转录从而发挥 TGF $\beta$  的生物效应. TGF $\beta$ -Smad 信号通路中 Smads 分子之间精密协调, 共同完成生理及病理状态下 TGF $\beta$  的生物学效应<sup>[49-56]</sup>. 因此, 干扰 TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路可能是抗肝纤维化的重要途径<sup>[57-60]</sup>.

同济医院肝病研究所<sup>[61]</sup>采用活血软坚方的成药制剂—和络舒肝含药血清作用于培养的肝星状细胞 HSC-T6 细胞株, 以 RT-PCR 法检测 Smad3、Smad7 和前胶原  $\alpha 2$  I 基因表达的变化, 结果和络舒肝含药血清可下调 HSC-T6 细胞株 Smad3、前胶原  $\alpha 2$  I mRNA 表达以及 Smad3 蛋白表达水平, 前胶原  $\alpha 2$  I mRNA 表达水平呈现血药浓度依赖性变化, 且  $\alpha 2$  I 表达水平的变化与 Smad3 蛋白表达的改变趋势一致. 表明活血软坚方和络舒肝的抗肝纤维化作用可能是通过非特异性地作用于 TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路, 干扰关键的 Smad 信息分子的基因表达, 抑制前胶原  $\alpha 2$  I mRNA 转录, 从而减少胶原的生成.

## 3 对基质金属蛋白酶的影响

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是降解 ECM 的主要酶类, 现已发现 20 种, 分别降解不同的基质成分. 肝纤维化时胶原酶的变化规律及其调控机制尚未完全明确. 研究揭示肝损伤时产生过多的 TGF $\beta 1$  可抑制间质性胶原酶的表达及活性, 胶原降解减少而大量沉积<sup>[62]</sup>. 日本的研究表明, 四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化早期有 MMP-13 mRNA 轻度升高, 肝硬化形成后其表达明显降低, 肝硬化病变发生自发逆转时则 MMP-13 mRNA 水平又增高. 因此, MMP 表达降低可能与肝纤维化进展有关, 其表达增高则可能使肝纤维化进程缓解或者逆转; 调节 MMP/TIMP 表达水平可能达到抑制肝纤维化的目的<sup>[63]</sup>.

武汉大学人民医院<sup>[64]</sup>采用 0.2 mg/kg 浓度的银杏叶提取物(Ginkgo biloba extract, Gb E)给四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠每日灌胃处理, 以 RT-PCR 法检测表明 Gb E 能促进 MMP1 基因表达, 抑制 TIMP-1 mRNA 表达, 同时, 大鼠肝组织 TGF $\beta 1$  mRNA 表达水平下降, 胶原合成、沉积减少, 肝纤维化缓解.

## 4 对基质金属蛋白酶组织抑制物的影响

基质金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)是激活状态的 MMP 主要的抑制因子, 现已发现 4 种, 每种 TIMP 都可与所有种类 MMP 的催化部位直接结合而抑制其活性. 肝纤维化过程中可见 TIMP-1 mRNA 表达持续上调, 其血清水平与肝纤维化程度具有较高的相关性, 反映肝脏 ECM 降解活性低下, 胶原降解明显抑制<sup>[65]</sup>. 如果能够通过药物抑制 TIMP-1 mRNA 表达, 则不失为一个良好的抗肝纤维化途径.

目前报道的许多中药都具有抑制 TIMP-1 基因表达的作用, 例如氧化苦参碱<sup>[66]</sup>、复方 861<sup>[67]</sup>、软肝缩脾丸等. 将复方中药双甲五灵冲剂<sup>[68]</sup>以灌胃法作用于四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠, 原位杂交和免疫组化方法测定显示肝纤维化模型大鼠肝组织 TIMP-1、TIMP-2 mRNA 及蛋白水平均明显高于治疗组, 表明肝纤维化的形成伴有 TIMP-1、TIMP-2 基因表达的明显增高; 而双甲五灵干预治疗则能有效地降低其表达水平, 使活性 MMP 明显增加, 发挥降解 ECM 的作用, 且该作用优于秋水仙碱对照组. 这些研究表明, 通过抑制 TIMP 的基因表达从而减弱其对 MMPs 的抑制, 进而促进胶原蛋白的降解, 可能是中药治疗肝纤维化的又一个重要分子机制.

## 5 对关键细胞因子的影响

肝纤维化是一个有众多细胞因子参与的复杂的全身性病理过程<sup>[69]</sup>. 这些细胞因子根据其生物效应分为两大类: 促纤维化因子和抗纤维化因子. 前者主要有 TGF- $\beta 1$ 、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、内皮素-1(endothelins-1, ET-1)等, 后者主要有 IL-10 等. 调节细胞因子的含量或其活性能够在细胞水平干预肝纤维化的进展, 其途径包括使用受体阻滞剂或细胞因子抗体; 阻止细胞因子的产生或抑制其活性; 使用特定的抗纤维化细胞因子以促进 ECM 降解吸收等. 其中, TGF- $\beta 1$  是主要的促纤维化因子,

因此, 减少 TGF- $\beta 1$  的基因表达水平及其产量或抑制其活性, 可能拮抗肝纤维化进程. 复方红景天是以红景天、苦参等药为主的复方中药制剂, 给予四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠口服复方红景天颗粒进行干预性治疗, 则大鼠肝组织 TGF- $\beta 1$  mRNA、胶原  $\alpha 1$  I mRNA 表达水平明显降低, 肝组织病理学变化改善显著, 提示复方红景天可能通过抑制 TGF- $\beta 1$ 、 $\alpha 1$  I mRNA 的表达而减少胶原合成等机制干预大鼠肝纤维化<sup>[70]</sup>. 还有芪

术颗粒、虫草多糖、抗纤软肝冲剂等中药,都能够不同程度地抑制 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达,减少其生物合成,从而有效地控制肝纤维化。另外,肝细胞生长因子(hepatic growth factor, HGF)具有促进肝细胞增生的作用,能够抑制纤维增生和肝细胞凋亡,有利于肝纤维化时肝脏病变的修复,有些中药可能通过提高 HGF 的基因表达发挥抗肝纤维化作用。

除此之外,还有丹参通过抑制线粒体脂质过氧化而抗肝纤维化,复方利肝冲剂通过抑制 HSC 的 NF- $\kappa$ B 活性从而阻止 HSC 的活化,以及虫草菌丝促进肝细胞增生从而延缓大鼠肝纤维化进程等报道,为深入研究中药制剂的抗肝纤维化分子机制提供了新的方向。

总之,中药抗肝纤维化的研究在我国方兴未艾,近年正逐步摆脱原有的局限于简单临床观察和粗糙动物实验的局面,越来越多的中药进行了比较深入细致的分子水平研究<sup>[71]</sup>,为更好地开发中药宝库防治慢性肝病向肝纤维化进展提供了光明的前景。中药抗肝纤维化的分子机制总结起来主要是促进或抑制某些关键基因的表达;或者在蛋白质水平对关键的酶分子、细胞因子进行修饰,改变其生物活性,抑制肝纤维化病变的种种异常生物效应,延缓或阻止肝纤维化的发生发展。但是,中药成分往往复杂多变,同一种药物其主要成分具有地域、品系差别,复方中药制剂的成分就更加复杂,在整体实验中往往是多种药物作用的共同结果,其配方中有起协同作用的成分,也可能相互拮抗、减弱生物效应,肝纤维化防治研究中发挥主要的抗肝纤维化作用的究竟是哪种成分、作用于机体的哪个靶点,都有待进一步研究阐明。某些中药制剂虽然具有明显的抗纤维化作用,但其发挥作用的靶器官往往不限于肝脏,对其他组织也可能有不良影响,长期应用于动物安全性未定。还有一些研究的中药制剂仅在动物实验早期有预防肝纤维化的作用,对已形成的肝纤维化疗效不明显;同时,部分中药制剂对肝功能会造成潜在的损害<sup>[72]</sup>,这些都是进行中药抗肝纤维化研究所必须重视的问题。在浩如烟海的抗肝纤维化中药制剂中,如何筛选开发出疗效可靠、经济实用、安全无毒的抗肝纤维化中药,以最终使用于临床慢性肝病的防治,是值得广大肝病研究者认真探索的课题。

## 6 参考文献

- 1 吴定中,刘平. 中医药抗肝纤维化研究进展. 长春中医学院学报 2004;20:53-57
- 2 陈艳华. 中医药抗肝纤维实验化研究进展. 福建中医学院学报 2004;14:62-64
- 3 伍建业,郭传勇. 肝纤维化药物治疗进展. 同济大学学报(医学版) 2004;25:165-167
- 4 陈建刚. 抗肝纤维化药物机制研究. 内蒙古医学杂志 2004;36:127-128
- 5 丁里玉,李春香. 抗肝纤维化的中药提取物研究近况及机制. 河北中医学院学报 2004;19:36-39
- 6 李佳川,黄国均. 中医药防治肝纤维化的实验与临床研究概况. 甘肃中医 2003;17:40-44
- 7 姜红梅. 中药有效单体抗肝纤维化的临床与实验研究态势. 中

- 8 药学刊 2004;22:284-285
- 9 杨敏,梁鹤,洪素兰. 中医药抗肝纤维化的实验研究进展. 河南中医 2004;24:85-86
- 10 杨荣,高静. 肝纤维化基因治疗的进展. 生理科学进展 2004;35:30-34
- 11 He YT, Liu DW, Ding LY, Li Q, Xiao YH. Therapeutic effects and molecular mechanisms of anti-fibrosis herbs and selenium on rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:703-706
- 12 徐海东. 中医药治疗慢性乙型肝炎及肝纤维化述评. 中医药学刊 2004;22:178-179
- 13 苏全武,李道本. 中西药抗四氯化碳实验性大鼠肝纤维化研究. 中国中西医结合消化杂志 2004;12:187-189
- 14 邓欣,张玲. 中医药防治肝纤维化用药规律分析. 中国中西医结合消化杂志 2004;12:48-49
- 15 瞿佐发. 肝纤维化的中药治疗综述. 甘肃中医 2003;17:40-42
- 16 郝瑞春. 中医药治疗慢性肝炎后肝纤维化临床研究进展. 山西中医学院学报 2004;5:60-62
- 17 彭勃,张金生. 肝纤维化治疗研究方向的思考. 中医药学刊 2004;22:773-775
- 18 丁里玉,李春香,林玉龙,邓国兴. 中药复方抗肝纤维化研究近况. 临床荟萃 2004;19:592-594
- 19 姚斌,栾昌海. 肝纤维化的研究现状与进展. 日本医学介绍 2000;24:88-91
- 20 贾继东. 肝纤维化发生机制及诊断和治疗研究的几个问题. 中华肝脏病杂志 2004;12:257-258
- 21 陈皓洁,陈旭军. 肝纤维化发生机制研究进展. 现代中西医结合杂志 2003;12:1223-1225
- 22 李岩,王垂杰. 肝纤维化发病机制研究述要. 中医药学刊 2003;21:422-425
- 23 卢法传,高希海. 肝星状细胞激活、增生、游走、粘着机制及其临床意义. 医学综述 2003;9:715-717
- 24 杨伟峰,陈厚昌,蒋毅萍. 影响肝星状细胞活化的因素. 中华肝脏病杂志 2004;12:121-123
- 25 张绪富,吕志平,刘晓燕. 以肝星状细胞为靶标的抗肝纤维化治疗进展. 中国药理学通报 2003;19:622-626
- 26 周斌,姚乃礼. 肝星状细胞中药血清药理学实验研究概况. 中国中西医结合杂志 2004;24:376-377
- 27 王宝恩. 肝星状细胞与中医中药. 2002 年国际肝脏疾病学术研讨会论文集 2002:204-212
- 28 卢清,张清波,张继明,尹有宽,郭祥惠. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞分泌活化途径的抑制作用. 肝脏 2004;9:31-33
- 29 沈镭,陆伦根,曾民德,李继强,茅益民,贾一韬,杨文卓. 氧化苦参碱注射液对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化治疗作用. 肝脏 2003;8:35-36
- 30 焦建中,聂青和,邱英锋,赵夏夏. 苦参碱抗肝纤维化的临床研究. 中华肝脏病杂志 2004;9:54-55
- 31 王淑娟,艾群. 小柴胡汤抑制肝纤维化及肝癌的作用机制. 日本医学介绍 2004;25:42-44
- 32 Shimizu I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):84-90
- 33 张其胜,袁如华,张健,田庚元. 甘草次酸靶向肝星状细胞治疗肝纤维化的初步研究. 中华肝脏病杂志 2004;12:512
- 34 Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound on collagen expression of hepatic cells in experimental liver fibrosis of rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:877-880
- 35 赵钢,王灵台,陈建杰,张斌. 抗纤复方药物血清对 HSC-LI190 细胞 I 型、IV 型前胶原和基质金属蛋白酶及其组织抑制因子-1 基因表达的影响. 中国中西医结合杂志 2004;24:47-49
- 36 Wang L, Wang J, Wang BE, Xiao PG, Qiao YJ, Tan XH. Effects of herbal compound 861 on human hepatic stellate cell proliferation and activation. *World J Gastroenterol* 2004;10:2831-2835
- 37 薛冬英,洪嘉禾,徐列明. 丹参酚酸 B 对大鼠肝星状细胞中丝裂原激活的蛋白激酶通路的抑制作用. 中华肝脏病杂志 2004;12:471-474
- 38 Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:679-685
- 39 王占魁,姜慧卿,刘丽,张晓岚. 丹参单体 IH764-3 抗肝纤维化作用研究. 中国中西医结合消化杂志 2004;12:140-143
- 40 谈博,张奉学,刘妮,郭兴伯. 丹参含药血清对肝星状细胞增生的

- 抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12:1357-1360
- 40 杨玲, 张赤志, 朱清静, 明安萍. 抗纤软肝颗粒对血小板源生长因子诱导的肝星状细胞增生的影响. 中国中西医结合消化杂志 2004;12:80-83
- 41 李东, 李兵顺. 肝纤维化逆转研究近况. 实用肝脏病杂志 2003;6:53-55
- 42 李玲, 李诚秀, 黄能慧, 张慧娜, 程明亮. 汉丹肝乐对免疫性肝纤维化大鼠一氧化氮的影响. 贵阳医学院学报 2001;26:294-296
- 43 郭顺根, 戴敏, 张玮, 谢艳爽. 肝纤维化发生发展与信号转导途径. 中国组织化学与细胞化学杂志 2003;12:106-111
- 44 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. TGF $\beta$ 及 Smad 与肝纤维化. 国外医学消化系疾病分册 2003;23:206-209
- 45 王连升, 陈颖伟, 李定国. TGF- $\beta$ 1 激活与肝纤维化. 国外医学消化系疾病分册 2003;23:222-225
- 46 高玉洁, 杨志才, 王玉芳, 岳志军. 转化生长因子和肿瘤坏死因子在肝纤维化中的表达. 肝脏 2004;9:111-112
- 47 武希润, 吕敏和, 王琦, 师水生, 郭文栋.  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达及血浆转化生长因子  $\beta$ 1 变化在肝纤维化发生发展中的作用. 中华肝脏病杂志 2004;12:400-413
- 48 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003;11:1601-1605
- 49 张国, 王天才, 唐望先, 王颖, 李勤, 梁扩寰. Smad3、Smad 7 基因表达与肝纤维化发病关系研究. 中华消化杂志 2002;22:647-650
- 50 Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004;29:265-273
- 51 Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 2004;85:47-64
- 52 Luo K, Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:65-70
- 53 吴建新, 孟祥军, 陈源文, 程计林, 李定国, 陆汉明. Smad7 与转化生长因子  $\beta$ 1 受体后信息调控. 中华肝脏病杂志 2003;11:315-317
- 54 史永军, 田字彬, 赵清喜. Smads 蛋白家族的研究现状. 中华腹部疾病杂志 2002;2:497-500
- 55 梁增文, 张国, 王天才. 实验性大鼠肝纤维化中 Smad3 蛋白和细胞外信号调节激酶 1 的表达. 中华肝脏病杂志 2004;12:230
- 56 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor  $\beta$  and the liver. *Hepatology* 2001;34:859-867
- 57 蒋伟, 王吉耀, 杨长青, 刘文滨, 王逸青, 贺伯明. 反义转化生长因子  $\beta$  II 型受体表达质粒对实验性肝纤维化的影响. 中华肝脏病杂志 2004;12:137-140
- 58 Xu XB, Leng XS, He ZP, Liang ZQ, Lin K, Yu X, Wei YH. Effects of anti-sense Smad 4 gene on the biological characteristics of the fat-storing cell line CFSC. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2004;84:587-591
- 59 Jiang W, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM, Wang JY. Blockage of transforming growth factor  $\beta$  receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:1634-1638
- 60 徐新保, 何振平, 梁志清, 林凯, 魏玉华, 于鑫, 冷希圣. 腺病毒介导反义 Smad 4 基因大鼠体内转移对实验性肝纤维化的治疗作用. 中华消化杂志 2004;24:370-371
- 61 张国, 张法灿, 王天才, 梁扩寰. 活血软坚方对肝星状细胞 Smad 信号的影响及意义. 中华肝脏病杂志 2004;12:213
- 62 崔红燕, 刘成, 刘成海. 基质金属蛋白酶与肝纤维化的研究进展. 国外医学·消化系疾病分册 2003;23:37-40
- 63 梁志清, 徐新宝, 何振平. 反义 Smad4 对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶及其抑制剂的调节. 重庆医学 2004;33:716-717
- 64 罗燕军, 于皆平, 罗和生, 刘诗权, 涂希平. 银杏叶提取物对四氯化碳诱发大鼠肝纤维化的预防作用. 中华消化杂志 2004;24:307-308
- 65 徐斌, 张振华, 黄祝青. 血清基质金属蛋白酶及其组织抑制因子与肝纤维化. 实用肝脏病杂志 2004;7:56-58
- 66 施光峰, 李谦, 翁心华, 邬祥惠. 苦参素对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶-1 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的影响. 中华肝脏病杂志 2004;12:56
- 67 尹珊珊, 王宝恩, 王泰龄, 贾继东, 钱林学. 复方 861 治疗慢性乙型肝炎肝纤维化与早期肝硬化的临床研究. 中华肝脏病杂志 2004;12:467-469
- 68 谢玉梅, 袁青和, 周永兴, 黄长彤, 康文臻, 张岩, 郝春秋, 王九平, 朱晓慧. 中药双甲五灵冲剂对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中 TIMPs 蛋白及基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:199-203
- 69 王勇, 席军生, 谢世平. 肝纤维化相关细胞因子研究集析. 中医药学刊 2003;27:725-728
- 70 Wu XL, Zeng WZ, Wang PL, Lei CT, Jiang MD, Chen XB, Zhang Y, Xu H, Wang Z. Effect of compound Rhodiola Sachalinensis A Bor in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats and its probable molecular mechanisms. *World J Gastroenterol* 2003;9:1559-1562
- 71 王伟芹, 尹常健. 中药抗肝纤维化作用机制研究近况. 山东中医药大学学报 2003;27:75-78
- 72 刘平. 中草药的肝损伤问题. 中华肝脏病杂志 2004;12:243

### *World Journal of Gastroenterology* 点击和下载次数

《World Journal of Gastroenterology, WJG》从 2003 年第 4-9 期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数. 4-9 期共发表论文 322 篇, 其中 265 篇有点击和下载次数的记录, 占 82.29 %, 无点击和下载次数记录的为 57 篇(17.70 %). 2003-04-15/2003-10-13, 265 篇论文的点击次数为 35745, 平均每篇论文点击次数为 134.89, 最高点击次数为 1 918, 最低点击次数为 11. 其中每篇论文点击次数 100 次以上为 131 篇(49.43 %); 30-99 次为 123 篇(46.41 %); 11-29 次为 11 篇(4.15 %). 最高下载次数 1 087, 最低下载次数 10. 例如, 2003 年第 8 期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为 1 918, 下载次数为 1 087.

# 微循环障碍与急性胰腺炎

崔培林, 修瑞娟

崔培林, 北京天坛医院消化内科 北京市 100050  
修瑞娟, 中国医学科学院微循环研究所 北京市 100005  
项目负责人: 崔培林, 100050, 北京市, 北京天坛医院消化内科.  
电话: 010-67016611-2359  
收稿日期: 2004-09-23 接受日期: 2004-10-11

## 摘要

急性胰腺炎病因及发病机制复杂, 至今尚未清晰. 但微循环障碍参与急性胰腺炎发病及疾病进展已成共识. 本文就微循环障碍在急性胰腺炎发病机制中的表现及作用作一综述, 并提出改善微循环治疗也将是临床上治疗急性胰腺炎的一个重要措施.

崔培林, 修瑞娟. 微循环障碍与急性胰腺炎. 世界华人消化杂志. 2004;12(12): 2853-2855

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2853.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎病因复杂, 发病机制至今尚未清晰, 故临床上缺乏有效的治疗措施. 除经典的胰酶自身消化学说外, 微循环障碍(MCD)参与急性胰腺炎发病及病程进展已成共识. 自 Warshaw *et al*<sup>[1]</sup>发现胰腺对缺血损伤非常敏感的临床证据以来, 急性胰腺炎时原发或继发胰腺血流障碍导致的组织器官改变已引起关注, 尤其是急性重症胰腺炎时 MCD 已经不仅仅局限于胰腺组织本身, 而且已累及全身多个脏器, 可诱发多脏器功能不全(MODS)甚至多脏器功能衰竭(MOF)<sup>[2]</sup>.

胰腺自身的解剖结构决定胰腺组织本身对缺血非常敏感. 胰腺小叶内中央动脉(ILA)是唯一一支供应胰腺腺叶的动脉, 他们之间没有吻合支和分支结构, 是一种终末动脉. 这种结构表明一旦小叶内动脉痉挛、微血栓形成、或间质水肿等外压因素存在时, 胰腺腺叶就非常容易受到缺血损伤. 有人<sup>[3]</sup>观察到在急性胰腺炎发病的早期阶段胰腺小叶内动脉就出现括约肌痉挛、平滑肌肌浆中多发空泡, 甚至发现小叶内动脉括约肌的损伤要早于胰腺组织的微循环损伤, 提出胰腺小叶内动脉括约肌的损伤可能是胰腺灌注衰竭和局部微循环障碍的始动因素, 进一步表明胰腺组织对缺血应激的代偿反应非常差.

微循环障碍在急性胰腺炎发病过程中是启动因素还是促进因素至今还在争论. 1862 年, Panum 在胰腺动脉中注入蜡滴成功诱导了急性出血坏死性胰腺炎, 以及后期众多阻断胰腺动脉血流诱导急性胰腺炎的动物模型证明了缺血可能是胰腺炎发病的始动因素<sup>[4]</sup>. 但短

暂的胰腺缺血不会诱发急性坏死性胰腺炎(ANP), 却能够使急性水肿性胰腺炎(AEP)发展成为急性坏死性胰腺炎(ANP)<sup>[5]</sup>, 提示缺血是急性胰腺炎发病的一个促进因素. 其实急性胰腺炎时 MCD 不仅发生在疾病早期, 在胰酶已恢复正常坏死部分已形成清楚分界后 MCD 仍然存在. 并且 MCD 不是局部现象, ANP 时体内重要脏器如胰腺、肝脏、肾、肺、结肠等均有不同程度的微循环障碍现象<sup>[2]</sup>, 可促发 MODS, 是 ANP 有较高死亡率的最重要原因<sup>[6-7]</sup>, 故即使胰腺坏死部分已经形成, 改善微循环的治疗仍十分有价值, 因此没有必要再去争论 MCD 是胰腺炎发病的启动因素还是促进因素, 应该把他看作是机体对胰腺损伤一种全身反应, 与 MODS 密切相关<sup>[2]</sup>.

## 1 急性胰腺炎时胰腺微循环障碍的改变

1.1 血管运动失调 血管自发周期性收缩与扩张导致毛细血管血流量出现相应的同步性变化, 这是保持胰腺微血管血流量稳定的一个重要局部调节机制, 可避免胰腺组织因缺氧而致组织损伤. ANP 时胰腺微血管运动失调, 血管收缩(缺血)血管扩张(再灌注再氧化)参与胰腺炎的发病<sup>[8]</sup>. Kusterer *et al*<sup>[9]</sup>用活体内荧光显微镜观察到用牛磺胆酸钠诱导的急性胰腺炎早期就有明显的动脉收缩现象, CPF 阻断, 胰腺缺血, 接着出现血流重建再灌注, 血管扩张. 胰腺炎时最有意义血管收缩发生在小叶间血管, 尤其是其近段部分, 血管收缩可能与血管毒性物质的直接刺激、儿茶酚胺、氧自由基、胰酶等多种因素有关<sup>[10]</sup>.

缺血再灌注损伤(IRI)在胰腺炎微循环障碍中作用已受关注. 他可以激活大量白细胞黏附到血管内皮细胞, 并进入胰腺间质, 释放大量的氧自由基(respiratory burst)和毒性物质、破坏细胞及线粒体内钙离子稳态(钙反常), 直接或间接的引起胰腺组织损伤和死亡, 伴有胰腺功能毛细血管密度降低, 毛细血管灌注的异同性增加, 再灌注后可出现功能毛细血管灌注衰竭, 内皮的完整性被破坏. 在血管扩张诱导的再氧化过程中, 血浆中一些重要的细胞因子、炎性递质和血管活性物质被释放入血参与急性胰腺炎的病理生理进程<sup>[11-12]</sup>.

1.2 血管通透性改变 急性胰腺炎早期时使用荧光显微镜可以在胰腺间质中观察到从血浆中渗漏的用 FITC 标记的大分子右旋糖苷 70, 扫描电镜下发现渗漏物质通过毛细血管基底膜证据, 表明急性胰腺炎早期毛细血管的通透性就明显增加<sup>[9]</sup>. 微循环障碍不仅降低了 CPF,

而且增加了白细胞-内皮细胞之间底相互作用,增加了毛细血管底通透性,毛细血管通透性增加在临床上重症胰腺炎病人治疗中已引起特殊注意,当大量外源性补液时可引起或加重水肿和渗出,不仅局限于胰腺,还可发生在腹膜后、肺、胸腔和腹腔,甚至还引起严重并发症(ARDS等)<sup>[13]</sup>。炎症递质如PAF、ICAM、ET、OFR等参与毛细血管通透性增加底病理生理过程, Eibl *et al*<sup>[14]</sup>在重症急性胰腺炎(SAP)动物应用以上炎症递质相应抗体或受体抗体,观察他们对SAP时微循环障碍的治疗作用,发现他们都有很好的改善微循环作用,尤其是ET-RA在抗毛细血管渗漏方面作用突出,进一步提示炎症递质在MCD中的重要地位。

**1.3 营养组织灌注改变** 当胰腺受到持续性生理性分泌刺激时,可导致胰腺的血流量增加<sup>[15]</sup>,反之抑制胰腺的分泌反应,胰腺的血流量就降低<sup>[16]</sup>,而在急性胰腺炎时营养组织灌注明显受到损伤,主要由微血管运动的失调、CPF的降低、功能毛细血管密度的降低等因素引起<sup>[17]</sup>。CPF改变,有过相互矛盾的报道,大部分认为在AEP和ANP有明显不同,AEP时CPF显著升高而ANP持续降低,在由AEP发展为ANP时伴有整个脏器和营养毛细血管血流量明显下降并有广泛的毛细血管淤滞现象<sup>[18-19]</sup>。ANP时胰腺微循环障碍可能与全身和局部因素有关:全身因素如低血压、血液浓缩加重了胰腺的缺血;局部因素如胰腺微血管运动失常、炎症递质的局部作用和损伤微血管结构等在胰腺微循环障碍中尤为重要<sup>[20-21, 9]</sup>。在胰腺炎的不同阶段也有明显变化,在有一个短暂的升高后出现显著持续的下降,并且发现同一时间点在胰腺不同部位也不相同,测量胰腺整体血流不能正确反映胰腺不同局部的血流改变,高灌注和缺血,可以发生在同一时间点胰腺的不同部位,因此强调精确测量CPF的重要性<sup>[22]</sup>。许多研究发现胰腺低灌注严重程度远高于心输出量的降低程度,并发现胰腺灌注的降低不能被Ringer液纠正,甚至在心血管参数已保持基线稳定情况下,提示有一个特殊机制参与胰腺局部微循环损伤过程<sup>[23]</sup>。

**1.4 出血改变** ANP可有间质中出血表现,胰腺微血管中可见血液粘滞性增加、红细胞聚集成缗钱状、红细胞变形能力低下。红细胞变形能力低下可能是促使AEP发展成ANP重要微循环障碍因素。

## 2 参与急性胰腺炎微循环障碍的一些血管活性物质

**2.1 一氧化氮/内皮素(NO/ET)** 血管内皮细胞可释放血管活性物质去调节血管收缩与扩张运动,其中肯定包括NO、ET。有人提出胰腺炎时血浆中NO/ET的失调是引起微血管运动失调的重要因素<sup>[8]</sup>。内源性的NO系统是调节血管扩张的重要物质,而ET则是体内引起血管收缩的强大物质之一,ET引起的血管收缩可完全被NO抑制,且可被NO合成抑制剂L-NMMA加强。因此,很显然NO/ET是调节胰腺局部血流动力学功能和局部灌注

状态的主要决定因素<sup>[24]</sup>。

缺氧、钙反常可诱导内皮细胞通过cNOS使NO产生增加,使NO/ET失调,血管扩张,再灌注又引起大量白细胞激活、大量氧自由基和其他炎症递质产生<sup>[25]</sup>,而这些物质又通过增加cNOS-mRNA的降解而抑制NO引起的血管扩张作用,并刺激ET产生增加,又引起NO/ET比例的失调,使血管收缩<sup>[26]</sup>。病理状态下,炎症递质可通过诱导iNOS途径使NO合成增加,但可被氧自由基清除剂及抗黏附治疗所抑制<sup>[27]</sup>。Werner *et al*<sup>[28]</sup>证明小剂量的NO可显著的改善胰腺微循环障碍,保护内皮细胞,维持血管壁的完整性,增加毛细血管血流,间接或直接地保护胰腺细胞。小剂量的NO可调节白细胞和内皮细胞的相互作用,减少白细胞黏附于血管内皮产生的“毒素”而加重胰腺组织损伤。超大剂量NO可损伤胰腺组织细胞:(1)过量的NO使胰腺毛细血管过度扩张、血压下降、局部炎症扩散;(2)过量的NO可直接产生细胞毒作用,具体机制目前尚不清楚。但已证明NO可在细胞色素氧化酶水平上与O<sub>2</sub>竞争,可逆性的抑制了线粒体的呼吸作用<sup>[29]</sup>。

ET有三种,其中ET-1主要由血管内皮细胞表达。极低浓度ET可引起微血管的强烈收缩而全身血压影响不大,血浆中ET的升高曾被认为使诱发急性胰腺炎的重要启动因素<sup>[30]</sup>。胰腺炎ET的升高可促使微循环迅速恶化,且ET-1与胰腺炎时全身血管通透性增加密切相关<sup>[31]</sup>,决定了疾病的严重程度和预后情况。

**2.2 其他血管活性物质**<sup>[2]</sup> 如缓激肽系统、血小板激活因子(PAF)、一些黏附分子等均参与了胰腺炎时微循环障碍的病理生理过程。缓激肽可通过刺激NO、花生烯四酸、tachykinin的合成和释放等多种途径影响微血管功能,但在急性胰腺炎时他对微循环的损伤的作用至今仍有争议。PAF可通过不同机制作用于血管直径、血管通透性、白细胞滚动黏附和渗出,还可以影响NO、花生烯四酸的合成和释放,上调ICAM-1、CD11/CD18的表达,其对静脉的收缩作用要强于动脉。使用PAF受体拮抗剂可改善胰腺CPF,降低胰腺炎引起的微血管内皮细胞损伤的严重程度<sup>[32]</sup>。白细胞-内皮细胞相互作用是急性胰腺炎的一个重要步骤,ICAM-1、PECAM-1、ELAM-1、P-selectin、E-selectin等均表达增加,使用黏附分子的单克隆抗体治疗SAP,胰腺的CPF明显增加,白细胞滚动和毛细血管通透性明显降低<sup>[33]</sup>。

## 3 微循环障碍治疗及临床上新展望

微循环障碍在急性胰腺炎尤其是ANP重要的发病机制之一,改善微循环治疗可以减轻胰腺细胞的损伤和坏死,可以减轻或预防胰腺炎时全身多脏器微循环障碍,阻止MODS的发生和进展。在实验室和临床工作中,已有相当的治疗策略针对胰腺炎的微循环,如中药大黄就能通过减少氧自由基、细胞因子的产生而调节胰腺的局部血流,从而改善胰腺的微循环障碍<sup>[34]</sup>。其他如复



方丹参、氧自由基清除剂、细胞因子拮抗剂、生长抑素等等治疗药物在临床和实验室中均有应用, 有待今后进一步综述。总之, 改善微循环治疗将可能成为临床上治疗急性胰腺炎尤其ANP重要措施之一。但目前尚需解决的问题还有: 胰腺炎时改善微循环的治疗的最佳时窗是什么? 最佳治疗时间是多长? 为此我们需要进一步更深入的动态研究胰腺炎的微循环障碍。

#### 4 参考文献

- Warshaw AL, O'Hara PJ. Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann Surg* 1978;188:197-201
- Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002;47:130-138
- Zhou ZG, Chen YD, Sun W, Chen Z. Pancreatic microcirculatory impairment in experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:933-936
- Redha F, Uhlschmid G, Ammann RW, Freiburghaus AU. Injection of microspheres into pancreatic arteries causes acute hemorrhagic pancreatitis in the rat: a new animal model. *Pancreas* 1990;5:188-193
- Furukawa M, Kimura T, Sumii T, Yamaguchi H, Nawata H. Role of local pancreatic blood flow in development of hemorrhagic pancreatitis induced by stress in rats. *Pancreas* 1993;8:499-505
- Gullo A, Berlot G. Ingredients of organ dysfunction or failure. *World J Surg* 1996;20:430-436
- Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Klein CL, Hauptmann S, Klosterhalfen B. The role of the microcirculation on multiple organ dysfunction syndrome (MODS): a review and perspective. *Virchows Arch* 1996;427:61-76
- Vollmar B, Menger MD. Microcirculatory dysfunction in acute pancreatitis. A new concept of pathogenesis involving vasomotion-associated arteriolar constriction and dilation. *Pancreatol* 2003;3:181-190
- Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M, Zender S, Usadel KH. Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1993;265(1 Pt 1):G165-171
- Klar E, Werner J. New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis. *Chirurg* 2000;71:253-264
- Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1996;110:639-642
- Tanaka N, Murata A, Uda K, Toda H, Kato T, Hayashida H, Matsuura N, Mori T. Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. *Crit Care Med* 1995;23:901-908
- Bassi D, Kollias N, Fernandez-del Castillo C, Foitzik T, Warshaw AL, Rattner DW. Impairment of pancreatic microcirculation correlates with the severity of acute experimental pancreatitis. *J Am Coll Surg* 1994;179:257-263
- Eibl G, Buhr HZ, Foitzik T. Therapy of microcirculation disorders in severe acute pancreatitis: what mediators should we block? *Intensive Care Med* 2002;28:139-146
- Mithofer K, Schmidt J, Gebhard MM, Buhr HJ, Herfarth C, Klar E. Measurement of blood flow in pancreatic exchange capillaries with FITC-labeled erythrocytes. *Microvasc Res* 1995;49:33-48
- Carlsson PO, Jansson L. The long-acting somastatin analogue octreotide decreases pancreatic islet blood flow in rats. *Pancreas* 1994;9:361-364
- Kerner T, Vollmar B, Menger MD, Waldner H, Messmer K. Determinants of pancreatic microcirculation in acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 1996;62:165-171
- Schmidt J, Ebeling D, Ryschich E, Werner J, Gebhard MM, Klar E. Pancreatic capillary blood flow in an improved model of necrotizing pancreatitis in the rat. *J Surg Res* 2002;106:335-341
- Menger MD, Plusczyk T, Vollmar B. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:187-194
- Haas GS, Warshaw AL, Daggett WM, Aretz HT. Acute pancreatitis after cardiopulmonary bypass. *Am J Surg* 1985;149:508-515
- Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon AM, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. The relationship between pancreatic enzyme release and activation and the acute phase protein response in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 1995;10:347-353
- Zhou ZG, Chen YD. Influencing factors of pancreatic microcirculatory impairment in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:406-412
- Chen HM, Shyr MH, Ueng SW, Chen MF. Hyperbaric oxygen therapy attenuates pancreatic microcirculatory derangement and lung edema in an acute experimental pancreatitis model in rats. *Pancreas* 1998;17:44-49
- Lerman A, Burnett JC Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992;86(6 Suppl):III12-19
- Xu XP, Pollock JS, Tanner MA, Myers PR. Hypoxia activates nitric oxide synthase and stimulate nitric oxide production in porcine coronary resistance arteriolar endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1995;30:841-847
- Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993;73:205-209
- Rau B, Bauer A, Wang A, Gansauge F, Weidenbach H, Nevalainen T, Poch B, Beger HG, Nussler AK. Modulation of endogenous nitric oxide synthase in experimental acute pancreatitis: Role of anti-ICAM-1 and oxygen free radical scavengers. *Ann Surg* 2001;233:195-203
- Werner J, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, Kollias N, Lewandowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut* 1998;43:401-407
- Al-Mufti RA, Williamason RC, Mathie RT. Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis. *Gut* 1998;43:564-570
- Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H. Increased plasma endothelin levels in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;322:205
- Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T. Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 2000;46:390-394
- Wang X, Sun Z, Borjesson A, Haraldsen P, Aldman M, Deng X, Leveau P, Andersson R. Treatment with lexipafant ameliorates the severity of pancreatic microvascular endothelial barrier dysfunction in rats with acute hemorrhagic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1999;25:45-52
- Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatic associated lung injury. *Gastroenterology* 1999;116:694-701
- Zhao YQ, Liu XH, Ito T, Qian JM. Protective effects of rhubarb on experimental severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:1005-1009

# 不明原因的消化道出血

American Society of Gastrointestinal Endoscopy

**编者按** 本指南是消化内镜在临床常见情况下应用的系列讨论之一. 由美国消化内镜学会提供. 在该指南的撰写过程中, 除MEDLINE检索到的文章外, 还参考了一些专家推荐的文章. 本指南基于目前的一些重要综述及专家共识. 尚需大量的临床对照研究对此进行进一步明确和必要的修订. 临床实际情况和指南有差异时应进行适当调整.

徐灿, 李兆申. 不明原因的消化道出血. 世界华人消化杂志 2004;12(12): 2856-2859

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2856.asp>

## 0 引言

不明原因的消化道出血(OGIB)指消化内镜(包括结肠镜和/或上消化道内镜)检查阴性, 不明来源的持续或反复发作的出血<sup>[1]</sup>. 有关OGIB的资料(包括预后和临床结果)很少, 因此, 对此类患者的治疗尚无有效方法.

据估计, 约5%消化道出血发生于Treitz韧带和回盲瓣之间<sup>[2]</sup>. 另有资料显示, 小肠血管异常占消化道出血的30-40%<sup>[3]</sup>, 且为老年患者消化道出血的主要原因<sup>[4]</sup>. 30-50岁之间的患者, 肿瘤为主要原因, 例如平滑肌瘤、类癌、淋巴瘤和腺癌; 年轻患者主要为与Meckel憩室相关的溃疡<sup>[5]</sup>. 非甾体类抗炎药(NSAID)已证实与直肠糜烂、溃疡和狭窄有关, 因此, 可能也是OGIB的潜在因素之一<sup>[6-7]</sup>. OGIB的其他少见诱因包括胰腺出血性疾病<sup>[8]</sup>、类圆线虫感染<sup>[9]</sup>、盆腔放射性治疗<sup>[10]</sup>、弹性纤维性假黄瘤<sup>[11]</sup>、Dieulafoy损伤<sup>[12]</sup>等.

OGIB分为隐匿性和显性两类, 前者表现为反复发作的缺铁性贫血和大便隐血阳性. 后者表现为反复发作肉眼可见的出血, 如黑便、血便. 在评价小肠出血前, 应重复进行上、下消化道内镜检查, 因为首次内镜检查有较高的漏诊率. 上消化道内镜检查容易漏诊的有Cameron糜烂、消化性溃疡及血管病变. 需行大肠镜检查以排除隐匿性回肠病变及易漏诊的结肠病变, 包括血管扩张和异常新生物.

## 1 诊断性检查

**1.1 上消化道内镜** 即食管胃十二指肠镜(esophagogastroduodenoscopy, EGD), 为疑似上消化道出血的初步检查手段. 初次EGD检查结果阴性时可重复检查以提高阳性率<sup>[13-16]</sup>. 研究表明推进式小肠镜检出的病变中, 64%是常规内镜可检查到的<sup>[13]</sup>. 据研究, OGIB患者行小肠镜检查前重复EGD检查, 可提高EGD检查阳性率, 包

括肠癌患者和有NSAID病史者<sup>[14]</sup>. 如果消化道出血患者伴缺铁性贫血(IDA), 必须在行EGD检查时予以小肠活检, 尽管对此类患者行小肠活检结果的报道众说纷纭<sup>[17-18]</sup>.

**1.2 推进式肠镜(PE)** PE是利用一条长的内镜经口插入空肠腔中, 用以检查小肠中的大段病变, 尤其适用于OGIB患者. PE诊断率可达40-65%<sup>[13, 16, 19-20]</sup>. PE的优点在于不仅可诊断性检查, 还可进行介入治疗. 可对病变进行活检, 在发现出血点时可利用电凝法止血. 一项前瞻性试验在常规结肠镜诊断IDA后比较PE与EGD的诊断价值<sup>[21]</sup>, 结果PE将诊断率从41%提高到67%, 而且费用相对少, 一项回顾性研究提示PE检查, 78%的患者有阳性结果, 而且从住院天数和输血情况来看, 临床结果可获得改善<sup>[22]</sup>. 另有研究表明OGIB患者行PE检查比全小肠钡剂造影(SBFT)诊断价值高<sup>[23]</sup>. PE改善了40-73%患者治疗疗效<sup>[14-15]</sup>. 对83例隐匿性OGIB患者的回顾性调查研究表明, PE诊断率达59%<sup>[24]</sup>. 血管扩张是一种常见的病变, 通常以双极电凝法及激素治疗, 长期临床随访(平均随访12.2 mo)提示获得较好疗效的为50%. 然而, 应用PE可减少输血量并提高生活质量<sup>[25]</sup>.

探测肠镜(SE)是一条长约270-400 cm的内镜, 他利用小肠的正常蠕动插入<sup>[26]</sup>. 这项检查技术要求高, 为非常规检查, 因为其操作时间太长、即使发现了病变也无法进行治疗或活检.

**1.3 胶囊内镜(CE)** 无线视频的胶囊内镜是一项新技术, 通过内镜检测小肠病变<sup>[27-28]</sup>. 这种胶囊长26.4 mm, 直径11 mm, 在空腹8 h后服下, 小肠蠕动推进胶囊前进. 胶囊由一个镜头、一个光源、一个CMOS芯片(互补的金属氧化物半导体芯片, 成像所需)、一个电池和一个发送装置组成. 以2次/s的速度发送信息到系在腰带的记录装置上, 然后下载到计算机工作站, 人们可以在电脑上用相应的软件查看<sup>[29]</sup>. 这项新技术有助于诊断OGIB和IDA<sup>[30-31]</sup>. 早期一些研究表明CE对小肠疾病的OGIB诊断率高, 优于PE和SBFT<sup>[32-37]</sup>. 也有资料表明CE可作为PE的补充, 因为胃食管病变尚有较大的漏诊率<sup>[32]</sup>. 在包括PE在内的检查阴性的患者中有近一半可通过CE检查发现潜在出血点. CE的不足之处为无法进行治疗及对病变部位进行精确定位. 胶囊可能被卡住而需外科手术取出, 并且对可能有阻塞性病变、狭窄、吞咽困难或有腹部手术史的患者使用时要十分谨慎<sup>[38]</sup>. 推荐CE检查前对小肠进行对照研究以排除阻塞

性病变, 尽管目前尚不清楚这是否能减少CE的并发症<sup>[39]</sup>。至于CE对OGIB的作用及其对临床结果的影响尚需更深入的研究。

## 2 影像学

**2.1 小肠的影像学对照研究** SBFT被用于对小肠潜在出血来源的筛选检查。一项对SBFT和PE的比较研究表明, 在对OGIB的评估上PE的诊断率更高<sup>[23]</sup>。SBFT对OGIB的诊断率0-5.6%<sup>[40-41]</sup>。与SBFT比较, 灌肠法可对小肠的细节获得更好显影, 通过在近端小肠插入鼻肠管, 灌入对比剂后即可获得较好的效果<sup>[42]</sup>。一组128例OGIB患者的回顾性研究发现, 在确定明显或高度怀疑的病变时此法有21%的诊断率<sup>[43]</sup>, 其中13%是小肠肿瘤<sup>[44]</sup>。另一项研究显示虽然其中一小组患者通过常规上消化道内镜检查和结肠镜检查诊断率有所提高, 但总体诊断率较低。许多研究都表明, 灌肠法比SBFT可获得更高的诊断率<sup>[45-46]</sup>。对于检测血管扩张, 灌肠法的诊断率较低<sup>[43]</sup>。在PE阴性的患者中, 灌肠法可确定其中8%患者的出血灶<sup>[47]</sup>。但患者的明显不适可能会限制此法的临床应用。

**2.2 核素扫描** 显性OGIB患者如果出血速度保持在0.1-0.4 mL/min之间, 放射性同位素扫描可能会有帮助。Tc<sup>99m</sup>标记的红细胞扫描最常用。活动性出血患者经常规上消化道内镜检查和结肠镜检查仍无法确定出血灶时, 此法使用最多。通过扫描可以定位出血点, 然后可通过内镜检查或血管成像验证, 也可用来指导外科手术<sup>[48]</sup>。虽然属于相对敏感的检测方法, 但核素扫描只能确定大致出血区域, 在指导治疗方面具一定的局限性。在一项评估Tc<sup>99m</sup>标记红细胞闪烁扫描法的研究中, 85%的病例无法定位出血灶, 且无法进行充分的血管成像<sup>[49]</sup>。在进行适当设置后, 对OGIB来说, 对Meckel憩室扫描也是一种较好的检查, 使用Tc<sup>99m</sup>-高锝酸盐, 灵敏度为75-100%<sup>[50]</sup>。然而, 阳性扫描只能显示胃黏膜的存在, 而非明确的出血灶。

**2.3 血管成像术** 在显性OGIB中, 若出血速度大于0.5 mL/min, 血管成像技术可能也有帮助, 出血表现为向肠腔内的活动性渗出。很遗憾, 在OGIB中相关的数据很少。虽然就技术而言核素扫描更敏感, 但血管成像可能在定位上更为有效<sup>[51]</sup>。一项对36例患者进行的内脏血管成像研究, 诊断率为44%, 没有假阳性, 但3例为假阴性。有研究表明, 若初次血管成像为阴性, 那么有必要进行复查<sup>[52]</sup>。血管成像技术也可用于对栓塞的定位或外科手术前的检查。对于即将手术的患者, 术前通过联合使用亚甲蓝染料选择性放置血管成像导管, 可更精确地对出血点进行定位, 从而可切除最少的小肠<sup>[53]</sup>。血管成像还可用于诊断无出血的血管扩张和肿瘤组织。

螺旋CT成像是项更新的技术, 通过将导管插至腹主动脉, 然后注入造影剂显影。如造影剂外渗在肠腔

内形成大片高密度区, 即可定为出血位置。一项有13例患者的对比螺旋CT血管成像和传统血管成像研究发现, CT血管成像在定位OGIB时更快更简易, 并且对随后的选择性常规血管成像具指导意义<sup>[54]</sup>。

**2.4 激发测试** 为了避免假阴性, 有人提出对出血点进行扫描或血管成像时使用血管扩张药物(如妥拉唑林、硝酸甘油)、抗凝剂(肝素)、纤溶蛋白酶(尿激酶、链激酶)来诱导出血。有些研究报道诊断率有所提高<sup>[55]</sup>, 也有人发现效果并不明显<sup>[56]</sup>, 并且会由此导致成本-效果和安全方面问题<sup>[57]</sup>。

## 3 外科手术

对于需大量输血和/或反复住院的OGIB患者, 通过剖腹术进行术中内镜检查(IOE)是常规使用的最后检查方法<sup>[58]</sup>。术中内镜可通过口、直肠或行肠造口术进行检查。目前尚无一种可控制的试验可用来比较IOE和其他OGIB检查方法, 但IOE看起来不仅安全而且有效<sup>[59]</sup>。早期的一项有44例患者的研究显示, IOE可以发现70%的出血点, 尽管其治疗效果只有41%<sup>[60]</sup>。尚有研究显示联合使用IOE和其他定位检查时可获得82%的成功率<sup>[61]</sup>。一项对12例患者的研究显示, 有93%的病例可探查至末端结肠, 并且诊断率为58%<sup>[62]</sup>。近期对25例病例的报告显示, IOE在20例术前不明出血原因患者中可检测到16例病灶, 平均19 mo的随访中, 出血率为30%<sup>[63]</sup>。

## 4 诊断方法

隐性OGIB患者, 若反复的常规上消化道镜和结肠镜检查仍未发现病变, 且不管如何补铁仍有复发的贫血, 就有必要对小肠进行进一步检查。方法包括CE, PE或钡剂放射成像(SBFT或灌肠法)。目前, 如何选择上述检测方法以及对检测的先后进行排序仍未确定。若上述检测呈阴性, 再进一步检查就需权衡利弊了。若临床需反复住院或反复输血就需进行进一步检查, 可考虑血管成像和术中内镜检查。

显性OGIB时, 若患者在检查时无活动性出血, 就应采取和上述隐性OGIB相同的检查步骤。若患者有活动性出血, 应该重复进行EGD、PE或结肠镜检查。若检查结果为阴性, 接着应基于出血率和实用性考虑核素扫描、血管成像和CE。年轻患者尤其应考虑Meckel憩室扫描。若出血仍在继续, 就应考虑重复进行血管造影或IOE。

## 5 治疗措施

OGIB治疗主要为对症治疗。若确诊为肿瘤, 则建议外科切除。血管扩张可通过内镜下电烙术或氩血浆凝结治疗, 前提是病变部位在内镜可达范围内。有证据表明减少血液丢失和输血对临床结果有积极的效应<sup>[64-65]</sup>。若胃肠道广泛存在血管扩张, 治疗包括适当地补铁(口服或胃肠外补充)、输血或激素治疗。前瞻性观察研究显示

予以雌激素/孕酮也是一种有效治疗<sup>[66-67]</sup>。但是, 近期一项多通道随机试验发现激素治疗无明显效果<sup>[68]</sup>。奥曲肽有一定疗效, 但尚未被广泛研究<sup>[69]</sup>。

总之, 研究显示, 约5%的胃肠道出血为OGIB, 大部分病变位于小肠, 通常小肠病变包括血管扩张、肿瘤、NSAID 肠道病变、Meckel 相关溃疡。专家认为, OGIB 可以是隐性出血, 表现为缺铁性贫血, 或显性出血, 表现为黑便或便血。经仔细重复EGD和达末端回肠的结肠镜检查仍为阴性时, 就需进行小肠检查。诊断性检查包括PE、CE、钡剂检查(SBFT或灌肠), 核素检测, 血管造影和术中内镜检查。虽然缺少大量的对照研究, 前瞻性对照研究证明PE检查优于EGD和SBFT, 同样CE优于SBFT, 与PE类似。专家认为, 这些检查方法如何选择尚未明确, 需综合临床情况、可行性和临床医生来进行选择。术中内镜检查为反复发生严重出血需输血治疗的患者或者病变不能用PE或肠镜治疗的最后选择。一旦诊断成立, 治疗方法的选择尚需遵循个体化原则。

## 6 参考文献

- Anonymous. American Gastroenterological Association medical position statement: evaluation and management of occult and obscure gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology* 2000; 118:197-201
- Katz LB. The role of surgery in occult gastrointestinal bleeding. *Sem Gastrointest Dis* 1999;10:78-81
- Foutch PG. Angiodysplasia of the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 1993;88:807-818
- Lewis BS, Kornbluth A, Wayne JD. Small bowel tumours: yield of enteroscopy. *Gut* 1991;32:763-765
- Bartram CI, Amess JA. The diagnosis of Meckel's diverticulum by small bowel enema in the investigation of obscure intestinal bleeding. *Br J Surg* 1980;67:417-418
- Kwo PY, Tremaine WJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy: case discussion and review of the literature. *Mayo Clin Proc* 1995;70:55-61
- Lang J, Price AB, Levi AJ, Burke M, Gumpel JM, Bjarnason I. Diaphragm disease: pathology of disease of the small intestine induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Clin Pathol* 1988;41:516-526
- Risti B, Marincek B, Jost R, Decurtins M, Ammann R. Hemosuccus pancreaticus as a source of obscure upper gastrointestinal bleeding: three cases and literature review. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1878-1880
- Bhatt BD, Cappell MS, Smilow PC, Das KM. Recurrent massive upper gastrointestinal hemorrhage due to Strongyloides stercoralis infection. *Am J Gastroenterol* 1990;85:1034-1036
- Taverner D, Talbot IC, Carr-Locke DL, Wicks AC. Massive bleeding from the ileum: a late complication of pelvic radiotherapy. *Am J Gastroenterol* 1982;77:29-31
- Morgan AA. Recurrent gastrointestinal hemorrhage: an unusual cause. *Am J Gastroenterol* 1982;77:925-928
- Blecker D, Bansal M, Zimmerman RL, Fogt F, Lewis J, Stein R. Dieulafoy's lesion of the small bowel causing massive gastrointestinal bleeding: two case reports and literature review. *Am J Gastroenterol* 2001;96:902-905
- Zaman A, Katon RM. Push enteroscopy for obscure gastrointestinal bleeding yields a high incidence of proximal lesions within reach of a standard endoscope. *Gastrointest Endosc* 1998;47:372-376
- Chak A, Koehler MK, Sundaram SN, Cooper GS, Canto MI, Sivak MV. Diagnostic and therapeutic impact of push enteroscopy: analysis of factors associated with positive findings. *Gastrointest Endosc* 1998;47:18-22
- Hayat M, Axon AT, O'Mahony S. Diagnostic yield and effect on clinical outcomes of push enteroscopy in suspected small-bowel bleeding. *Endoscopy* 2000;32:369-372
- Descamps C, Schmit A, Van Gossum A. "Missed" upper gastrointestinal tract lesions may explain "occult" bleeding. *Endoscopy* 1999;31:452-455
- Bampton PA, Holloway RH. A prospective study of the gastroenterological causes of iron deficiency anaemia in a general hospital. *Australian New Zealand J Med* 1996;26:793-799
- Kepczyk T, Kadakia SC. Prospective evaluation of gastrointestinal tract in patients with iron-deficiency anemia. *Dig Dis Sci* 1995;40:1283-1289
- Waye JD. Enteroscopy. *Gastrointest Endosc* 1997;46:247-256
- O'Mahony S, Morris AJ, Straiton M, Murray L, MacKenzie JF. Push enteroscopy in the investigation of small-intestinal disease. *QJM* 1996;89:685-690
- Chak A, Cooper GS, Canto MI, Pollack BJ, Sivak MV. Enteroscopy for the initial evaluation of iron deficiency. *Gastrointest Endosc* 1998;47:144-148
- Adrain AL, Dabezies MA, Krevsky B. Enteroscopy improves the clinical outcome in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *J Laparoendoscopic Advanced Surgical Techniques-Part A* 1998;8:279-284
- Cellier C, Tkoub M, Gaudric M, Guimbaud R, Auroux J, Chaussade S. Comparison of push-type endoscopy and barium transit study of the small intestine in digestive bleeding and unexplained iron-deficiency anemia. *Gastroenterol Clin Biol* 1998;22:491-494
- Schmit A, Gay F, Adler M, Cremer M, Van Gossum A. Diagnostic efficacy of push-enteroscopy and long-term follow-up of patients with small bowel angiodysplasias. *Dig Dis Sci* 1996;41:2348-2352
- Vakil N, Huilgol V, Khan I. Effect of push enteroscopy on transfusion requirements and quality of life in patients with unexplained gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:425-428
- Gostout CJ. Sonde enteroscopy. Technique, depth of insertion, and yield of lesions. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics North America* 1996;6:777-792
- Appleyard M, Glukhovskiy A, Swain P. Wireless-capsule diagnostic endoscopy for recurrent small-bowel bleeding. *N Engl J Med* 2001;344:232-233
- Iddan G, Meron G, Glukhovskiy A, Swain P. Wireless capsule endoscopy. *Nature* 2000;405:417
- Ginsberg GG, Barkun AN, Bosco JJ, Isenberg GA, Nguyen CC, Petersen BT, Silverman WB, Slivka A, Taitelbaum G. Wireless capsule endoscopy: August 2002. *Gastrointest Endosc* 2002; 56:621-624
- Hahne M, Adamek HE, Schilling D, Riemann JF. Wireless capsule endoscopy in a patient with obscure occult bleeding. *Endoscopy* 2002;34:588-590
- Chutkan R, Balba N, Adams T, Johnson M. Video capsule endoscopy in the evaluation of obscure gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology* 2002;122:179
- Yousfi M, Sharma V, Leighton J, Musil D, McWane T, Fleischer D. Video capsule endoscopy (VCE) for obscure gastrointestinal bleeding (OGIB) and iron deficiency Anemia (IDA). *Gastroenterology* 2002;122:A18
- Remke S, Helou L, Mayer G, Ell C. Wireless capsule endoscopy and push-enteroscopy in chronic gastrointestinal bleeding: A prospective controlled trial. *Gastroenterology* 2002; 122:177
- Costamagna G, Shah SK, Riccioni M, Foschia F, Mutignani M, Perri V. A prospective trial comparing small bowel radiographs and video capsule endoscopy for suspected small bowel disease. *Gastroenterology* 2002;123:999-1005
- Lewis BS, Swain P. Capsule endoscopy in the evaluation of patients with suspected small intestinal bleeding: Results of a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2002;56:349-353
- Ell C, Remke S, May A, Helou L, Henrich R, Mayer G. The first prospective controlled trial comparing wireless capsule endoscopy with push enteroscopy in chronic gastrointestinal

- bleeding. *Endoscopy* 2002;34:685-689
- 37 Scapa E, Jacob H, Lewkowicz S, Migdal M, Gat D, Gluckhovski A. Initial experience of wireless-capsule endoscopy for evaluating occult gastrointestinal bleeding and suspected small bowel pathology. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2776-2779
  - 38 Fleischer DE, Heigh RI, Nguyen CC, Leighton JA, Sharma VK, Musil D. Videocapsule impaction at the cricopharyngeus: A first report of this complication and its successful resolution. *Gastrointest Endosc* 2003;57:427-428
  - 39 Faigel DO, Fennerty MB. Cutting the cord for capsule endoscopy. *Gastroenterology* 2002;123:1385-1397
  - 40 Fried AM, Poulos A, Hatfield DR. The effectiveness of the incidental small-bowel series. *Radiology* 1981;140:45-46
  - 41 Rabe FE, Becker GJ, Besozzi MJ, Miller RE. Efficacy study of the small-bowel examination. *Radiology* 1981;140:47-50
  - 42 Aliperti G, Zuckerman GR, Willis JR, Brink J. Enteroscopy with enteroclysis. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics North America* 1996;6:803-810
  - 43 Moch A, Herlinger H, Kochman ML, Levine MS, Rubesin SE, Laufer I. Enteroclysis in the evaluation of obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Roentgenol* 1994;163:1381-1384
  - 44 Rex DK, Lappas JC, Maglinte DD, Malczewski MC, Kopecky KA, Cockerill EM. Enteroclysis in the evaluation of suspected small intestinal bleeding. *Gastroenterology* 1989;97:58-60
  - 45 Dixon PM, Roulston ME, Nolan DJ. The small bowel enema: a ten year review. *Clinical Radiol* 1993;47:46-48
  - 46 Vallance R. An evaluation of the small bowel enema based on an analysis of 350 consecutive examinations. *Clinical Radiol* 1980;31:227-232
  - 47 Willis JR, Chokshi HR, Zuckerman GR, Aliperti G. Enetroscopy-enteroclysis: experience with a combined endoscopic radiographic technique. *Gastrointest Endosc* 1997;45:163-167
  - 48 Ng DA, Opelka FG, Beck DE, Milburn JM, Witherspoon LR, Hicks TC. Predictive value of technetium Tc 99m-labeled red blood cell scintigraphy for positive angiogram in massive lower gastrointestinal hemorrhage. *Dis Col Rectum* 1997;40:471-477
  - 49 Voeller GR, Bunch G, Britt LG. Use of technetium-labeled red blood cell scintigraphy in the detection and management of gastrointestinal hemorrhage. *Surgery* 1991;110:799-804
  - 50 Brown CK, Olshaker JS. Meckel's diverticulum. *Am J Emerg Med* 1988;6:157-164
  - 51 Rollins ES, Picus D, Hicks ME, Darcy MD, Bower BL, Kleinhoffer MA. Angiography is useful in detecting the source of chronic gastrointestinal bleeding of obscure origin. *Am J Roentgenol* 1991;156:385-388
  - 52 Lau WY, Ngan H, Chu KW, Yuen WK. Repeat selective visceral angiography in patients with gastrointestinal bleeding of obscure origin. *Br J Surg* 1989;76:226-229
  - 53 McDonald ML, Farnell MB, Stanson AW, Ress AM. Preoperative highly selective catheter localization of occult small-intestinal hemorrhage with methylene blue dye. *Arch Surg* 1995;130:106-108
  - 54 Ettorre GC, Francioso G, Garribba AP, Fracella MR, Greco A, Farchi G. Helical CT angiography in gastrointestinal bleeding of obscure origin. *Am J Roentgenol* 1997;168:727-731
  - 55 Koval G, Benner KG, Rosch J, Kozak BE. Aggressive angiographic diagnosis in acute lower gastrointestinal hemorrhage. *Dig Dis Sci* 1987;32:248-253
  - 56 Bloomfeld RS, Smith TP, Schneider AM, Rockey DC. Provocative angiography in patients with gastrointestinal hemorrhage of obscure origin. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2807-2812
  - 57 Berkelhammer C, Radvany A, Lin A, Hopkins W, Principe J. Heparin provocation for endoscopic localization of recurrent obscure GI hemorrhage. *Gastrointest Endosc* 2000;52:555-556
  - 58 Cave DR, Cooley JS. Intraoperative enteroscopy. Indications and techniques. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics North America* 1996;6:793-802
  - 59 Lau WY, Wong SY, Yuen WK, Wong KK. Intraoperative enteroscopy for bleeding angiodysplasias of small intestine. *Surg Gynecol Obstet* 1989;168:341-344
  - 60 Ress AM, Benacci JC, Sarr MG. Efficacy of intraoperative enteroscopy in diagnosis and prevention of recurrent, occult gastrointestinal bleeding. *Am J Surg* 1992;163:94-98
  - 61 Lau WY, Yuen WK, Chu KW, Poon GP, Li AK. Obscure bleeding in the gastrointestinal tract originating in the small intestine. *Surg Gynecol Obstet* 1992;174:119-124
  - 62 Zaman A, Sheppard B, Katon RM. Total peroral intraoperative enteroscopy for obscure GI bleeding using a dedicated push enteroscope: diagnostic yield and patient outcome. *Gastrointest Endosc* 1999;50:506-510
  - 63 Douard R, Wind P, Panis Y, Marteau P, Bouhnik Y, Cellier C. Intraoperative enteroscopy for diagnosis and management of unexplained gastrointestinal bleeding. *Am J Surg* 2000;180:181-184
  - 64 Askin MP, Lewis BS. Push enteroscopic cauterization: long-term follow-up of 83 patients with bleeding small intestinal angiodysplasia. *Gastrointest Endosc* 1996;43:580-583
  - 65 Morris AJ, Mokhashi M, Straiton M, Murray L, Mackenzie JF. Push enteroscopy and heater probe therapy for small bowel bleeding. *Gastrointest Endosc* 1996;44:394-397
  - 66 Barkin JS, Ross BS. Medical therapy for chronic gastrointestinal bleeding of obscure origin. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1250-1254
  - 67 van Cutsem E, Rutgeerts P, Vantrappen G. Treatment of bleeding gastrointestinal vascular malformations with oestrogen-progesterone. *Lancet* 1990;335:953-955
  - 68 Junquera F, Feu F, Papo M, Videla S, Armengol JR, Bordas JM. A multicenter, randomized, clinical trial of hormonal therapy in the prevention of rebleeding from gastrointestinal angiodysplasia. *Gastroenterology* 2001;121:1073-1079
  - 69 Rossini FP, Arrigoni A, Pennazio M. Octreotide in the treatment of bleeding due to angiodysplasia of the small intestine. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1424-1427

(徐灿 译, 李兆申 校 项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市长海路174号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化科. zhshli@81890.net)

# Survivin、Cyclin-B<sub>1</sub> 基因在胃癌组织中的表达及其相互关系

文亚渊, 刘宝华

文亚渊, 刘宝华, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042

重庆市科学技术委员会基金资助, No. 6832

项目负责人: 文亚渊, 400042, 重庆市大坪长江支路10号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科, wenyayuan@163.com  
电话: 023-68757248

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-11-04

## 摘要

**目的:** 观察凋亡相关基因Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>在胃癌组织中的表达, 探讨Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>的关系。

**方法:** 采用RT-PCR方法检测Survivin mRNA和Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在30例胃癌组织、10例正常胃组织标本中的表达。

**结果:** 30例胃癌组织中20例Survivin mRNA表达阳性, 10例正常胃组织无Survivin mRNA表达; 30例胃癌组织和10例正常胃组织均有Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA表达, 20例Survivin mRNA表达阳性的胃癌组织Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA表达水平明显低于10例Survivin mRNA表达阴性的胃癌组织和正常胃组织( $0.18 \pm 0.02$  vs  $0.52 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ), 10例Survivin mRNA表达阴性的胃癌组织Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA表达水平明显低于10例正常胃组织( $0.52 \pm 0.04$  vs  $0.90 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$  vs 正常胃组织)。

**结论:** Survivin在胃癌组织中的表达与Cyclin-B<sub>1</sub>表达水平呈负相关。

文亚渊, 刘宝华. Survivin、Cyclin-B<sub>1</sub> 基因在胃癌组织中的表达及其相互关系. 世界华人消化杂志 2004; 12(12):2860-2862  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2860.asp>

## 0 引言

Survivin是新近被克隆出的一种凋亡抑制蛋白<sup>[1]</sup>, 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中的一员. 但其与IAP家族其他成员不同, Survivin分子在正常组织中不表达, 而在胚胎发育组织及多数人类肿瘤组织中都有不同程度的表达<sup>[2]</sup>. 这为肿瘤治疗提供了一个新靶点. Cyclin-B是一类调节细胞周期的蛋白质, 他与细胞是否能够顺利地通过有丝分裂有关. 我们对Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>在胃癌组织中的表达及其相互关系进行了研究, 现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 研究对象 来自本院2001-2002年手术切除、病理证实的胃癌患者30例. 其中男性22例, 女性8例; 平均年龄57.6岁(21-70岁), 大于50岁者18例, 小于

或等于50岁者12例。

1.1.2 组织来源和分组 正常对照组: 30例胃癌患者手术时, 随机选择10例来自不同患者的距癌组织边缘10 cm以上的正常胃组织标本. 实验组: 30例来自不同患者的胃癌组织。

1.1.3 标本处理 所有标本取出后作好标记, 立即置入液氮中保存。

1.1.4 酶和试剂 Tripure 试剂盒、Oligo(dT)15 为美国Sigma公司产品, RNA酶抑制剂、M-Mulv 逆转录酶为美国MBI公司产品, dNTP为加拿大Sagon公司产品, Taq DNA聚合酶为美国Promega公司产品, PCR-Markers由中国华美生物工程公司提供, 其十条降解产物长度分别为1 200 bp、950 bp、815 bp、708 bp、657 bp、595 bp、515 bp、432 bp、298 bp、110 bp。

1.1.5 PCR 扩增引物 Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>以及PCR内参照GAPDH引物均由上海生物工程公司合成. Survivin引物序列: A: 5' -ATGCGCCGAGGCTGGCTTCATCCAC-3', B: 5' -TTGTAGTTTGTGCTATTCTGTGAATTA-3', 扩增片段长度963 bp. Cyclin-B<sub>1</sub>引物序列: A: 5' -CAGTCAGACCAAAATACCTACTGGGT-3', B: 5' -ACACC AACCAGCTGCAGCATCTTCTT-3', 扩增片段长度191 bp. GAPDH引物序列: A: 5' -CAC CATCTTCCAGGAGCGAG-3', B: 5' -TCACGCCACA GTTTCCCGGA-3', 扩增片段长度372 bp。

1.2 方法 采用RT-PCR方法测定正常胃组织、胃癌组织Survivin和Cyclin-B<sub>1</sub>的mRNA表达。

1.2.1 组织RNA提取 按1 mL Tripure加入100 mg组织的比例加入组织, 磨碎组织、制成匀浆, 液体倒入用DEPC处理过的EP管中, 依次加入氯仿、异丙醇、750 mL/L乙醇提取组织RNA, 取小部分样品, 在紫外分光光度计上测A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub>及A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值, 计算RNA浓度, 其余样品放入-70℃保存。

1.2.2 mRNA逆转录为cDNA 取样品RNA 4 μg用DEPC处理过的双蒸馏水补至10.5 μL, 依次分别加入RNase抑制剂0.5 μL、dNTP 2.0 μL、Oligo(dT)15 2.0 μL、5 × Buffer 4.0 μL、DEPC-DW 0.5 μL、逆转录酶1.0 μL, 合成的cDNA。

1.2.3 PCR反应体系 Survivin、Cyclin-B<sub>1</sub>、GAPDH均依次加入dNTP(0.5 μL)、MgCl<sub>2</sub>(1.5 μL)、10 × Buffer(2.5 μL)、cDNA(除GAPDH为1.0 μL外, 其余均为2.0 μL)、Taq酶(0.5 μL)、引物A(0.5 μL)、引物B(0.5 μL)、ddH<sub>2</sub>O(除GAPDH为18.0 μL外, 其余均为17.0 μL)。

1.2.4 PCR反应条件 Survivin: 94℃恒温5 min置于PCR

仪(94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s)30个循环后,再72 °C恒温5 min,放入4 °C冰箱保存;Cyclin-B1: 94 °C恒温5 min置于PCR仪(94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s)30个循环后,再72 °C恒温5 min,放入4 °C冰箱保存。

1.2.5 电泳 取PCR产物与DNA上样Buffer混匀后按照4:1比例上样,同时在另一点样孔中加PCR Marker 1 μL. 60V电压进行电泳,紫外灯下观察并拍照。将电泳凝胶置于Gel Doc 2000凝胶图像分析系统,进行图像分析。

**统计学处理** 数据均以均数±标准差(mean±SD)表示,采用SPSS10.0软件进行 $\chi^2$ 检验、方差分析和 $t$ 检验分析。 $P<0.05$ 表明差异有显著性。

## 2 结果

2.1 Survivin mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达 10例正常胃组织中均无Survivin mRNA表达,30例胃癌组织中有20例Survivin mRNA表达阳性,阳性率为66.7%。(图1)

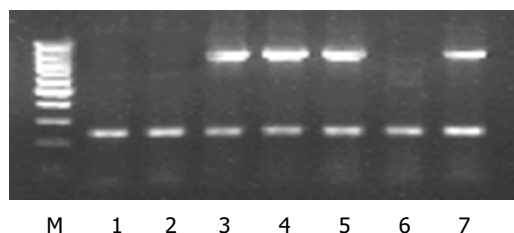


图1 Survivin mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达。M: PCR-Marker; 1: Survivin在正常胃组织中的表达; 2-7: Survivin在胃癌组织中的表达。Survivin在正常胃组织中及第2、6泳道的胃癌组织中无表达,而在第3-7泳道的胃癌组织中可见阳性表达。

2.2 Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达 Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织均有表达,在191 bp处可见一透亮带条。(图2)

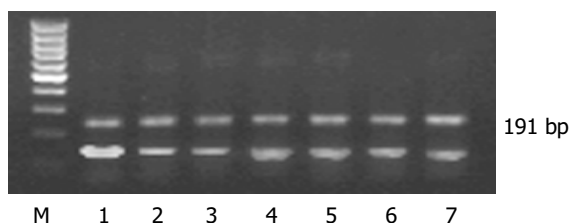


图2 Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织中的表达。M: PCR-Marker; 1: Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织中的表达; 2-7: Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在胃癌组织中的表达。Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织中均有表达。

2.3 Survivin mRNA与Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA在正常胃组织及胃癌组织中表达的关系 Survivin mRNA表达阳性胃癌组织的Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA水平均较正常胃组织及Survivin mRNA表达阴性的胃癌组织显著下降( $P<0.01$ )。Survivin mRNA表达阴性胃癌组织的Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA较正常胃组织组显著下降( $P<0.01$ ,表1)。

表1 Survivin mRNA与Cyclin-B<sub>1</sub> mRNA表达的关系(mean±SD)

分组	n	Cyclin-B <sub>1</sub>
Survivin(+)	20	0.18 ± 0.02 <sup>bd</sup>
Survivin(-)	10	0.52 ± 0.04 <sup>b</sup>
正常胃组织	10	0.90 ± 0.04

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 正常胃组织; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs Survivin(-)。

## 3 讨论

肿瘤生物学认为肿瘤是一类细胞增生周期紊乱性疾病,表现为细胞增生旺盛而凋亡发生障碍。细胞周期的调控在肿瘤的发生和治疗中有着重要作用<sup>[1]</sup>。研究发现在细胞周期的G<sub>1</sub>期及G<sub>2</sub>/M期存在检验点调控(check point control),其功能是在细胞进行有丝分裂时控制有丝分裂器的装配,维持细胞倍性,保持细胞分裂的同步,从而保证细胞周期在上游事件正确完成的前提下启动下游事件<sup>[4]</sup>。其中对G<sub>2</sub>/M检验点的存在控制遗传的忠实性和有丝分裂的完整性早有论述,并已鉴定出参与其功能的一些基因家族如ATM-毛细血管扩张性共济失调症基因、辐射停滞缺陷基因9、21、24、27、p53等<sup>[5]</sup>。由于Survivin仅特异地表达于细胞周期的G<sub>2</sub>/M期,因此可以推测Survivin基因对于细胞顺利地通过G<sub>2</sub>/M检验点,并强迫细胞完成有丝分裂以维持细胞增殖活性具有重要作用。从这个意义上也可以认为Survivin是一种G<sub>2</sub>/M检验点调控相关基因。以往的一些研究发现干扰C.elegans和酵母中Survivin类似物的表达可以引起致死性的细胞分裂缺陷<sup>[6]</sup>。这说明Survivin基因在细胞有丝分裂中具有重要的调控作用。细胞周期检验点的调控除了修复损伤之外,还可以通过诱导细胞凋亡来清除损伤的细胞。阻断细胞增生周期进程可以引起凋亡,而凋亡也常伴有细胞生长阻滞,细胞增生周期与凋亡密切相关<sup>[7]</sup>。Chen *et al*<sup>[8]</sup>研究发现,Survivin主要定位于有丝分裂末期的中体,Survivin表达的下调使细胞纺锤体能够延长但不能完成有丝分裂,从而导致多核细胞纺锤体蓄积。相反地,Survivin表达升高,则使细胞顺利地完成有丝分裂。我们的研究结果发现30例胃癌患者中有20例Survivin表达阳性,而正常对照组10例中无1例有Survivin表达,表明Survivin在胃癌组织中表达升高,这已经为胃癌细胞顺利地完成有丝分裂而出现异常增生创造了先决条件。这也与Survivin特异地表达于细胞周期的G<sub>2</sub>/M期及其在纺锤体的定位等特性是一致的。另外,Survivin过表达除为细胞顺利地完成有丝分裂,使其增殖活性升高外,他还可以诱发肿瘤细胞发生抗凋亡作用。因此,我们认为Survivin的作用就是联系细胞周期与凋亡的进展,决定细胞进入G<sub>2</sub>/M期后的走向。当Survivin在细胞中过表达时,可以促进细胞顺利地通过G<sub>2</sub>/M期,完成有丝分裂,使细胞异常增生,导致肿瘤发生。所以,Survivin在肿瘤中的表达可能是在肿瘤细胞中产生一种防御机制,使得肿瘤细胞由于G<sub>2</sub>/M期检验



点功能的丢失以及细胞凋亡阈值的增加而受益。

细胞周期素(Cyclin)是一类随着细胞周期的不同而发生变化的蛋白质,在G<sub>2</sub>期主要是CyclinB的表达增加<sup>[9]</sup>,有丝分裂结束时降低<sup>[10]</sup>。由于真核细胞M期的诱导由M期促进因子(M-phase promoting factor, MPF)来完成<sup>[11]</sup>,而MPF主要是由催化亚基P<sub>34cdc2</sub>和调节亚基CyclinB组成的激酶复合体(P<sub>34cdc2</sub>-cyclinB),即CyclinB是MPF的组成成分<sup>[12]</sup>。有人<sup>[13]</sup>研究发现CyclinB与细胞周期依赖性激酶P<sub>34cdc2</sub>结合组成的激酶复合体控制着有丝分裂期的进入与离开。CyclinB与P<sub>34cdc2</sub>结合,P<sub>34cdc2</sub>激酶的15-酪氨酸和14-苏氨酸脱磷酸而激活,使细胞进入M期进行有丝分裂,当进入有丝分裂后期,CyclinB的迅速降解,导致复合物释放出无活性的亚单位P<sub>34cdc2</sub>。P<sub>34cdc2</sub>失去活性,细胞才能退出M期,如果CyclinB降解受阻,细胞将无法退出,因而停滞于M期。本实验中,胃癌组织CyclinB<sub>i</sub>较正常胃组织水平低,Survivin表达阳性胃癌组织CyclinB<sub>i</sub>较Survivin表达阴性胃癌组织低,说明CyclinB<sub>i</sub>较低时,使进入M期的胃癌细胞完成有丝分裂后迅速退出M期,使细胞得以增生发展。因此,Survivin对细胞分裂周期的调控可能是通过CyclinB<sub>i</sub>表达来实现的。Survivin在肿瘤细胞进入G<sub>2</sub>/M期表达增加,引起CyclinB<sub>i</sub>表达降低,从而有利于细胞完成有丝分裂后退出G<sub>2</sub>/M期,而细胞有丝分裂的顺利成为细胞异常增生及肿瘤发生、发展创造了先决条件。

#### 4 参考文献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273:11177-11182
- 2 Bao R, Connolly DC, Murphy M, Green J, Weinstein JK, Pisarcik DA, Hamilton TC. Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:522-528
- 3 Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828
- 4 Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: control that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629-634
- 5 Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 1996;274:1664-1672
- 6 Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, Van-Driel R, Vaux DL, Lithgow T. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10170-10175
- 7 Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, Basi G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:603-612
- 8 Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowser LM, Bennett F, Krajewski S, Krajewska M, Welsh K, Reed JC, Ng SC. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia* 2000;2:235-241
- 9 Dynlacht BD. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 1997;389:149-152
- 10 Muschel RJ, Zhang HB, McKenna WG. Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. *Cancer Res* 1993;53:1128-1135
- 11 Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1988;85:3009-3013
- 12 Gerhart J, Wu M, Kirschner M. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 1984;98:1247-1255
- 13 King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell* 1994;79:563-571

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

• 研究快报 •

## 人胰腺癌组织中Th2类细胞因子的优势表达及其临床意义

张圣林,邱法波,吴力群,卢云

张圣林,邱法波,吴力群,卢云,青岛大学医学院附属医院肝胆血管外科 山东省青岛市 266003

项目负责人:邱法波,266003,山东省青岛市江苏路16号,青岛大学医学院附属医院肝胆血管外科, phulin@sohu.com

电话:0532-2911369

收稿日期:2004-09-13 接受日期:2004-10-20

### 摘要

目的:观察Th1/Th2类细胞因子在胰腺癌组织中的表达模式及临床意义。

方法:以IFN- $\gamma$ 和IL-2代表Th1类细胞因子,IL-4和IL-10代表Th2类细胞因子。收集45例胰腺癌患者的手术切除组织蜡块,以免疫组织化学PV-9000通用型二步法染色,

DAB显色试剂盒显色,检测胰腺癌组织中Th1/Th2类细胞因子的表达。

结果:IFN- $\gamma$ 和IL-2在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达无明显差异( $P>0.05$ ),说明Th1类细胞因子在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达无明显差异;IL-4和IL-10在胰腺癌组织中的表达明显高于正常胰腺组织( $P=0.022<0.05$ ;  $P=0.023<0.05$ ),说明Th2类细胞因子在胰腺癌组织中的表达明显高于正常胰腺组织。

结论:胰腺癌组织中Th2类细胞因子呈优势表达状态,这可能是肿瘤免疫逃逸的机制。

点功能的丢失以及细胞凋亡阈值的增加而受益。

细胞周期素(Cyclin)是一类随着细胞周期的不同而发生变化的蛋白质,在G<sub>2</sub>期主要是CyclinB的表达增加<sup>[9]</sup>,有丝分裂结束时降低<sup>[10]</sup>。由于真核细胞M期的诱导由M期促进因子(M-phase promoting factor, MPF)来完成<sup>[11]</sup>,而MPF主要是由催化亚基P<sub>34cdc2</sub>和调节亚基CyclinB组成的激酶复合体(P<sub>34cdc2</sub>-cyclinB),即CyclinB是MPF的组成成分<sup>[12]</sup>。有人<sup>[13]</sup>研究发现CyclinB与细胞周期依赖性激酶P<sub>34cdc2</sub>结合组成的激酶复合体控制着有丝分裂期的进入与离开。CyclinB与P<sub>34cdc2</sub>结合,P<sub>34cdc2</sub>激酶的15-酪氨酸和14-苏氨酸脱磷酸而激活,使细胞进入M期进行有丝分裂,当进入有丝分裂后期,CyclinB的迅速降解,导致复合物释放出无活性的亚单位P<sub>34cdc2</sub>。P<sub>34cdc2</sub>失去活性,细胞才能退出M期,如果CyclinB降解受阻,细胞将无法退出,因而停滞于M期。本实验中,胃癌组织CyclinB<sub>i</sub>较正常胃组织水平低,Survivin表达阳性胃癌组织CyclinB<sub>i</sub>较Survivin表达阴性胃癌组织低,说明CyclinB<sub>i</sub>较低时,使进入M期的胃癌细胞完成有丝分裂后迅速退出M期,使细胞得以增生发展。因此,Survivin对细胞分裂周期的调控可能是通过CyclinB<sub>i</sub>表达来实现的。Survivin在肿瘤细胞进入G<sub>2</sub>/M期表达增加,引起CyclinB<sub>i</sub>表达降低,从而有利于细胞完成有丝分裂后退出G<sub>2</sub>/M期,而细胞有丝分裂的顺利成为细胞异常增生及肿瘤发生、发展创造了先决条件。

#### 4 参考文献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273:11177-11182
- 2 Bao R, Connolly DC, Murphy M, Green J, Weinstein JK, Pisarcik DA, Hamilton TC. Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:522-528
- 3 Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828
- 4 Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: control that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629-634
- 5 Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 1996;274:1664-1672
- 6 Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, Van-Driel R, Vaux DL, Lithgow T. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10170-10175
- 7 Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, Basi G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:603-612
- 8 Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowser LM, Bennett F, Krajewski S, Krajewska M, Welsh K, Reed JC, Ng SC. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia* 2000;2:235-241
- 9 Dynlacht BD. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 1997;389:149-152
- 10 Muschel RJ, Zhang HB, McKenna WG. Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. *Cancer Res* 1993;53:1128-1135
- 11 Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1988;85:3009-3013
- 12 Gerhart J, Wu M, Kirschner M. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 1984;98:1247-1255
- 13 King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell* 1994;79:563-571

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

• 研究快报 •

## 人胰腺癌组织中Th2类细胞因子的优势表达及其临床意义

张圣林,邱法波,吴力群,卢云

张圣林,邱法波,吴力群,卢云,青岛大学医学院附属医院肝胆血管外科 山东省青岛市 266003

项目负责人:邱法波,266003,山东省青岛市江苏路16号,青岛大学医学院附属医院肝胆血管外科, phulin@sohu.com

电话:0532-2911369

收稿日期:2004-09-13 接受日期:2004-10-20

### 摘要

目的:观察Th1/Th2类细胞因子在胰腺癌组织中的表达模式及临床意义。

方法:以IFN- $\gamma$ 和IL-2代表Th1类细胞因子,IL-4和IL-10代表Th2类细胞因子。收集45例胰腺癌患者的手术切除组织蜡块,以免疫组织化学PV-9000通用型二步法染色,

DAB显色试剂盒显色,检测胰腺癌组织中Th1/Th2类细胞因子的表达。

结果:IFN- $\gamma$ 和IL-2在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达无明显差异( $P>0.05$ ),说明Th1类细胞因子在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达无明显差异;IL-4和IL-10在胰腺癌组织中的表达明显高于正常胰腺组织( $P=0.022<0.05$ ;  $P=0.023<0.05$ ),说明Th2类细胞因子在胰腺癌组织中的表达明显高于正常胰腺组织。

结论:胰腺癌组织中Th2类细胞因子呈优势表达状态,这可能是肿瘤免疫逃逸的机制。

张圣林, 邱法波, 吴力群, 卢云. 人胰腺癌组织中Th2类细胞因子的优势表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2862-2864  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2862.asp>

## 0 引言

自Th1和Th2的概念提出以来, 人们对其在机体免疫应答中的作用进行了大量的体内外实验研究, 但未见有胰腺癌组织中Th1/Th2偏移的研究报道. 我们以IFN- $\gamma$ 和IL-2代表Th1类细胞因子, IL-4和IL-10代表Th2类细胞因子, 以免疫组织化学方法检测胰腺癌组织中Th1/Th2类细胞因子的表达, 阐明Th1/Th2类细胞因子在胰腺癌中的表达特征, 这对于明确胰腺癌的发病机制及指导临床有重要意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集青岛大学医学院附属医院肝胆血管外科1998-2004年间的45例胰腺癌患者病例资料及切除组织的蜡块标本, 男31例, 女14例, 年龄44-80岁, 平均年龄63.8岁. 其中胰头癌33例, 胰体尾癌10例, 钩突癌2例. 病理类型: 高分化腺癌5例, 中分化腺癌25例, 低分化腺癌15例. 对照组10例正常胰腺组织标本取自非正常死亡的健康成人尸体.

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组化染色** 胰腺癌组织蜡块预冷后4  $\mu$ m连续切片, 二甲苯与梯度酒精脱蜡至水化, 30 mL/L过氧化氢10 min以消除内源性过氧化物酶. 置入0.01 mol/L

枸橼酸缓冲液(pH = 6.0), 微波修复抗原. 一抗为兔抗人IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4和IL-10(武汉博士德生物工程有限公司), IFN- $\gamma$ , IL-2和IL-4以1:200稀释后使用, IL-10以1:50稀释. PV-9000通用型二步法染色, PV-9000试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 流程参考说明书. DAB显色试剂盒显色, 苏木素复染, 10 mL/L盐酸酒精分化, 1 mL/L氨水返蓝, 梯度酒精脱水, 干燥后中性树胶封片. 用已知阳性切片作阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照.

**1.2.2 结果判断** 胞质内含棕黄色颗粒为阳性, 并按表达情况和强度分为: (-)为阴性, (+)每张切片有<25%细胞表达, (++)25-50%细胞表达, (+++) >50%的细胞表达.

**统计学处理** 采用SPSS 11.5软件进行分析,  $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

## 2 结果

胰腺癌组织中四种细胞因子的表达情况(表1). IFN- $\gamma$ 在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达无明显差异( $P = 0.596 > 0.05$ , 图1); IL-2在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达也无明显差异( $P = 0.146 > 0.05$ , 图2); IL-4在胰腺癌组织中的表达明显高于正常胰腺组织( $P = 0.022 < 0.05$ , 图3); IL-10在胰腺癌组织中的表达也明显高于正常胰腺组织( $P = 0.023 < 0.05$ , 图4).

以IFN- $\gamma$ 和IL-2代表Th1类细胞因子, 在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达无明显差异; 以IL-4和IL-10代表Th2类细胞因子, 在胰腺癌组织中的表达明显高于

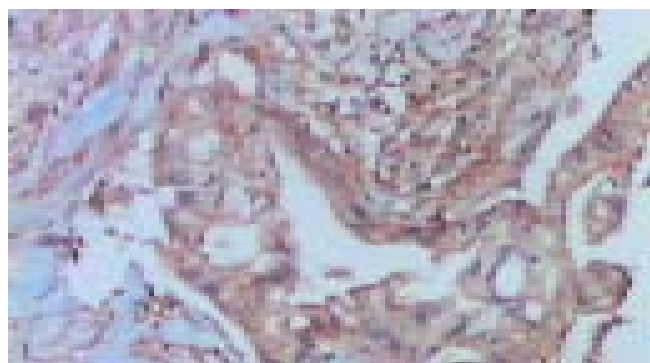


图1 IFN- $\gamma$ 在胰腺癌中的表达( $\times 400$ ).

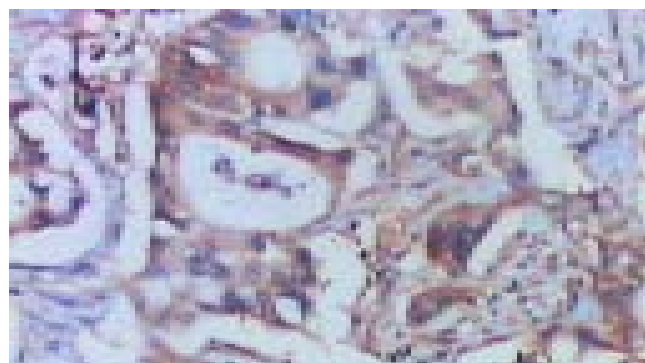


图2 IL-2在胰腺癌中的表达( $\times 400$ ).

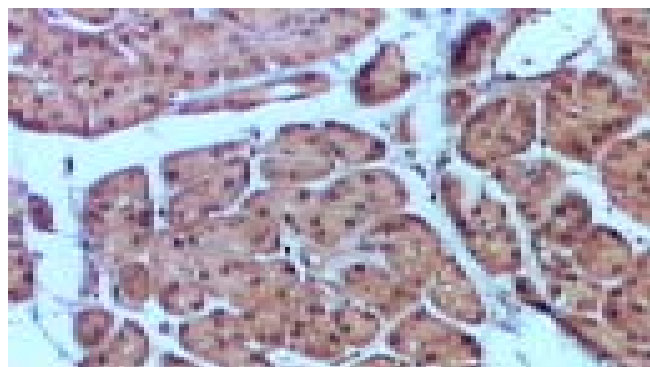


图3 IL-4在胰腺癌中的表达( $\times 400$ ).



图4 IL-10在胰腺癌中的表达( $\times 400$ ).

表1 细胞因子在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达

组别	IFN- $\gamma$				IL-2				IL-4				IL-10			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
胰腺癌	4	13	22	6	7	12	21	5	15 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
正常胰腺	0	2	7	1	2	6	2	0	8 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常胰腺组; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常胰腺组.

正常胰腺组织. 这与国内外的有关报道基本相符合, 说明胰腺癌作为恶性肿瘤中的一种也是处于 Th1/Th2 类细胞因子偏移状态, Th2 类细胞因子呈优势表达.

不同病理类型的胰腺癌组织中 Th2 类细胞因子的表达情况(表2). IL-4, IL-10 的表达情况与胰腺癌的恶性程度呈明显的正相关( $P = 0.013 < 0.05$ ;  $P = 0.029 < 0.05$ ).

表2 Th2 类细胞因子在不同病理类型胰腺癌中的表达

病理类型	IL-4			IL-10		
	-	+	++	-	+	++
高分化	4	1	0	3	2	0
中分化	6	12	7	5	12	8
低分化	2	4	9	2	3	10

### 3 讨论

根据 CD4<sup>+</sup>Th 细胞所分泌的细胞因子不同, 将其分为 Th0、Th1、Th2 三种亚型. Th1 类细胞分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-18 和 IL-12 等, 主要介导细胞免疫应答; Th2 类细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 等, 主要介导体液免疫应答. 正常机体的 Th1/Th2 类细胞因子处于动态平衡, 当这个平衡失调并向 Th1 或 Th2 转化时, 称为 Th1/Th2 的偏移. Th1/Th2 的偏移与许多疾病的发生、发展、治疗和转归有密切的关系. 近年来研究发现, 非小细胞肺癌、直肠癌、卵巢癌、绒癌、黑色素瘤、胃癌、骨肉瘤、淋巴瘤及鼻咽癌等多种肿瘤患者体内 Th2 类细胞因子占优势, 且 Th1/Th2 的偏移与肿瘤的恶性程度呈正相关<sup>[1]</sup>. Bellone *et al*<sup>[2]</sup> 也发现胰腺癌组织中 Th2 类细胞因子的表达明显高于正常胰腺组织, 而其未对 Th1 类细胞因子和 Th1/Th2 的偏移做相

关研究. 我们的结果显示, 45 例胰腺癌组织中 Th1 类细胞因子的表达与正常胰腺组织无明显差异, Th2 类细胞因子的表达明显高于正常胰腺组织, 提示 Th2 类细胞因子分泌量增多, 呈优势表达状态. 这不但与 Bellone 的结论基本符合而且还进一步阐述了胰腺癌患者的免疫状态.

机体的抗肿瘤免疫效应机制包括细胞免疫和体液免疫两个方面, 细胞免疫是主力, 在抗肿瘤免疫过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>. 恶性肿瘤患者 Th2 优势表达可降低机体的抗肿瘤免疫能力, 致肿瘤细胞逃避细胞免疫应答, 使癌细胞在宿主体内得以长期的存活和发展<sup>[4]</sup>, 另外 Th2 类细胞还可直接阻滞 Th1 类细胞介导的免疫应答<sup>[5]</sup>, 并且随肿瘤分化程度的降低和病情的进展这种趋势会更加明显<sup>[6]</sup>, 这可能是导致肿瘤免疫逃逸的机制.

检测胰腺癌患者的 Th1/Th2 类细胞因子, 既有助于疾病的诊断, 又可对疾病的发生发展进行监测, 还能以调整 Th1/Th2 的平衡为目的设计出相应的治疗方案<sup>[7]</sup>. 因此, 对恶性肿瘤患者, 检测机体的 Th1/Th2 类细胞因子水平有着重要的临床意义.

### 4 参考文献

- 1 Kharkevitch DD, Seito D, Balch GC, Maeda T, Balch CM, Itoh K. Characterization of autologous tumor-specific T-helper 2 cells in tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1994;58:317-323
- 2 Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol* 1999;155:537-547
- 3 Reome JB, Hyland JC, Dutton RW, Dobrzanski MJ. Type 1 and type 2 tumor infiltrating effector cell subpopulations in progressive breast cancer. *Clin Immunol* 2004;111:69-81
- 4 Cua DJ, Hinton DR, Stohlman SA. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J Immunol* 1995;155:4052-4059
- 5 Ruzek MC, Mathur A. Specific decrease of Th1-like activity in mice with plasma cell tumors. *Int Immunol* 1995;7:1029-1035
- 6 Spachacz R, Kasprzak A, Stefanska K, Trejster E, Seidel J, Zabel M. Tissue expression of cytokines (IL-1alpha, IL-2, IL-6, IL-12, TNF-alpha) in B-cell lymphomas in children. *Folia Morphol* 2003;62:483-484
- 7 Loskog A, Dzojic H, Vikman S, Ninalga C, Essand M, Korsgren O, Totterman TH. Adenovirus CD40 ligand gene therapy counteracts immune escape mechanisms in the tumor Microenvironment. *J Immunol* 2004;172:7200-7205

# 大肠侧向发育型肿瘤线粒体 DNA D- 环区的突变

宋卫兵, 吴倩倩, 阎 丽, 马 莉, 肖 冰

宋卫兵, 阎丽, 马莉, 肖冰, 南方医科大学南方医院消化病研究所  
广东省广州市 510515  
吴倩倩, 中国人民解放军军事体育学院门诊部 广东省广州市 510515  
项目负责人: 肖冰, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院消化病  
研究所. xiaobing@fimmu.com  
电话: 020-61641545  
收稿日期: 2004-10-15 接受日期: 2004-11-12

## 摘要

**目的:** 了解大肠侧向发育型肿瘤(laterally spreading tumor, LST)线粒体DNA的突变, 探讨其与肿瘤发生的关系。

**方法:** 提取LST线粒体DNA(mtDNA), 扩增D- 环区, 产物用DNA自动测序法进行序列分析。

**结果:** 共检测到4个碱基突变。第16 223位C突变为T, 第16 298位C突变为T, 第16 362位T突变为C, 第16 519位T突变为C。

**结论:** 线粒体DNA D-环区是一个具有高度多态性和突变性的区域, 在LST中突变率较高。

宋卫兵, 吴倩倩, 阎丽, 马莉, 肖冰. 大肠侧向发育型肿瘤线粒体 DNA D- 环区的突变. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2865-2867  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2865.asp>

## 0 引言

肿瘤发生是一个多步过程。在研究细胞核中癌基因、抑癌基因的变化方面, 人类取得了很大成就, 但仍有许多问题不能仅用核基因的变化解释<sup>[1-2]</sup>。一系列实验表明染色体外存在抑癌因素, 维持细胞的肿瘤特性需要线粒体DNA的参与<sup>[1,3]</sup>。人类的线粒体基因组是环状、双链DNA, 分成编码区和非编码区, 即D- 环区。D- 环区包括重链的复制起点等重要序列。线粒体DNA的结构特点及其在DNA复制和损伤修复方面的特性使他的突变率比核染色体高10-100倍<sup>[4-5]</sup>。大肠侧向发育型肿瘤(laterally spreading tumor, LST)。主要沿黏膜表面呈侧向浅表扩散, 国内对其的研究尚不多。哺乳动物线粒体DNA为核外重要遗传物质, 其突变与细胞癌变之间的关系已引起重视, 本文用DNA自动测序方法, 测定了LST线粒体DNA D- 环区基因序列, 旨在了解他们的变异, 探讨线粒体基因突变与肿瘤发生的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** LST细胞株为本研究所自建<sup>[6]</sup>, 含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养, 为杭州特诺公司产品, 线粒体DNA的提取试剂盒为杭州唯特洁公司产品。PCR纯化用OMEGA公司的PCR纯化试剂盒。

## 1.2 方法

**1.2.1 LST 细胞的培养及线粒体的提取** LST细胞培养在含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养液中, 35 mL培养瓶培养, 置于37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱, 隔天换液。当细胞铺满瓶底时, 按DNA的提取试剂盒说明书进行线粒体DNA的提取。

**1.2.2 D- 环区的PCR 扩增** 上游引物5' -ATCGGATCC TTCATGGGGAAGCAGATTTGG-3' 下游引物: 5' -ACGCTCGAGGGAGCTAAGCTACATAAACTG-3'。PCR的反应体积是25 μL, 包括各1 μL的两种引物(20 μmol/L), 1 μL的10 × Buffer, 12.5 μL PFU, 1 μL的LST细胞mtDNA。8.5 μL去离子双蒸水补至25 μL。用PCR仪(GeneAmp9600, 美国Perkin Elmer)进行反应: 起始变性温度94 °C, 2 min, 以下过程进行33个循环: 变性温度94 °C, 30 s; 复性温度56 °C, 30 s; 延伸温度72 °C, 30 s, 结束延伸温度72 °C, 2 min。

**1.2.3 产物的证实、纯化和测定** 取2 μL的反应产物, 在15 g/L的琼脂糖凝胶上电泳, 确定D- 环区成功扩增后, 用快速PCR纯化试剂盒对反应产物进行纯化, 送上海博亚公司测序。将肿瘤组织线粒体DNA D- 环区序列与正常组织的进行对比, 并与基因库数据(<http://WWW.Infinity.gen.emory.edu/mitomap.html>)对照。当线粒体DNA D- 环区的核苷酸顺序与正常顺序不同时, 即为突变; 用TaKaRa公司的EXTaq酶重新扩增, PCR的反应体积是50 μL, 包括各2 μL的两种引物(20 μmol/L), 5 μL的10 × Buffer, 4 μL dNTP, 0.25 μL EXTaq酶4 μL的LST细胞mtDNA, 22.75 μL去离子双蒸水补至50 μL。反应条件同前。用重新合成引物: Primer1 A (bp68): 5' -atcATCGGATCCTTCATGGGGAAGCAGATTTGG-3', Primer1 B (bp1205C): 5' -acgACGCTCGAGGGAGGTAA GCTACATAAACTG-3' 重新扩增线粒体D- 环区, 再次测序, 证实了突变确实存在。

## 2 结果

LST细胞线粒体DNA提取后, 使用引物经PCR扩增, 其片段长度均约为1 200 bp(图1)。

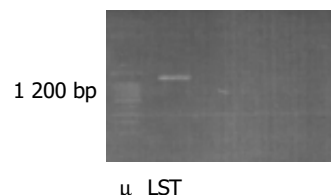


图1 LSTt 细胞 d-loop 区 PCR 电泳图。

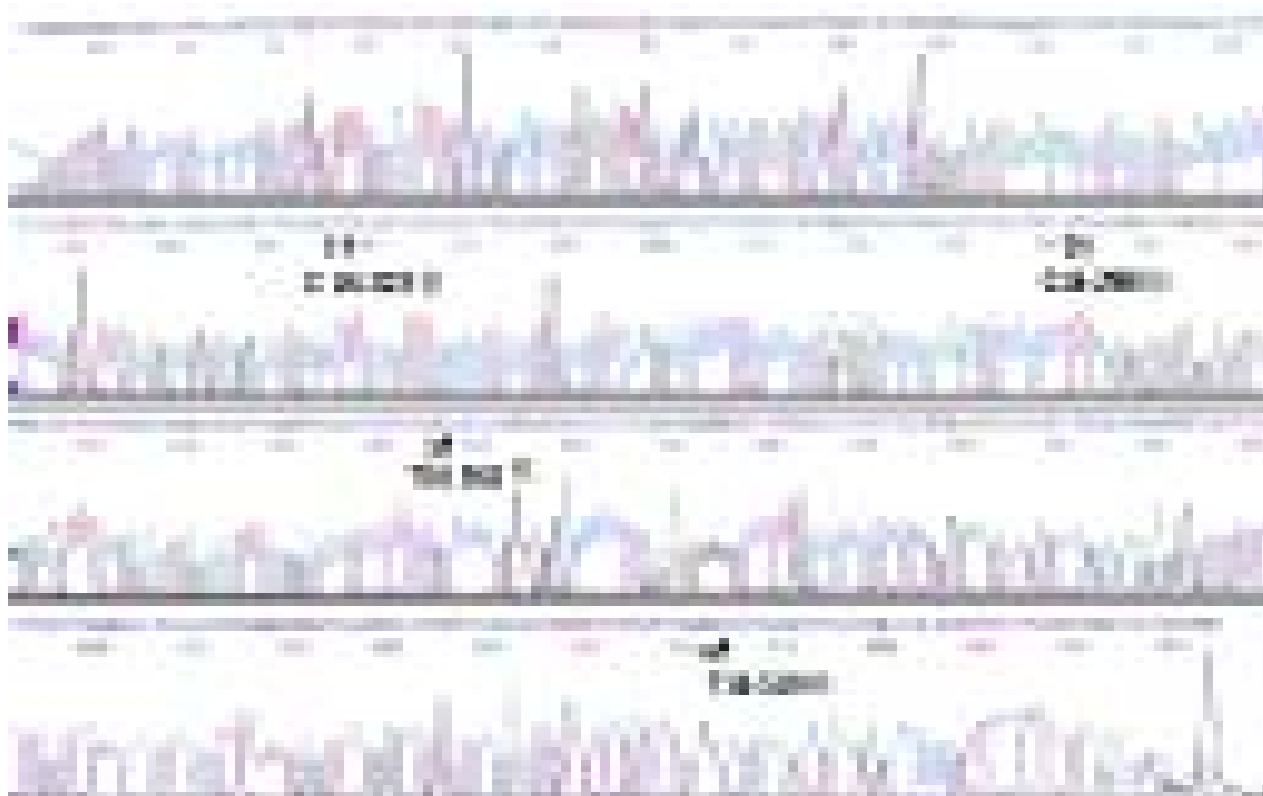


图2 LSTt细胞d-loop区测序图谱. 箭头1-4 分别表示16223、16298、16362、16519 位突变.

经DNA正、反向自动测序,获得的细胞D-环全序列长1 119 bp(图2). 结果显示,有第16 223位C突变为T,第16 298位C突变为T,第16 362位T突变为C,第16 519位T突变为C.

### 3 讨论

大肠侧向发育型肿瘤(laterally spreading tumor, LST)的概念由日本学者工藤进英(Kudo Sine)首先提出,指起源于大肠黏膜的一类隆起型病变.这类病变极少向肠壁深层垂直侵犯,而主要沿黏膜表面呈侧向浅表扩散,故被称为侧向发育型肿瘤. LST病变形态和发生发展上有一定的特殊性,不同于一般的腺瘤,因此日本学者将之单独列为一类肿瘤进行研究.据日本的一些大宗研究报告<sup>[7]</sup>,LST与大肠癌的关系密切,LST病变合并大肠癌的比例为8.4-52.5%,并已有动态观察表明LST可以在3 a内发展为进展期大肠癌<sup>[8]</sup>.国内对LST的研究尚不多.哺乳动物线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)为一长度约16.5 kb的环状双链分子.含有自我复制、转录和翻译的遗传体系.基因组包含2个rRNA基因,22个tRNA基因和编码氧化磷酸化复合体中13种多肽的mRNA基因<sup>[9]</sup>.mtDNA作为核外重要遗传物质,不受组蛋白保护,修复系统功能不完善,比核DNA更易受诱变因素的损伤<sup>[10-11]</sup>.因而,易成为化学致癌物攻击的靶分子,其突变与细胞癌变之间的关系已引起重视<sup>[12]</sup>.肿瘤的发生涉及多因素多环节过程,研究者们不仅注意到核基因的变化,而且也注意到了核外遗传物质的变化.人类的线粒体基因组分成编码区和非

编码区,即D-环区. D-环区包括重链的复制起点等重要序列.线粒体DNA的结构特点及其在DNA复制和损伤修复方面的特性使他的突变率比核染色体高10-100倍<sup>[13-15]</sup>. Kornelia *et al*<sup>[16]</sup>对10个人类结直肠癌细胞系线粒体DNA序列分析后提出: D-环区是突变发生的热点.但不同的肿瘤,有关该区突变频率的报道存在明显差异<sup>[16-20]</sup>.我们的研究中,共检测到4个突变.与文献资料基本一致<sup>[20]</sup>. mtDNA突变可导致肿瘤,已为人们所公认,但机制尚不完全清楚.近年来,人们把目光逐渐转向mtDNA与核DNA的相互作用方面,试图找到其中的联系.结果发现,在一定条件下,mtDNA和核DNA序列可以在细胞内游走,形成二者部分遗传物质的交换或插入.有研究证实部分胃癌及其癌前病变细胞核基因组中存在mtDNA序列,提示mtDNA可整合到核基因组中,其意义值得进一步研究.我们推测这种整合至少可通过两条途径引起细胞癌变: (1)引起核基因组的不稳定性,抑制肿瘤抑制基因的活性或激活癌基因的活性; (2)改变细胞能量产生,提高线粒体氧化压力,引起线粒体酶表达异常和/或调控凋亡等途径来影响细胞的生物学行为,但以上推论尚需进一步研究来证实.多数消化系肿瘤具有高频率mtDNA细胞突变,突变型mtDNA易在各种癌的体液中检测到.由于他们的克隆特性和高拷贝数,线粒体突变可能为癌的非侵入性诊断提供一种有效分子标记<sup>[21]</sup>.

LST细胞线粒体D-环区是一个具有高度突变性和多态性的区域,该区域突变在其肿瘤发生和发展过程中的作用有待进一步研究. LST作为一种特殊形态的肿

瘤,其发生发展的机制及其与恶性肿瘤的联系尚不是很清楚,其线粒体的突变也可作为一个研究点,为消化系肿瘤的防治提供一条新的途径.

#### 4 参考文献

- 1 Jerry WS, Harold W. Are mitochondrial DNA mutations involved in the carcinogenic process? *Mutat Res* 1987;186:149-160
- 2 Luciane RC, Bertrand CL. Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis: are the mitochondria involved? *Mutat Res* 1998;398:19-26
- 3 Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, Keightley PD, Bishop SM, Clarke AR, Bird A. Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* 2002;297:403-405
- 4 Matsuda T, Vande Berg BJ, Bebenek K, Osheroff WP, Wilson SH, Kunkel TA. The base substitution fidelity of DNA polymerase beta-dependent single nucleotide base excision repair. *J Biol Chem* 2003;278:25947-25951
- 5 Servant L, Bieth A, Hayakawa H, Cazaux C, Hoffmann JS. Involvement of DNA polymerase beta in DNA replication and mutagenic consequences. *J Mol Biol* 2002;315:1039-1047
- 6 赖卓胜, 韩宇晶, 刘思德, 王亚东, 姜泊. 大肠侧向发育型肿瘤细胞株的建立及其鉴定. *解放军医学杂志* 2004;29:934-937
- 7 工藤进英. 早期大腸癌—平坦, 陷凹型. *东京: 医学书院* 1993;2-4
- 8 工藤进英. 侧方发育型肿瘤(Laterally spreading tumor; LST). 早期大腸癌. 1998;2:477-81
- 9 Takeuchi H, Fujimoto A, Hoon DS. Detection of mitochondrial DNA alterations in plasma of malignant melanoma patients. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:50-54
- 10 Tong BC, Ha PK, Dhir K, Xing M, Westra WH, Sidransky D, Califano JA. Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. *J Surg Oncol* 2003;82:170-173
- 11 Zhou S, Kachhap S, Singh KK. Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis* 2003;18:287-292
- 12 Hansel DE, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003;4:237-256
- 13 Wong LJ, Tan DJ, Bai RK, Yeh KT, Chang J. Molecular alterations in mitochondrial DNA of hepatocellular carcinomas: is there a correlation with clinicopathological profile? *J Med Genet* 2004;41:59-65
- 14 Solano A, Roig M, Vives-Bauza C, Hernandez-Pena J, Garcia-Arumi E, Playan A, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Ann Neurol* 2003;54:527-530
- 15 Liu CY, Lee CF, Hong CH, Wei YH. Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1011:133-145
- 16 Abnet CC, Huppi K, Carrera A, Armistead D, McKenney K, Hu N, Tang ZZ, Taylor PR, Dawsey SM. Control region mutations and the 'common deletion' are frequent in the mitochondrial DNA of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2004;4:27-30
- 17 Beretta S, Mattavelli L, Sala G, Tremolizzo L, Schapira AH, Martinuzzi A, Carelli V, Ferrarese C. Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain* 2004;127:2183-2192
- 18 Makiko SF, Henning U, Otavia LC. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumor and bodily fluids. *Science* 2000;287:2017-2019
- 19 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000;118:835-841
- 20 王平忠, 蒙世杰, 刘佩, 姚养正. 大鼠乳腺肿瘤线粒体基因突变研究. *中国病理生理杂志* 2001;17:297-301
- 21 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 2000;287:2017-2019

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

• 研究快报 •

## 法莫替丁与扑尔敏协同作用治疗幽门结扎胃溃疡的实验研究

覃珍, 陈超

覃珍, 陈超, 三峡大学医学院天然药物实验室 湖北省宜昌市 443002  
项目负责人: 陈超, 443002, 湖北省宜昌市大学路8号, 三峡大学医学院天然药物实验室. chaochen1954@163.com.  
电话: 0717-6397466  
收稿日期: 2004-09-23 接受日期: 2004-10-20

### 摘要

目的: 探讨H<sub>1</sub>阻滞剂扑尔敏、H<sub>2</sub>阻滞剂法莫替丁协同作用治疗幽门结扎胃溃疡的疗效.

方法: 建立幽门结扎致胃溃疡模型, 40只SD大鼠随机分为五组: 正常组、模型组、法莫替丁组(famotidin, FMD 4 mg/kg)、扑尔敏组(chlorpheniramine, CPA 10 mg/kg)、

联合用药组(FMD+CPA), 于给药3 d后造模, 造模3 h后处死搜集标本. 用肉眼、光镜观察胃标本的病理学改变, 按Okabe法改良法计算溃疡指数(UI); 滴定法测胃液酸度; 生化法测定肝组织匀浆中的髓过氧化物酶(MPO)的含量; 放免分析法测定血浆IL-8.

结果: 与模型组比较, FMD组与FMD+CPA联合组的溃疡指数均明显下降( $2.25 \pm 0.46$  vs  $3.75 \pm 0.46$ ,  $P=0.007<0.01$ ,  $1.75 \pm 0.46$  vs  $3.75 \pm 0.46$ ,  $P=0.002<0.01$ )胃酸度明显下降( $22 \pm 14.78$  vs  $50.63 \pm 19.03$  mmol/L,  $P=0.001<0.01$ ;  $20.6 \pm 17.57$  vs  $50.63 \pm 19.03$  mmol/L,  $P=0.0008<0.01$ ); FMD组与FMD+CPA组之间无差异( $P>0.05$ ), 提示FMD组



瘤,其发生发展的机制及其与恶性肿瘤的联系尚不是很清楚,其线粒体的突变也可作为一个研究点,为消化系肿瘤的防治提供一条新的途径.

#### 4 参考文献

- 1 Jerry WS, Harold W. Are mitochondrial DNA mutations involved in the carcinogenic process? *Mutat Res* 1987;186:149-160
- 2 Luciane RC, Bertrand CL. Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis: are the mitochondria involved? *Mutat Res* 1998;398:19-26
- 3 Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, Keightley PD, Bishop SM, Clarke AR, Bird A. Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* 2002;297:403-405
- 4 Matsuda T, Vande Berg BJ, Bebenek K, Osheroff WP, Wilson SH, Kunkel TA. The base substitution fidelity of DNA polymerase beta-dependent single nucleotide base excision repair. *J Biol Chem* 2003;278:25947-25951
- 5 Servant L, Bieth A, Hayakawa H, Cazaux C, Hoffmann JS. Involvement of DNA polymerase beta in DNA replication and mutagenic consequences. *J Mol Biol* 2002;315:1039-1047
- 6 赖卓胜, 韩宇晶, 刘思德, 王亚东, 姜泊. 大肠侧向发育型肿瘤细胞株的建立及其鉴定. *解放军医学杂志* 2004;29:934-937
- 7 工藤进英. 早期大腸癌—平坦, 陷凹型. *东京: 医学书院* 1993;2-4
- 8 工藤进英. 侧方发育型肿瘤(Laterally spreading tumor; LST). 早期大腸癌. 1998;2:477-81
- 9 Takeuchi H, Fujimoto A, Hoon DS. Detection of mitochondrial DNA alterations in plasma of malignant melanoma patients. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:50-54
- 10 Tong BC, Ha PK, Dhir K, Xing M, Westra WH, Sidransky D, Califano JA. Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. *J Surg Oncol* 2003;82:170-173
- 11 Zhou S, Kachhap S, Singh KK. Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis* 2003;18:287-292
- 12 Hansel DE, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003;4:237-256
- 13 Wong LJ, Tan DJ, Bai RK, Yeh KT, Chang J. Molecular alterations in mitochondrial DNA of hepatocellular carcinomas: is there a correlation with clinicopathological profile? *J Med Genet* 2004;41:59-65
- 14 Solano A, Roig M, Vives-Bauza C, Hernandez-Pena J, Garcia-Arumi E, Playan A, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. *Ann Neurol* 2003;54:527-530
- 15 Liu CY, Lee CF, Hong CH, Wei YH. Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1011:133-145
- 16 Abnet CC, Huppi K, Carrera A, Armistead D, McKenney K, Hu N, Tang ZZ, Taylor PR, Dawsey SM. Control region mutations and the 'common deletion' are frequent in the mitochondrial DNA of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2004;4:27-30
- 17 Beretta S, Mattavelli L, Sala G, Tremolizzo L, Schapira AH, Martinuzzi A, Carelli V, Ferrarese C. Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain* 2004;127:2183-2192
- 18 Makiko SF, Henning U, Otavia LC. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumor and bodily fluids. *Science* 2000;287:2017-2019
- 19 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000;118:835-841
- 20 王平忠, 蒙世杰, 刘佩, 姚养正. 大鼠乳腺肿瘤线粒体基因突变研究. *中国病理生理杂志* 2001;17:297-301
- 21 Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 2000;287:2017-2019

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

• 研究快报 •

## 法莫替丁与扑尔敏协同作用治疗幽门结扎胃溃疡的实验研究

覃珍, 陈超

覃珍, 陈超, 三峡大学医学院天然药物实验室 湖北省宜昌市 443002  
项目负责人: 陈超, 443002, 湖北省宜昌市大学路8号, 三峡大学医学院天然药物实验室. chaochen1954@163.com.  
电话: 0717-6397466  
收稿日期: 2004-09-23 接受日期: 2004-10-20

### 摘要

目的: 探讨H<sub>1</sub>阻滞剂扑尔敏、H<sub>2</sub>阻滞剂法莫替丁协同作用治疗幽门结扎胃溃疡的疗效.

方法: 建立幽门结扎致胃溃疡模型, 40只SD大鼠随机分为五组: 正常组、模型组、法莫替丁组(famotidin, FMD 4 mg/kg)、扑尔敏组(chlorpheniramine, CPA 10 mg/kg)、

联合用药组(FMD+CPA), 于给药3 d后造模, 造模3 h后处死搜集标本. 用肉眼、光镜观察胃标本的病理学改变, 按Okabe法改良法计算溃疡指数(UI); 滴定法测胃液酸度; 生化法测定肝组织匀浆中的髓过氧化物酶(MPO)的含量; 放免分析法测定血浆IL-8.

结果: 与模型组比较, FMD组与FMD+CPA联合组的溃疡指数均明显下降( $2.25 \pm 0.46$  vs  $3.75 \pm 0.46$ ,  $P=0.007<0.01$ ,  $1.75 \pm 0.46$  vs  $3.75 \pm 0.46$ ,  $P=0.002<0.01$ )胃酸度明显下降( $22 \pm 14.78$  vs  $50.63 \pm 19.03$  mmol/L,  $P=0.001<0.01$ ;  $20.6 \pm 17.57$  vs  $50.63 \pm 19.03$  mmol/L,  $P=0.0008<0.01$ ); FMD组与FMD+CPA组之间无差异( $P>0.05$ ), 提示FMD组

与FMD+CPA联合组治疗胃溃疡均疗效明显;但是FMD+CPA联合组与FMD组的大鼠血浆IL-8及肝组织MPO相比要明显低(IL-8:  $0.32 \pm 0.05$  vs  $0.47 \pm 0.08 \mu\text{g/L}$ ,  $P=0.024<0.05$ ; MPO:  $4.25 \pm 0.87$  vs  $8.17 \pm 1.29 \text{ U/L}$ ,  $P=0.017<0.01$ ),提示扑尔敏有抗炎作用,法莫替丁与扑尔敏联合应用抗炎作用显著。

**结论:**  $H_1$ 、 $H_2$ 受体阻滞剂协同作用治疗幽门结扎胃溃疡能取得良好的疗效,尤其抗炎作用显著,其机制与减少炎症因子的产生,减少对胃黏膜的损伤,改善胃黏膜血流有关。

覃珍, 陈超. 法莫替丁与扑尔敏协同作用治疗幽门结扎胃溃疡的实验研究. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2867-2871

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2867.asp>

## 0 引言

胃溃疡是一种世界性的常见病、多发病,总发病率可能占人口的10-12%,其发病原因及发病机制尚未完全阐明.但近年来发现胃酸分泌过多、幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染和胃黏膜保护作用减弱等因素是引起消化性溃疡的主要环节<sup>[1]</sup>.胃溃疡病灶中大量肥大细胞浸润<sup>[2]</sup>,肥大细胞受刺激释放组胺,作用于 $H_2$ 受体引起胃酸分泌,作用于 $H_1$ 受体引起血管扩张和通透性增高、炎性细胞浸润等炎症反应.组胺 $H_2$ 受体阻滞剂应用于胃溃疡的治疗,取得了良好的效果,对胃酸分泌的抑制率达到了60-95%,但治愈后溃疡易复发.国外研究表明,组胺 $H_1$ 受体阻滞剂能增加胃黏膜的血流,抑制炎症递质的产生,而减轻对胃黏膜的损害<sup>[3]</sup>.他还能影响细胞免疫反应,故由此推测组胺 $H_1$ 和 $H_2$ 受体阻滞剂协同作用既可以抑制胃酸的分泌,又能阻断组胺对胃黏膜的作用,从而具有减轻溃疡的形成及发展的作用.我们应用组胺 $H_1$ 受体阻滞剂扑尔敏(chlorpheniramine, CPA)和 $H_2$ 受体阻滞剂法莫替丁(famotidin, FMD)对大鼠胃溃疡进行研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ Sprague-Dawley 清洁级大鼠40只,180-220 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心.合格证号: TJLA-2004-159.自由摄食饮水,12 h明/12 h暗(光照时间6:00-18:00),22-30 °C条件下饲养1 wk后实验.法莫替丁注射液,上海信谊金朱药业有限公司,批号: 031003;扑尔敏注射液,批号: 2004031644.硫喷妥钠注射液;批号: 010017;IL-8放射免疫分析测定盒(购自北京北方生物技术研究所);髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(购自南京建成生物工程研究所);其余试剂均为市售分析纯产品.721分光光度计,上海第三分析仪器厂;放免测量仪器采用上海核辐射光电仪器有限公司SN-695型智能放射免疫 $\gamma$ 计数器。

**1.2 方法** 采用幽门结扎型大鼠胃溃疡模型<sup>[4]</sup>. ♂ SD大鼠40只每组8只,随机分为五组: 正常组(blank)、模

型组(control 等容生理盐水)、法莫替丁组(FMD 4 mg/kg、扑尔敏组(CPA 10 mg/kg)、联合组(FMD+CPA, 剂量同上).分别按上述剂量连续给药3 d, ip1次/d.于第2 d开始禁食不禁水,共48 h,末次给药后用10 g/L硫喷妥钠麻醉下开腹结扎幽门,缝合腹壁切口.3 h后开腹、胸,心脏采血6 mL至试管4 °C静置.5 500 r/min,离心15 min,分离血浆于-70 °C保存待测相关指标;胸腔剪断胃管,经此抽空胃液至试管,然后注入40 g/L的甲醛4 mL固定,贴标签.记录胃液量,以1 500 r/min离心10 min,取上清液用滴定法测定胃液总酸度,计算总酸排出量。

**1.2.1 胃酸度的测定** 胃酸测定<sup>[5]</sup>:用移液管取胃液上清液0.5 mL于锥形瓶中,加入1滴酚酞指示剂,用0.01 mol/L的NaOH滴定至胃液先呈黄色再转为红色2 s内不消失为终点,记录消耗的NaOH的毫升数。

胃酸浓度(mmol/L) = NaOH滴定消耗的毫升数  $\times 10 \times$  稀释倍数

**1.2.2 胃损伤指数的测定** 将大鼠处死,向胃内注入10 mL 40 g/L 甲醛,取出胃并置同一浓度甲醛中充分固定.沿胃大弯剪开,轻轻洗去胃内容物,按Okabe指数评定法计算出胃黏膜损伤指数(ulcer index, UI).溃疡标准参照Okabe法改良<sup>[6]</sup>.0分:无损伤;1分:红肿;2分:轻度损伤,1-7个小溃疡,直径或长度 $< 3 \text{ mm}$ ;3分:较大损伤,1-3个大溃疡,直径或长度 $> 3 \text{ mm}$ ,或多于7个小溃疡;4分:严重损伤,多于3个大溃疡;5分:溃疡穿孔.常规计算溃疡发生率、溃疡指数及溃疡抑制率.资料行组间 student-t 检验.溃疡程度:按病变情况,分为4级:一级(糜烂):d(溃疡直径) $< 1 \text{ mm}$ ;二级(小溃疡): $1 \text{ mm} < d < 3 \text{ mm}$ ;三级(大溃疡): $d > 3 \text{ mm}$ ;四级(有穿孔)。

**1.2.3 血白介素-8(IL-8)采用放射免疫学方法测IL-8**,试剂盒购于北京北方生物技术研究所.按碘标记的IL-8放免试剂盒要求操作,用 $\gamma$ -闪烁仪测放射性,并换算为 $\mu\text{g/L}$ 。

**1.2.4 髓过氧化物酶(MPO)采用比色法,测定原理:**中性白细胞中存在有髓过氧化物酶,每个细胞所含的酶的量是一定的,约占细胞干重的5%,该酶具有使过氧化氢还原的能力,利用这一特点可以分析酶的活力,并定量测定中性白细胞的数目.通过供氢体邻连茴香胺供氢后生成黄色化合物,在460 nm处通过比色测定此产物的生成量,从而推算出MPO的活力及 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的减少量和白细胞的数目.药盒由南京生物建成有限公司提供,按试剂说明进行操作,于721型分光光度计上读取A值,通过计算获得结果。

**统计学处理** 采用SPSS软件10.0版本进行数据统计处理,计量资料描述方法采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,对两个变量之间计量资料的比较进行t检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

2.1 如表1所示,模型组与正常组的溃疡指数相比明显

大,有显著意义( $P < 0.01$ ),提示造模成功.

2.2 肉眼观胃黏膜病变浅表,散在分布,直径0.1-1 cm,伴点状、片状或条状出血,或呈大小不等的淤点、淤斑.糜烂底部多有出血或被以血痂,有时外观呈黑褐色.镜下病变黏膜表面细胞可出现空泡变性、坏死、溶解和脱落,致使黏膜面连续破坏.黏膜固有层可出现明显的充血、水肿、红细胞渗出或出血,严重时波及黏膜下层和肌层(图1-2).

2.3 FMD组与FMD+CPA联合组的溃疡指数和胃酸度与模型组比较有显著差异性( $P < 0.01$ ),FMD组与FMD+CPA联合组之间无显著差异性,但联合组的胃酸度的

值要低一些,溃疡抑制率要高一些;CPA组的溃疡指数与模型组比较无显著差异性(表1).

2.4 与FMD组相比,FMD+CPA联合组的IL-8、MPO要明显低,有显著差异性( $P < 0.05$ ),提示扑尔敏有抗炎作用,法莫替丁与扑尔敏联合应用抗炎作用显著(表1).

### 3 讨论

胃溃疡的病因迄今仍未明确,由于这一原因使临床治疗远未达到预期目的.随着对胃溃疡的深入研究,人们对细胞因子在胃溃疡发病中的作用有了进一步的认识.细胞因子不仅能引起炎症细胞的聚集与活化,刺激胃

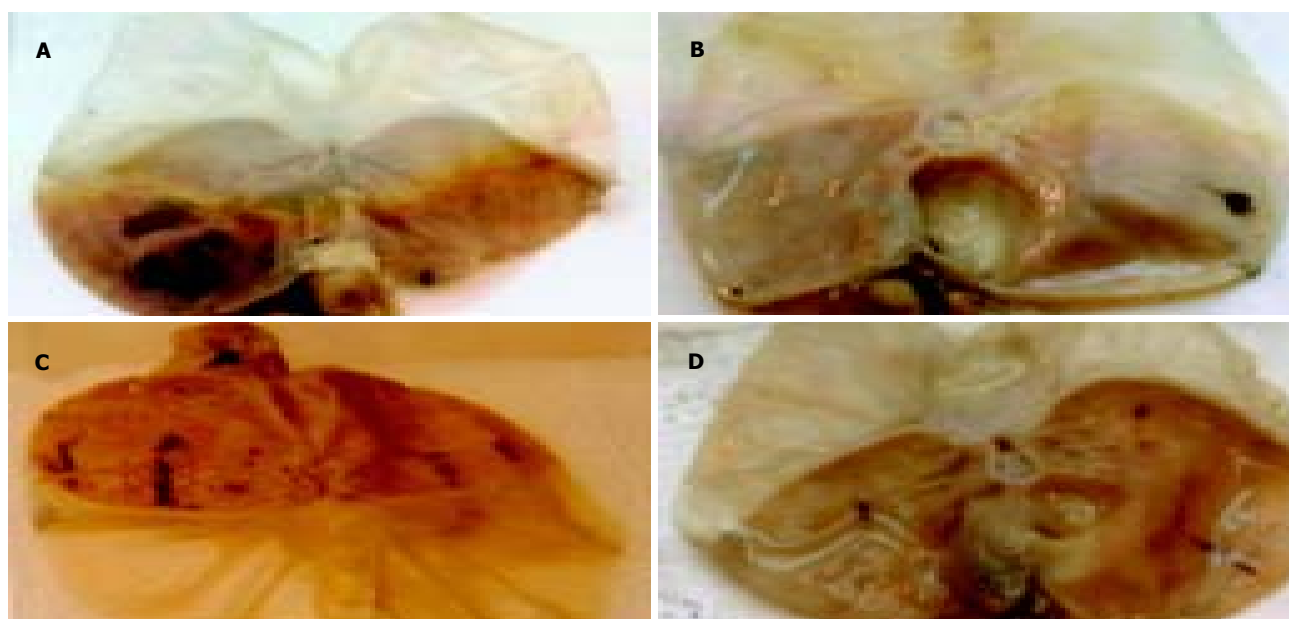


图1 幽门结扎型大鼠胃溃疡的肉眼观. A: 模型组; B: FMD; C: CPA; D: FMD+CPA.

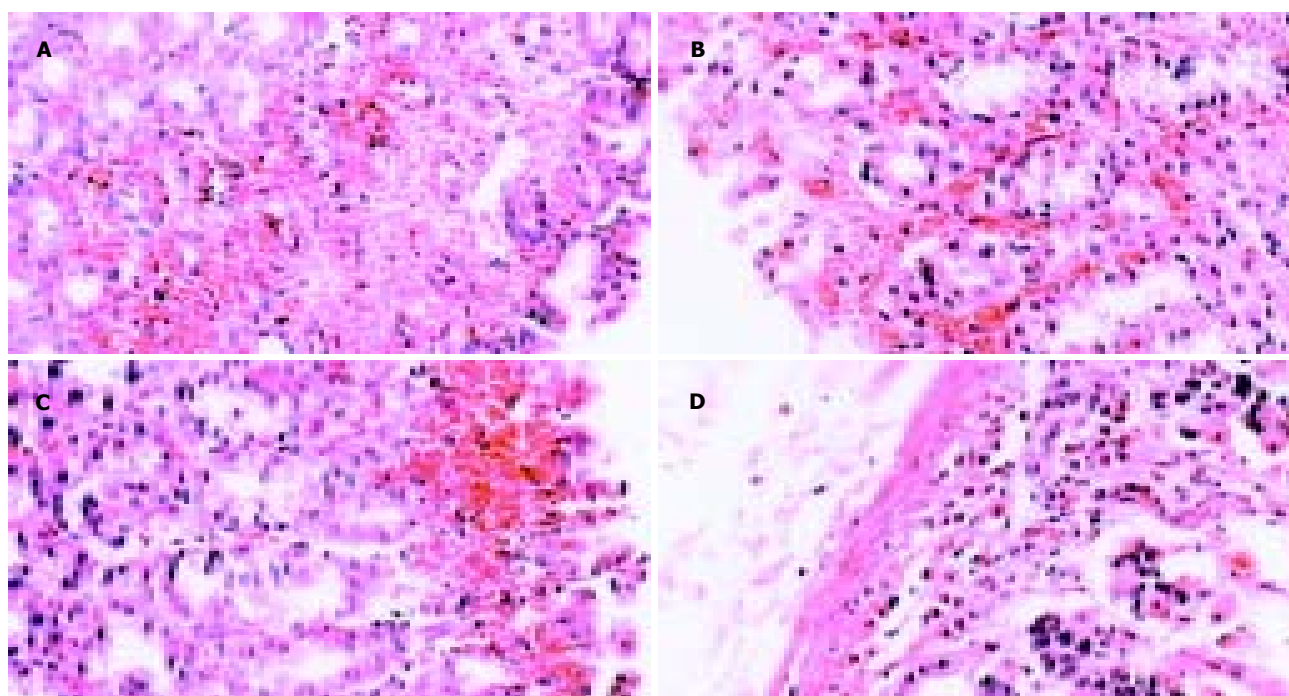


图2 幽门结扎型大鼠胃溃疡的显微镜下的特点 HE  $\times 200$ . A: 模型组胃黏膜H&E染色; B: FMD组胃黏膜H&E染色; C: CPA组胃黏膜H和E染色; D: FMD+CPA组胃黏膜H和E染色.

表1 FMD 和CPA 联合应用治疗胃溃疡的结果 (mean  $\pm$  SD,  $n = 8$ )

分组	剂量(mg/kg)	溃疡指数	溃疡抑制率(%)	胃酸度 mmol/L	IL-8 ( $\mu$ g/L)	MPO ( $\mu$ /L)
正常组	0		100	27.5 $\pm$ 13.1	0.29 $\pm$ 0.08	3.06 $\pm$ 0.32
模型组	等容量	3.75 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>		50.63 $\pm$ 19.03 <sup>a</sup>	0.67 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	9.13 $\pm$ 2.72 <sup>b</sup>
FMD	4	2.25 $\pm$ 0.46 <sup>d</sup>	40	22 $\pm$ 14.78 <sup>d</sup>	0.47 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	8.17 $\pm$ 1.29
CPA	10	3.63 $\pm$ 0.52	3.33	54.88 $\pm$ 15.82	0.4 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	5.7 $\pm$ 0.92 <sup>d</sup>
FMD+CPA	同上	1.75 $\pm$ 0.46 <sup>d</sup>	53.33	20.6 $\pm$ 17.57 <sup>d</sup>	0.32 $\pm$ 0.05 <sup>de</sup>	4.25 $\pm$ 0.87 <sup>de</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs blank; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs control; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs FMD.

泌素的释放增加,还能通过刺激前列腺素和生长抑素的释放,减少酸的分泌而抑制溃疡的生成.由细胞因子引发了炎症细胞、胃泌素、前列腺素、生长抑素及酸分泌的调节,于是这些因素的失衡决定了胃溃疡的临床表现<sup>[7]</sup>.可见细胞因子是造成胃黏膜损害、胃溃疡的重要直接因素.国内外许多研究证实炎症细胞因子在胃肠黏膜损害中发挥了重要作用,主要有血小板活化因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)和粒-单核细胞克隆刺激因子.其机制与以下因素有关<sup>[8]</sup>: (1)通过增加血管通透性,引起血压下降和血管收缩,减少胃肠黏膜血流量; (2)作用于胃肠道中的中性粒细胞,使其活化、粘附、游出,通过“呼吸爆发”产生氧自由基、白三烯(LTs)等炎性递质,释放消化酶,引起胃肠黏膜损害; (3)血小板活化因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素 I (IL-1)和粒-单核细胞克隆刺激因子等相互诱导、合成、释放和协同作用,引起血管组织损伤的正反馈,PAF 和 TNF 在开始阶段起着关键作用; (4)细菌内毒素也是致胃肠黏膜损伤的重要因子,PAF 可与内毒素协同作用引起胃肠黏膜损伤上. LTs 可明显收缩胃黏膜下微血管,导致黏膜充血、血浆外渗、血流淤滞和血流量下降,最终导致胃黏膜缺血. IL-8 是一种化学因子,分子质量约为 8 ku,主要由单核巨噬细胞、血管内皮细胞等受到细菌脂多糖(LPS)、TNF、IL-1 等刺激产生,可趋化和激活中性粒细胞,后者在炎症中起重要作用<sup>[9]</sup>.胃黏膜上皮细胞和单核巨噬细胞分泌的 IL-8 以及其他趋化因子可趋化和激活炎症细胞,使他们从血管内移行至胃上皮处,导致炎症反应<sup>[10-11]</sup>. MPO 活性是间接反映炎症程度的重要指标<sup>[12]</sup>.

幽门结扎法为 Shay' s 传统经典大鼠胃溃疡模型法,因其发病机制、病理表现与人类胃溃疡相似,常用于胃溃疡治疗药物的筛选与评价.结扎幽门后,胃液滞留胃中,胃壁防御能力减弱,导致溃疡形成.溃疡多为圆形或椭圆形.此法方法可靠,重复性好,省时.胃幽门结扎后,胃液酸度增加, H<sup>+</sup> 逆向弥散入黏膜组织内的刺激肥大细胞脱颗粒,释放组胺、LTs 等炎性递质.组胺兴奋胃黏膜下小动脉 H<sub>1</sub> 受体,使毛细血管前括约肌扩张、微血管收缩,导致毛细血管后静脉内压力升高、毛细血管前括约肌和小动脉后的血管运动减弱,最终引起胃黏膜充血、微血管通透性增加,

并造成胃黏膜水肿、黏膜有效灌注压下降进而加重胃黏膜缺血,同时造成胃内 H<sup>+</sup> 更加增高<sup>[13]</sup>.此外,在酸性增强的环境下又刺激活化胃蛋白酶元引起自身消化,从而有利于溃疡的发生,故组胺在胃溃疡的形成中发挥了重要作用. H<sub>2</sub>受体阻滞剂治疗胃溃疡已得到公认,但复发率较高.我们联合应用 H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub> 受体阻滞剂证实疗效更好.

H<sub>1</sub> 受体阻滞剂是一类能竞争性拮抗组胺,与特异性的 H<sub>1</sub> 受体结合而发挥作用的药物.他们主要应用于抗变态反应性疾病.近年来国外最新研究表明, H<sub>1</sub> 受体阻滞剂除具有上述作用外,还表现出较强的抗炎和免疫调节活性. Cook *et al*<sup>[14]</sup>研究了不同浓度的 H<sub>1</sub> 受体阻滞剂 olopatadine, 用于处理人眼结膜上的肥大细胞,然后用抗 IgE 抗体致敏,测定肥大细胞脱颗粒释放 TNF 的量,结果发现 olopatadine 剂量依赖性减少 TNF 的生成量,其 IC<sub>50</sub> = 13.1 microM, IC<sub>0</sub> = 3 micro M,说明 olopatadine 通过减少 TNF 的生成而具有抗炎及抗变态反应的作用; Bakker *et al*<sup>[15]</sup>报道 H<sub>1</sub> 受体作为核因子激活机制的一个部分或完全作为激动剂来激活转录因子. Miki *et al*<sup>[16]</sup>研究发现组胺能剂量依赖性增强 TNF- $\alpha$  诱导的 E- 选择素和细胞内黏附分子的表达,且此种作用能被 H<sub>1</sub> 受体阻滞剂美吡拉明、苯海拉明阻滞, H<sub>2</sub> 受体阻滞剂雷尼替丁没有此作用. Arnold *et al*<sup>[17]</sup>研究证实西替利嗪能减少 IL-8 的释放,其机制是降低 IL-8 的基因表达来实现.而我们的实验显示, FMD+CPA 显著减轻大鼠胃黏膜损伤程度,明显减少炎症因子 IL-8 的产生,表现出明显的胃黏膜损伤保护作用,而且 FMD+CPA 联合明显降低 MPO 活性,显示出较好的抗炎效果,与国外报道结果一致.

总之,联合应用 H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub> 受体阻滞剂治疗胃溃疡能取得良好的疗效,其机制与减少炎症因子的损伤,改善胃黏膜血流有关.

#### 4 参考文献

- 1 陈灏珠. 实用内科学. 第 11 版; 北京: 人民卫生出版社, 2001:1741
- 2 张海燕, 吴淑珍, 李剑敏, 方军. 胃癌和胃溃疡间质中肥大细胞的研究. 温州医学院学报 1995;2:74-76
- 3 Ohta Y, Kobayashi T, Ishiguro I. Role of endogenous serotonin and histamine in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in unanaesthetised rats with a single treatment of compound 48/80, a mast cell degranulator. *Pharmacol Res* 1999;39:261-267

- 4 王凌娟, 张雯. 胃溃疡及实验性胃溃疡模型. 中国烧伤创疡杂志 2000;43:66-69
- 5 陈奇. 中药药理实验方法. 人民卫生出版社, 1994:99-100
- 6 余书勤, 安鲁凡, 单世明. 瑞巴匹特对大鼠急性胃溃疡的黏膜保护作用. 中国新药杂志 1998;7:474-476
- 7 Lehmann FS, Stalder GA. Hypotheses on the role of cytokines in peptic ulcer disease. *Eur J Clin Invest* 1998;28:511-519
- 8 胡根林, 郭汉身. 血小板活化因子与胃肠损伤. 国外医学·消化系统疾病分册 1995;15:17-19
- 9 Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Increased production of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996;39:684-689
- 10 Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappaB in gastric epithelial cells. *J Immunol* 1998;160:2401-2407
- 11 Crabtree JE. Role of cytokine in pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. *Dig Dis Sci* 1998;43(9 Suppl):46-55
- 12 Li JH, Yu JP, He XF, Xu XM. Expression of NF- $\kappa$ B in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:214-218
- 13 湛先保. 应激性溃疡发病机制. 第二军医大学 1998;19:461
- 14 Cook EB, Stahl JL, Barney NP, Graziano FM. Olopatadine inhibits TNF $\alpha$  release from human conjunctival mast cells. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:504-508
- 15 Bakker RA, Schoonus SB, Smit MJ, Timmerman H, Leurs R. Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 2001;60:1133-1142
- 16 Miki I, Kusano A, Ohta S, Hanai N, Otsoshi M, Masaki S, Sato S, Ohmori K. Histamine enhanced the TNF- $\alpha$ -induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. *Cell Immunol* 1996;171:285-288
- 17 Arnold R, Rihoux J, König W. Cetirizine counter-regulates interleukin-8 release from human epithelial cells (A549). *Clin Exp Allergy* 1999;29:1681-1691

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

• 研究快报 •

## 益气健脾药物血清对离体脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合作用的影响及机制

隋 峰, 王汝俊, 王建华, 杜 群, 许 琦

隋峰, 王汝俊, 王建华, 杜群, 广州中医药大学脾胃研究所  
广东省广州市 510405

许琦, 中山大学在站博士后 广东省广州市 510089

项目负责人: 王汝俊, 510405, 广东省广州市白云区三元里12号, 广州中医药大学脾胃研究所. piWeiYaoL@gzhctm.edu.cn

电话: 020-36585555 传真: 020-36585563

收稿日期: 2004-10-18 接受日期: 2004-11-04

### 摘要

目的: 观察益气健脾药物血清对离体脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合作用的影响并探讨其相关机制。

方法: 采用血清药理学方法和放射配基受体结合测定技术分别对正常、脾虚、药物血清作用后的大鼠壁细胞结合位点数进行检测, 并对补中益气汤含药血清抑制大鼠胃泌素与其受体结合的抑制率进行了测定。

结果: 脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合容量明显少于正常大鼠( $876.0 \pm 88.2$  vs  $1\,071.1 \pm 102.1$ ,  $P < 0.01$ ); 补中益气汤药物血清作用后结合位点数明显上升( $980.4 \pm 89.2$  vs  $876.0 \pm 88.2$ ,  $P < 0.05$ ); 党参及白术药物血清组作用后结合位点数也有上升趋势, 但与脾虚组相比差异不显著; 补中益气汤含药血清部分抑制大鼠胃泌素与其受体的结合(抑

制率 =  $42.9\% > 30\%$ )。

结论: 益气健脾药物血清对脾虚大鼠的结合位点数下降具有上调作用; 其机制可能与其同胃泌素受体的竞争结合相关。

隋峰, 王汝俊, 王建华, 杜群, 许琦. 益气健脾药物血清对离体脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合作用的影响及机制. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2871-2873  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2871.asp>

### 0 引言

壁细胞是存在于胃黏膜上的高度分化的终末细胞, 由于壁细胞的培养不会传代, 且以每日 5-10% 的速度死亡<sup>[1-2]</sup>, 因此对壁细胞的研究多数采用即时分离。我室自 1999 年建立壁细胞的分离和纯化方法后, 对脾虚大鼠壁细胞在整体实验的基础上进行了一系列的研究。为进一步深入探讨, 我们尝试采用血清药理学方法在原有整体实验的基础上对即时分离的脾虚及经益气健脾药物血清作用后的离体大鼠壁细胞胃泌素受体结合容量进行了测定, 并对其作用机制进行了初步探讨, 旨在从不同角度采用不同方法深入和全面阐释脾虚证的分子病理机制<sup>[3]</sup>。

- 4 王凌娟, 张雯. 胃溃疡及实验性胃溃疡模型. 中国烧伤创疡杂志 2000;43:66-69
- 5 陈奇. 中药药理实验方法. 人民卫生出版社, 1994:99-100
- 6 余书勤, 安鲁凡, 单世明. 瑞巴匹特对大鼠急性胃溃疡的黏膜保护作用. 中国新药杂志 1998;7:474-476
- 7 Lehmann FS, Stalder GA. Hypotheses on the role of cytokines in peptic ulcer disease. *Eur J Clin Invest* 1998;28:511-519
- 8 胡根林, 郭汉身. 血小板活化因子与胃肠损伤. 国外医学·消化系统疾病分册 1995;15:17-19
- 9 Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Increased production of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996;39:684-689
- 10 Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappaB in gastric epithelial cells. *J Immunol* 1998;160:2401-2407
- 11 Crabtree JE. Role of cytokine in pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. *Dig Dis Sci* 1998;43(9 Suppl):46-55
- 12 Li JH, Yu JP, He XF, Xu XM. Expression of NF-kB in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:214-218
- 13 湛先保. 应激性溃疡发病机制. 第二军医大学 1998;19:461
- 14 Cook EB, Stahl JL, Barney NP, Graziano FM. Olopatadine inhibits TNFalpha release from human conjunctival mast cells. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:504-508
- 15 Bakker RA, Schoonus SB, Smit MJ, Timmerman H, Leurs R. Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 2001;60:1133-1142
- 16 Miki I, Kusano A, Ohta S, Hanai N, Otsoshi M, Masaki S, Sato S, Ohmori K. Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. *Cell Immunol* 1996;171:285-288
- 17 Arnold R, Rihoux J, König W. Cetirizine counter-regulates interleukin-8 release from human epithelial cells (A549). *Clin Exp Allergy* 1999;29:1681-1691

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

• 研究快报 •

## 益气健脾药物血清对离体脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合作用的影响及机制

隋 峰, 王汝俊, 王建华, 杜 群, 许 琦

隋峰, 王汝俊, 王建华, 杜群, 广州中医药大学脾胃研究所  
广东省广州市 510405

许琦, 中山大学在站博士后 广东省广州市 510089

项目负责人: 王汝俊, 510405, 广东省广州市白云区三元里12号, 广州中医药大学脾胃研究所. piWeiYaoL@gzhctm.edu.cn

电话: 020-36585555 传真: 020-36585563

收稿日期: 2004-10-18 接受日期: 2004-11-04

### 摘要

目的: 观察益气健脾药物血清对离体脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合作用的影响并探讨其相关机制。

方法: 采用血清药理学方法和放射配基受体结合测定技术分别对正常、脾虚、药物血清作用后的大鼠壁细胞结合位点数进行检测, 并对补中益气汤含药血清抑制大鼠胃泌素与其受体结合的抑制率进行了测定。

结果: 脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合容量明显少于正常大鼠( $876.0 \pm 88.2$  vs  $1071.1 \pm 102.1$ ,  $P < 0.01$ ); 补中益气汤药物血清作用后结合位点数明显上升( $980.4 \pm 89.2$  vs  $876.0 \pm 88.2$ ,  $P < 0.05$ ); 党参及白术药物血清组作用后结合位点数也有上升趋势, 但与脾虚组相比差异不显著; 补中益气汤含药血清部分抑制大鼠胃泌素与其受体的结合(抑

制率 =  $42.9\% > 30\%$ )。

结论: 益气健脾药物血清对脾虚大鼠的结合位点数下降具有上调作用; 其机制可能与其同胃泌素受体的竞争结合相关。

隋峰, 王汝俊, 王建华, 杜群, 许琦. 益气健脾药物血清对离体脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合作用的影响及机制. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2871-2873  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2871.asp>

### 0 引言

壁细胞是存在于胃黏膜上的高度分化的终末细胞, 由于壁细胞的培养不会传代, 且以每日 5-10% 的速度死亡<sup>[1-2]</sup>, 因此对壁细胞的研究多数采用即时分离. 我室自 1999 年建立壁细胞的分离和纯化方法后, 对脾虚大鼠壁细胞在整体实验的基础上进行了一系列的研究. 为进一步深入探讨, 我们尝试采用血清药理学方法在原有整体实验的基础上对即时分离的脾虚及经益气健脾药物血清作用后的离体大鼠壁细胞胃泌素受体结合容量进行了测定, 并对其作用机制进行了初步探讨, 旨在从不同角度采用不同方法深入和全面阐释脾虚证的分子病理机制<sup>[3]</sup>.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley ♂ 大鼠, 体重  $200 \pm 20$  g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 合格证号: scxk (粤)2003-0001. 试剂:  $^{125}\text{I}$ -胃泌素购自中国原子能科学研究院, 比活度为  $1\ 700\ \text{ci}/\text{mmol}$ , 放化纯度大于 95%. 胃泌素标准品及链霉蛋白酶由北京鼎国试剂公司提供 (Sigma 生产). 主要仪器及设备: 5500 型  $\gamma$  计数器 (Beckman), HYS-4 多头细胞收集器 (上海跃进医疗器械厂), HZS-H 恒温水浴振荡器 (哈尔滨东联电子有限公司), XDS-1 倒置显微镜 (重庆光电仪器厂), TDZ5-WS 自动平衡离心机 (长沙湘仪离心机仪器公司), 多头磁力搅拌器 (常州国华电器厂).

### 1.2 方法

1.2.1 药物及含药血清的制备 补中益气汤依中国药典的处方, 采用常规方法制备成 100% 水提液; 党参、白术制备成 66% 水提液. 按  $1\ \text{mL}/100\ \text{g}$ , 连续给药 5 d, 1 次/d, 空白血清组给予等量的生理盐水, 末次给药后 2 h, 眶静脉丛穿刺采血, 室温静置 2 h 后,  $3\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 、10 min、离心分离血清, 0.22 微孔滤膜过滤除菌, 置冰箱中保存备用<sup>[4-5]</sup>.

1.2.2 动物分组及模型的制备 大鼠随机分成正常和脾虚模型组, 模型的制备采用我室常规方法, 用 100% 的大黄浸液灌胃, 按  $1\ \text{mL}/100\ \text{g}$ , 连续给药 10 d, 2 次/d, 正常组给予等量的生理盐水. 以上各组均常规喂养, 自由饮水, 第 11 d 处死动物, 分离胃壁细胞.

1.2.3 大鼠胃壁细胞的分离与纯化 在本室以往基础上加以改进<sup>[6]</sup>. 大鼠脱颈椎处死, 剖腹取胃, 结扎贲门和幽门. 在胃底部做一小切口, 用玻璃棒将胃袋翻转, 然后在胃底与胃体之间结扎, 弃去胃底, 用生理盐水将胃袋冲洗干净. 把预先配制好的链霉蛋白酶 (Pronase) 液约  $2.5\ \text{mL}$  ( $1\ \text{g}/\text{L}$ ) 注入胃袋. 然后将胃袋放入预先通氧的 Medium A (MA) 中, 在  $37\ ^\circ\text{C}$  水浴消化 30 min 后转入 Medium B (MB) 中, 用磁力搅拌器搅拌两次, 各 10 min, 收集每次 MB 中打下的细胞悬液; 重新将胃袋放入新的 MA 中孵育 20 min, 再用新的 MB 搅拌两次, 各 10 min, 收集每次 MB 中打下的细胞悬液; 然后再将胃袋放入新的 MA 中孵育 10 min, 用 MB 搅拌两次, 各 10 min, 收集每次 MB 中打下的细胞悬液. 所有收集到的细胞悬液均用 200 目尼龙网过滤, 过滤液  $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 、离心 5 min, 倾出上清液, 沉淀用 Medium C (MC) 混悬以供纯化. 孵育过程皆充以  $950\ \text{mL}/\text{L}\ \text{O}_2 + 50\ \text{mL}/\text{L}\ \text{CO}_2$ . 取  $10\ \text{mL}$  专用离心管, 用吸管在管底分别铺  $2\ \text{mL}$  预先配制好的 60% 和 40% Percoll 液制成不连续密度梯度分离液, 将细胞悬液  $1\ \text{mL}$  左右铺在最上层, 然后  $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $2\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 、离心 20 min 进行纯化, 收集 40% 与 60% Percoll 交界面处的壁细胞, MC 洗两次, 再用 MC 混悬备用.

### 1.2.4 胃泌素受体放射配基结合实验

#### 1.2.4.1 益气健脾药物血清对脾虚大鼠离体壁细胞胃泌

素受体结合容量的影响 将正常大鼠纯化后的细胞悬液作为正常组, 脾虚大鼠纯化后的细胞悬液随机分为模型组、补中益气汤治疗组、党参治疗组及白术治疗组, 正常及脾虚组给予终浓度  $200\ \text{mL}/\text{L}$  的空白血清, 补中益气汤治疗组、党参治疗组及白术治疗组分别给予等量的药物血清,  $37\ ^\circ\text{C}$  作用 20 min 后, 用 MC 将细胞洗涤两次, 然后用白细胞计数板在倒置显微镜下将细胞浓度调整为  $1 \times 10^9\ \text{cells}/\text{L}$ , 供放射配基结合实验用. 操作规程及运算参照本室建立的常规方案稍加改进<sup>[7]</sup>, 根据预试 (多点饱和实验) 确定  $^{125}\text{I}$ -胃泌素放射配基的近饱和终浓度为  $100\ \text{pmol}/\text{L}$ , 并以此为基础做单点结合实验, 加样顺序如下 (表 1).

表 1 胃泌素受体放射配基结合实验的加样 ( $\mu\text{L}$ )

	$^{125}\text{I}$ -胃泌素	MC	非标记胃泌素	细胞悬液
总结合管 (TB)	10	10	—	180
非特异性结合管 (NSB)	10	—	10	180

加样后  $37\ ^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 加冰冷的 MC  $720\ \mu\text{L}$  终止反应, 迅速用多头细胞收集器收集至玻璃纤维滤膜 3 次. 烘干滤膜后, 置于  $\gamma$  计数器测量放射性. 特异性结合 (SB) = 总结合 (TB) - 非特异性结合 (NSB). 以上均各做三个复管. 特异结合位点数由以下公式求出: 位点数 (单个细胞) = (特异结合  $\times 6.022 \times 10^{23}$ ) / (计数效率  $\times 2.2 \times 10^6 \times$  放射比活度  $\times$  放化纯度  $\times 10^9 \times$  细胞总数).

1.2.4.2 补中益气汤含药血清对大鼠离体壁细胞胃泌素受体结合的抑制作用 根据预试确定胃泌素受体放射配基的饱和终浓度为  $100\ \text{pmol}/\text{L}$ , 并以此为基础做单点结合实验, 非特异结合管加入 1 000 倍非标记胃泌素, 竞争结合测定管分别加入空白和补中益气汤含药血清 (终浓度  $200\ \text{mL}/\text{L}$ ), 加样步骤如下 (表 2).

表 2 胃泌素受体放射配基结合实验加样 ( $\mu\text{L}$ )

	胃泌素	MC	竞争剂	细胞悬液
总结合管 (TB)	10	10	—	180
非特异结合管 (NSB)				
或竞争结合测定管 (TB <sub>0</sub> )	10	—	10	180

加样后操作同上. 相对结合率 =  $(\text{TB}_0 - \text{NSB}) / (\text{TB} - \text{NSB}) \times 100\%$ . 抑制率 =  $1 -$  相对结合率. 结果判断: 抑制率  $> 30\%$ , 有活性; 抑制率  $0 - 30\%$ , 无活性<sup>[8]</sup>.

统计学处理 采用统计软件 SPSS11.0 分析. 实验数据均以  $\text{mean} \pm \text{MD}$  表示, 用  $t$  检验处理,  $P < 0.05$  为有统计学差异.

## 2 结果

2.1 益气健脾药物血清对脾虚大鼠离体壁细胞胃泌素受体结合容量的影响 脾虚大鼠壁细胞胃泌素受体结合容



量明显低于正常大鼠( $P<0.01$ ), 补中益气汤治疗组结合位点数明显回升, 与脾虚组比较差异显著( $P<0.05$ ), 党参、白术药物治疗组结合位点数也有上升趋势, 但与脾虚组相比差异不显著( $P>0.05$ , 表3)。

表3 大鼠离体壁细胞胃泌素受体结合位点数

组别	<i>n</i>	位点数
正常对照组	10	1 071.1 ± 102.1
脾虚模型组	10	876.0 ± 88.2 <sup>a</sup>
补中益气汤组	10	980.4 ± 89.2 <sup>b</sup>
党参组	10	921.0 ± 80.0
白术组	10	918.5 ± 84.6

<sup>a</sup> $P<0.01$  vs 正常对照组; <sup>b</sup> $P<0.05$  vs 脾虚模型组。

2.2 补中益气汤含药血清对大鼠离体壁细胞胃泌素受体结合的抑制作用 补中益气汤含药血清的抑制率减去空白血清的影响后仍大于30%, 表明补中益气汤能与<sup>125</sup>I-胃泌素竞争大鼠壁细胞胃泌素受体的特异性结合(表4)。

表4 大鼠离体壁细胞胃泌素受体结合的抑制率

组别	剂量(%)	抑制率(%)
空白对照组	20	-27.0
补中益气汤组	20	-69.9

### 3 讨论

胃泌素是一种重要的内分泌激素, 既可刺激胃黏膜细胞的增生, 维持胃黏膜的完整性; 又能作为胃酸分泌的主要刺激因子而刺激酸分泌, 胃泌素与其受体的正常结合和受体的良好介导是壁细胞泌酸功能得以正常发挥的前提和保证<sup>[9-10]</sup>。本研究及以往整体实验一致揭示<sup>[11]</sup>：脾虚大鼠胃泌素受体结合容量明显低于正常大鼠。脾虚状态下单纯的胃泌素受体结合容量的减少会导致受体后的信号减弱而引起酸分泌功能低下(下调), 这与我室前期的研究结果—脾虚大鼠基础泌酸功能低下相吻合。而我们以往的研究还表明脾虚状态下壁细胞胃泌素受体亲和力增加<sup>[11]</sup>, 提示壁细胞胃泌素刺激酸分泌通路在受体这个环节可能产生了敏感性增强而使其减弱的功能出现了代偿(上调), 这又为我们对脾虚证研究得出的“基础状态酸分泌低下, 受刺激后亢进”的结论(文章待发表)提供了受体水平上的依据, 壁细胞分泌的胃酸在病理情况下又可作为攻击因子而与溃疡病的产生关系密切, 因此我们推测脾虚大鼠胃泌素受体结合容量及亲和力的改变有可能是我们临床上观察到的脾虚证患者易患消化性溃疡性疾病及实验性脾虚大鼠胃黏膜易损性增高在受体水平上的病理机制之一, 胃泌素受体的异常介导可能参与了脾虚证的病理形成过程。

血清药理学方法是由日本学者田代真一首先创建和命名的, 由于他克服了整体实验影响因素多, 用药时间长等缺点, 同时又避免了直接加药非有效成分的干扰, 因此该方法一经建立便迅速得到了医药界的广泛应用<sup>[12-13]</sup>。但此方法应用于壁细胞也应注意以下几点: 首先在制备含药血清时, 从动物体内取出的血清要在常温(15–25 °C)下放置至少2 h以使血液充分凝固方可离心吸取上层血清, 否则制备的将是含药血浆而不是含药血清, 血清药理学也就变成了血浆药理学了; 在细胞的制备阶段应在提高纯度的基础上尽量保持细胞的活性, 因此我们分离细胞时采用了消化—搅拌—再消化、即消化与搅拌交替的方法, 以免使细胞处于无钙的环境(消化阶段)过久, 丧失活性而影响细胞功能, 最终导致细胞对药物的敏感性下降; 另外, 药物与细胞作用期间温度应尽量保持与生理条件下相一致以使细胞对药物的反应更接近于机体状态。

我们所采用的方药中, 补中益气汤是临床常用的益气健脾经典名方; 党参和白术既是该方中的主要组成药物, 也是临床常用的益气健脾中药。该实验结果显示脾虚大鼠壁细胞经补中益气汤作用后结合位点数显著回升, 党参、白术作用后也有上升趋势。其中补中益气汤的作用明显大于党参和白术, 体现了复方配伍的整体优势; 我们还发现: 补中益气汤含药血清体外给药能明显抑制大鼠壁细胞胃泌素受体放射配基的特异性结合, 其特异性结合抑制率除去空白血清的影响外, 可达42.9%, 提示补中益气汤通过调节胃泌素受体, 使脾虚证复健的原因可能与胃泌素受体竞争性结合有关, 其确切机制我们将进一步深入研究。

### 4 参考文献

- 1 陈蕾, 黄威权, 孙绪德, 吕宝真, 蒲若蕾. 大鼠胃壁细胞的分离及培养. 第四军医大学学报 2002;23:769-771
- 2 Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003;23(10 Pt 2):68-73
- 3 张根水, 王汝俊. 脾虚大鼠胃壁细胞胃泌素受体研究及黄芪作用观察. 中国中医基础医学杂志 2002;8:44-45
- 4 彭智聪, 黄静宁, 郭宝丽, 张红玲. 中药血清药理学实验方法研究进展. 中国实验方剂学杂志 2001;7:57-59
- 5 赵海磊, 刘成, 赵爱光. 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化. 世界华人消化杂志 2003;11:1345-1348
- 6 聂克, 王汝俊, 王建华. 大鼠胃壁细胞的分离方法. 世界华人消化杂志 1999;7:994-995
- 7 聂克, 王汝俊, 王建华. 大鼠胃壁细胞胃泌素受体的放射配基结合法. 中国药理学通报 2001;12:645-647
- 8 隅田利彦, 杉木广之, 不破亨, 山崎和男, 武田理, 神田博史, 仲田义启, 濑川富朗, 周俊. Receptor Binding Assay 法を用いた薬用植物中の活性成分の研究. 药学杂志 1998;108:450-453
- 9 孙凤蓬, 宋子刚, 高天明. 壁细胞酸分泌的调节. 世界华人消化杂志 2002;10:1450-1453
- 10 Xiao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol* 2003;65:103-131
- 11 许琦, 王汝俊, 陈之喜, 王建华, 刘晓玲. “脾虚”大鼠胃壁细胞胃泌素受体变化及补中益气汤的作用. 中药药理与临床 2003;19:3-5
- 12 曹勇, 张丹, 郑广娟, 张静. 血清药理学研究补肾化痰解毒方对肺癌耐药细胞内药物浓度的作用. 中药材 2003;26:263-265
- 13 段飞, 姚树坤, 吴新满, 高洪生, 李志辉. 肝症口服液含药血清对 TGF $\alpha$  诱导 SMMC-7721 细胞增生和 ERK 蛋白的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:1017-1020

# 酶联免疫吸附技术测定鸡蛋黄中抗幽门螺杆菌 IgY 活性

周力, 刘灏, 张永宏, 左丽, 陈阿英, 李永念

周力, 刘灏, 张永宏, 贵州省贵阳医学院附属医院消化内科  
贵州省贵阳市 550004  
左丽, 陈阿英, 李永念, 贵州省贵阳医学院免疫学教研室  
贵州省贵阳市 550001  
贵州省省长基金课题资助项目, No. S2001.23  
项目负责人: 张永宏, 550004, 贵州省贵阳医学院附属医院消化内科.  
电话: 0851-6855119-8818  
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-04

## 摘要

目的: 探索测定抗 *H pylori*-IgY 的方法.

方法: 用间接ELISA法测定幽门螺旋杆菌(*H pylori*)超声破碎物免疫鸡所产鸡蛋中抗 *H pylori*-IgY 的效价. 用间接ELISA法检测抗 *H pylori*-IgY 的酸碱及酶稳定性.

结果: 用幽门螺旋杆菌的超声破碎物免疫产蛋母鸡, 可得到高效价的抗幽门螺旋杆菌 IgY. IgY 的酸稳定性好, 耐胃蛋白酶.

结论: 间接ELISA法简单、准确, 可作为测定 IgY 的标准方法.

周力, 刘灏, 张永宏, 左丽, 陈阿英, 李永念. 酶联免疫吸附技术测定鸡蛋黄中抗幽门螺杆菌 IgY 活性. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2874-2876  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2874.asp>

## 0 引言

哺乳动物的蛋白刺激鸡产生抗体远比家兔容易<sup>[1-3]</sup>. 鸡免疫后产生的抗体经血清进入蛋黄, 从蛋黄中能获得大量高质量的特异性免疫球蛋白, 称为 IgY<sup>[4]</sup>. IgY 不仅分子质量和等电点不同于哺乳动物的 IgG<sup>[5]</sup>, 而且不与哺乳动物的血清补体和 Fc 端结合<sup>[6]</sup>, 不受类风湿因子的干扰, 不被葡萄球菌 A 蛋白和 G 蛋白识别; 因而, 将 IgY 运用于生物化学和免疫学的基础研究及医学临床检测诊断中具有许多优越性<sup>[7-8]</sup>. 为了生产鸡的特异性 IgY, 须用免疫学方法检测鸡蛋黄中特异性 IgY 的效价, 以确定免疫效果、设计免疫方法. 我们采用 ELISA 测定免疫鸡蛋黄中特异性抗体的效价. 以免疫鸡血清  $A_{490}$  值(P  $A_{490}$  值)和阴性对照鸡血清的  $A_{490}$  值(N  $A_{490}$  值)之比值, 作为一抗和二抗最适工作浓度的选择标准.

## 1 材料和方法

1.1 材料 动物: 17周龄的罗曼免疫产蛋母鸡. *H pylori* 菌株 NCTC11637、NCTC11639、SS1 由中国预防科学院流行病学研究所和贵阳医学院免疫教研室提供, 其余 22 株由贵阳医学院附属医院临床患者分离. 全部根据细菌学和 PCR 鉴定(PCR 试剂盒由华美生物制品公司提

供)为 *H pylori*, 且所有菌株均为 VacA 基因阳性.

1.2 方法 抗原的制备: 参照相关文献[9], 超声破碎 *H pylori*. 健康罗曼免疫蛋鸡 4 只(17 周龄大小, 每只重约 1.5 kg), 随机分成两组, 一组免疫, 另一组作对照. 免疫组每只鸡初次注射 500  $\mu$ g 抗原. 首次免疫后的 7, 14, 21, 28 d 各用 250  $\mu$ g 抗原注射, 20 wk 加强免疫. 免疫前 2 d 开始收集鸡蛋和采鸡血测抗体. 对照组用不含抗原的成分注射. 抗 *H pylori*-IgY 的分离提取: 用水稀释-硫酸铵沉淀法<sup>[10]</sup>提取抗 *H pylori*-IgY, -80  $^{\circ}$ C 保存. 测定鸡蛋黄抗 *H pylori*-IgY 的 ELISA 方法.

1.2.1 间接 ELISA 法 用包被液稀释抗原, 以 2  $\mu$ g/孔包被 96 孔板 4  $^{\circ}$ C, 18-24 h 以上. PBS-Tween20(Tween-20, pH7.4, 0.01 mol/L PBS)洗涤 3 次, 每次 3 min; 每孔加入 200  $\mu$ L 0.5 g/L 封闭液(pH7.4 PBS-Tween20 缓冲液, 含 10 g/L 小牛血清白蛋白), 37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 洗涤同前; 加入待测 IgY 稀释液 100  $\mu$ L/孔, 封盖后 37  $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 洗涤同前; 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgY(浓度 1:100)100  $\mu$ L/孔, 封盖后 37  $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 洗涤同前; 显色液显色 20 min 后, 滴 0.1 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止反应后, 用酶标仪上在 490 nm 比色, 测定其吸光度值( $A_{490}$ ). 一抗(鸡抗 *H pylori*-IgY)和二抗(鼠抗鸡 IgY)最适工作浓度的确定: 用幽门螺旋杆菌超声破碎物抗原以及免疫鸡蛋黄 IgY 和阴性对照鸡 IgY 来选择最适工作浓度. 将免疫鸡血清和阴性对照鸡血清分别以 1:100 倍比稀释至 1:1 600, 二抗以 1:100 倍比稀释至 1:400 进行 ELISA 法测定. 以免疫鸡血清  $A_{490}$  值(P  $A_{490}$  值)和阴性对照鸡血清的  $A_{490}$  值(N  $A_{490}$  值)之比值, 作为一抗和二抗最适工作浓度的选择标准.

1.2.2 IgY 对酶和酸的耐受性 (1)胃蛋白酶消化试验: 在不同 pH 的抗 *H pylori*-IgY 溶液中, 加入 1%(E/S)胃蛋白酶(活性 1:3 000), 37  $^{\circ}$ C 水浴 0, 1, 2, 3, 4 h 中和酸使酶失活. 测  $A_{490}$  值. (2)胰蛋白酶消化试验: 在 pH8.0 的抗 *H pylori*-IgY 溶液中, 加入 1%(E/S)胰蛋白酶(活性 1:250), 37  $^{\circ}$ C 水浴数小时. 测  $A_{490}$  值. (3)抗 *H pylori*-IgY 对酸的耐受性: 在不同 pH 值 37  $^{\circ}$ C 下, 水浴抗 *H pylori*-IgY 2 h, 中和酸, 测 IgY 的  $A_{490}$  值.

统计学处理 P/N 比值公式及判断: P/N 值 = (待测孔  $A$  值 - 空白孔  $A$  值)  $\div$  (阴性对照孔  $A$  值 - 空白孔  $A$  值). P/N  $\geq$  2.1 为阳性, 1.5 < P/N  $\leq$  2.1 为可疑, 1.5 < P/N 为阴性.

## 2 结果

各空白孔  $A_{490}$  值均为 0. Anti-*H pylori*-IgY  $A_{490}$  值的最小

值为0.1048,  $P/N=1.048 \div 0.0413 \approx 2.54 > 2.1$ , 为阳性; 因此, 实验所得的 Anti-*H pylori*-IgY  $A_{490}$  值均为阳性. *t* 检验分析 Anti-*H pylori*-IgY  $A_{490}$  值,  $P < 0.05$ , 免疫组和对照组差异有显著性, 有统计学意义.

一抗稀释度 1:100, 二抗稀释度 1:400 时,  $P/N = 12.4914$ , 最大; 其次, 一抗稀释度 1:200, 二抗稀释度 1:400 时,  $P/N = 12.1767$ ; 再次, 一抗稀释度 1:100, 二抗稀释度 1:200 时,  $P/N = 12.148$ . 这三者的  $P/N$  值都大于 2.1 且显著高于其他组. 当二抗稀释度固定、一抗稀释度变化时, 二抗稀释度为 1:200 的各组  $P/N$  值相差最大. 当抗原每孔包被 1  $\mu\text{g}$ , 一抗以 1:100 稀释, 二抗以 1:200 稀释时, 高免鸡蛋黄 IgY 的  $A_{490}$  值 ( $P A_{490}$  值) 为 0.5017, 阴性对照鸡蛋黄 IgY 的  $A_{490}$  值 ( $P A_{490}$  值) 为 0.0413, 二者差异显著,  $P/N = 12.148$ , 具有很高的灵敏度, 有利于抗体活性的测定. 因此, 一抗的最适工作浓度选择 1:100 稀释, 二抗选 1:200 稀释. 幽门螺杆菌超声破碎物抗原初免疫母鸡后第 9 d, 蛋中抗 *H pylori*-IgY 开始测出, 并持续增高; 3-4 wk 达高峰; 之后效价维持在较高水平; 在 12-14 wk 和 20-24 wk 左右又分别出现一次高峰, 抗体活性持续 25 wk 以上(图 1). pH 2-6 范围内, 随 pH 值增大, 胃蛋白酶对抗 *H pylori*-IgY 活性的影响逐渐减小. pH = 6 时, 胃蛋白酶对抗 *H pylori*-IgY 的活性几乎无影响; pH = 2 时, 胃蛋白酶对抗 *H pylori*-IgY 的活性影响最大(图 2). 抗 *H pylori*-IgY 对胰蛋白酶极其敏感. 在胰蛋白酶作用的

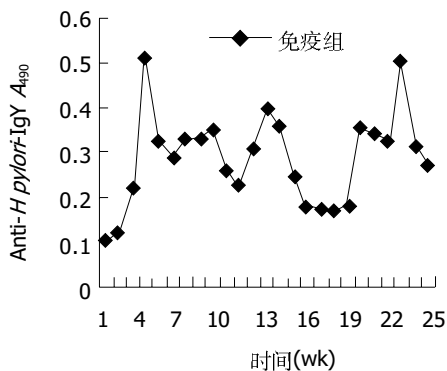


图1 免疫母鸡抗-*H pylori*-IgY  $A_{490}$  值变化规律.

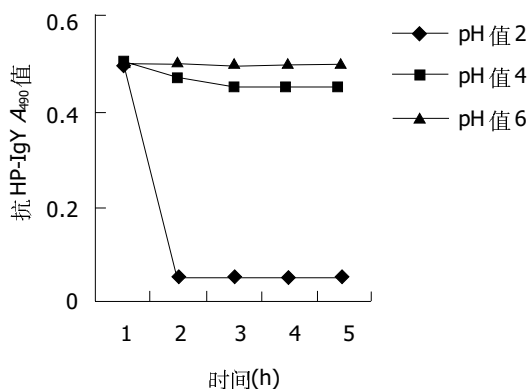


图2 不同 pH 值下胃蛋白酶对 Anti-*H pylori*-IgY  $A_{490}$  的影响.

最初 1 h 内, 抗 *H pylori*-IgY 的抗原结合活性就几乎完全丧失. pH 值在 4-7 之间时, 抗 *H pylori*-IgY 的活性几乎不受 pH 值影响. pH 值在 7-8 之间时, 抗 *H pylori*-IgY 活性略微下降, 降低值不超过 10%; pH < 4 时, 抗 *H pylori*-IgY 活性开始急剧下降, pH = 4 时, 抗 *H pylori*-IgY 活性下降约 70%; pH = 3 时, 抗 *H pylori*-IgY 活性下降约 80%; pH = 2 时, 抗 *H pylori*-IgY 接近失活(图 3).

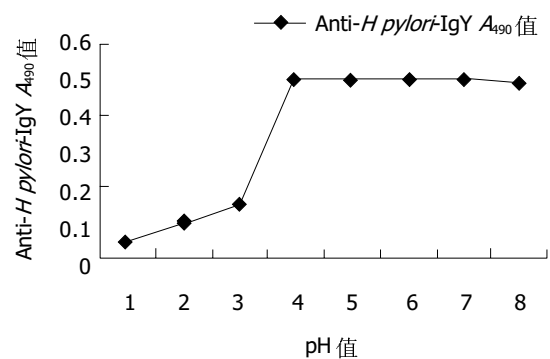


图3 Anti-*H pylori*-IgY 的对酶的耐受性.

### 3 讨论

目前检测鸡蛋黄 IgY 的常用方法有免疫双向扩散法和血凝抑制法等, 其灵敏度都不够高, 且不易进行标准化测量. 本试验用幽门螺杆菌超声破碎物抗原包被板、鼠抗鸡 IgY 作二抗, 以间接 ELISA 法测定鸡蛋黄中抗 *H pylori*-IgY 的效价, 并以此监测其变化规律. 鸡蛋黄中, 抗 *H pylori*-IgY 抗体含量高; 间接 ELISA 法检测发现, 抗 *H pylori*-IgY 能长时间地维持在较高水平, 这十分有利于工业化生产, 为研究和利用 IgY 提供了高灵敏度和简便易行的标准化方法, 为进一步的动物和临床研究奠定了基础.

抗 *H pylori*-IgY 的酸稳定性实验提示: 降低胃酸的药物(如 H<sub>2</sub>-受体阻止剂和质子泵抑制剂)有利于维持抗 *H pylori*-IgY 的活性; 二者合用, 将提高 *H pylori* 的根除率. 抗 *H pylori*-IgY 的酶稳定性实验提示: (1) 与抑制胃酸分泌药物合用, 可保护抗 *H pylori*-IgY 免受胃蛋白酶水解破坏. (2) 抗 *H pylori*-IgY 不耐受胰蛋白酶. 在有胆汁反流的患者, 胰蛋白酶可随之反流入胃; 这类患者应注意加用黏附胆汁的药物, 以保护抗 *H pylori*-IgY 的活性.

近年来, 将 IgY 用于预防与治疗人和动物的某些疾病的报道较多见<sup>[11-13]</sup>, 证实了 IgY 的被动免疫保护作用, 并提示特异性鸡蛋黄抗体 IgY 对病原体感染的防御没有动物种属的差异, 这就为 IgY 防治人类疾病的应用奠定了基础. IgY 可作为一种食品级抗体, 应用于婴幼儿肠道感染; 可作为一种食品添加剂, 应用于某些胃肠炎的口服被动性免疫预防. 口服卵黄或 IgY 可获得被动免疫保护, 可应用 IgY 预防婴幼儿和家畜(禽)的各种微生物感染肠道疾病. 对于患有免疫缺陷性疾病的人口

服IgY预防肠道感染更有其独特的功能.因此,IgY可作为食品公司的免疫型强化剂.有人提出给小于5月龄的婴儿及先天性免疫缺陷患儿口服含有高滴度抗病毒活性的IgY用于疾病的防治,对那些不能以母乳喂养的儿童尤为有意义<sup>[14]</sup>.

#### 4 参考文献

- 1 Carroll S B, Stollar BD. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *J Biol Chem* 1983;258:24-29
- 2 Song CS, Yu JH, Bai DH, Hester PY, Kim KH. Antibodies to the  $\alpha$ -subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J Immunol* 1985;135:3354-3361
- 3 Rose ME, Or lane E. Buttres. Immunoglobulin classes in the haes egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J Immunol* 1974;4:521
- 4 Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods* 1981;46:63-67
- 5 Toivanen PA. Immunology: basis and practice. Boca Raton FL USA. CRC press 1987:113-121
- 6 Benson HN, Brumfield HP, Pomeroy BS. Requirement of avian C' 1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes. *J Immunol* 1961;87:616-621
- 7 Kronvall G, Seal US, Svensson S, Willams PC. Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of IgG globulin using Staphylococcal protein A. *J Immunol* 1990;104:140-146
- 8 Kronvall G, Seal US, Finstad J. Phylogenetic protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect* 1974;82:12-18
- 9 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺旋杆菌感染的基础与临床. 中国科学技术出版社, 2002:58-122
- 10 Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. Coli strain. *J Immunol Meth* 1993;160:207-214
- 11 Ebina T, Tskada K, Umezu K, Xose M, Tsuda K, Hatta H, Kim M, Yamamoto T. Gastroenteritis in sucking mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(IgY) and treated with a protein bond polysaccharide Preparation(PSK). *Microbiol Immunol* 1990;34:617-629
- 12 Hiraga C, Kodama Y, Sugiyam T. Prevention of HTB in fection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. *Kansenshogaka Zasshi* 1990;64:118
- 13 Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sento S, Ikemori Y, Kodama Y. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Eschichia coli infection in neonatal piglets. *Infect Immun* 1992;60:998-1007
- 14 Schimizu M, Fitisimmons RC, Nakai S. Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sci* 1988;53:1360

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

• 研究快报 •

## 基因表达谱芯片技术筛选 TAHCCP1 转染细胞差异表达基因

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C030114020, No. C30070689, No. 30371288  
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
北京市自然科学基金面上项目, No. 5042024  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-6693-3391 传真: 010-6380-1283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

目的: 应用基因芯片技术, 检测丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白反式激活基因TAHCCP1的表达对肝母细胞瘤细胞系HepG2基因表达谱的影响, 进一步阐明TAHCCP1在肝细胞中上调或下调的基因, 探索其可能的调节功能.

方法: 设计并合成TAHCCP1基因序列特异性的引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增TAHCCP1基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的TAHCCP1编码基因片段克隆到

TA载体中进行核苷酸序列的测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP1, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA, 逆转录为cDNA, 应用基因表达谱芯片技术对两组间差异表达mRNA进行检测和分析.

结果: 在筛选的1152点cDNA芯片中, 有110种基因的表达水平上调(占9.55%), 98种基因的表达水平下调(8.51%), 包括一些与体内免疫调节、脂类代谢、蛋白质的翻译合成、氧化反应、细胞凋亡及细胞内的信号传导方面的基因.

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了TAHCCP1转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明TAHCCP1蛋白可能的生物学功能提供依据.

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军. 基因表达谱芯片技术筛选TAHCCP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2876-2880  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2876.asp>

服IgY预防肠道感染更有其独特的功能.因此,IgY可作为食品公司的免疫型强化剂.有人提出给小于5月龄的婴儿及先天性免疫缺陷患儿口服含有高滴度抗病毒活性的IgY用于疾病的防治,对那些不能以母乳喂养的儿童尤为有意义<sup>[14]</sup>.

#### 4 参考文献

- 1 Carroll S B, Stollar BD. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *J Biol Chem* 1983;258:24-29
- 2 Song CS, Yu JH, Bai DH, Hester PY, Kim KH. Antibodies to the  $\alpha$ -subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J Immunol* 1985;135:3354-3361
- 3 Rose ME, Or lane E. Buttres. Immunoglobulin classes in the haes egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J Immunol* 1974;4:521
- 4 Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods* 1981;46:63-67
- 5 Toivanen PA. Immunology: basis and practice. Boca Raton FL USA. CRC press 1987:113-121
- 6 Benson HN, Brumfield HP, Pomeroy BS. Requirement of avian C' 1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes. *J Immunol* 1961;87:616-621
- 7 Kronvall G, Seal US, Svensson S, Willams PC. Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of IgG globulin using Staphylococcal protein A. *J Immunol* 1990;104:140-146
- 8 Kronvall G, Seal US, Finstad J. Phylogenetic protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect* 1974;82:12-18
- 9 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺旋杆菌感染的基础与临床. 中国科学技术出版社, 2002:58-122
- 10 Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. Coli strain. *J Immunol Meth* 1993;160:207-214
- 11 Ebina T, Tskada K, Umezu K, Xose M, Tsuda K, Hatta H, Kim M, Yamamoto T. Gastroenteritis in sucking mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(IgY) and treated with a protein bond polysaccharide Preparation(PSK). *Microbiol Immunol* 1990;34:617-629
- 12 Hiraga C, Kodama Y, Sugiyam T. Prevention of HTB in fection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. *Kansenshogaka Zasshi* 1990;64:118
- 13 Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sento S, Ikemori Y, Kodama Y. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Eschichia coli infection in neonatal piglets. *Infect Immun* 1992;60:998-1007
- 14 Schimizu M, Fitisimmons RC, Nakai S. Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sci* 1988;53:1360

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

• 研究快报 •

## 基因表达谱芯片技术筛选 TAHCCP1 转染细胞差异表达基因

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C030114020, No. C30070689, No. 30371288  
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
北京市自然科学基金面上项目, No. 5042024  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-6693-3391 传真: 010-6380-1283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

目的: 应用基因芯片技术, 检测丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白反式激活基因TAHCCP1的表达对肝母细胞瘤细胞系HepG2基因表达谱的影响, 进一步阐明TAHCCP1在肝细胞中上调或下调的基因, 探索其可能的调节功能.

方法: 设计并合成TAHCCP1基因序列特异性的引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增TAHCCP1基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的TAHCCP1编码基因片段克隆到

TA载体中进行核苷酸序列的测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP1, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA, 逆转录为cDNA, 应用基因表达谱芯片技术对两组间差异表达mRNA进行检测和分析.

结果: 在筛选的1152点cDNA芯片中, 有110种基因的表达水平上调(占9.55%), 98种基因的表达水平下调(8.51%), 包括一些与体内免疫调节、脂类代谢、蛋白质的翻译合成、氧化反应、细胞凋亡及细胞内的信号传导方面的基因.

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了TAHCCP1转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明TAHCCP1蛋白可能的生物学功能提供依据.

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军. 基因表达谱芯片技术筛选TAHCCP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2876-2880  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2876.asp>

## 0 引言

TAHCCP1是本室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选到的丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白反式调节的新靶基因,该新基因的编码序列全长为2 001个核苷酸(nt),编码产物由667个氨基酸残基(aa)组成,在GenBank中注册号为AY038359<sup>[1-4]</sup>。该蛋白在细胞内的生物学功能未知,为了探索TAHCCP1的功能,我们构建了TAHCCP1基因真核表达载体,应用基因表达谱芯片技术筛选、克隆TAHCCP1上调或下调的基因,推测其在体内的功能,为研究HCV核心蛋白的致病机制及探索未知基因的功能提供了新的方向。

## 1 材料和方法

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

### 1.2 方法

1.2.1 真核表达载体构建及细胞转染 设计并合成TAHCCP1基因序列特异性引物,上下游引物序列分别为:5' - GAT ATC CGC AGA AAT GGA GCA AGA GC-3', 5' - GGA TCC GTG ATT CCC AGC ACT TCA TC-3',下划线部分为引物两端的酶切位点, *EcoRV*和 *BamHI*。以转染了HCV核心表达质粒的HepG2细胞cDNA作为模板,应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增TAHCCP1的全长编码基因。依次克隆到TA载体中进行序列测定及真核表达载体pcDNA3.1(-)中,构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP1。在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞,细胞生长至对数期时,分别以脂质体转染试剂Lipofectamine PLUS将2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-TAHCCP1和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞,48 h后收获细胞,每5  $\times$  10<sup>6</sup>个细胞加入1 mL Trizol试剂,立即于液氮中保存。

1.2.2 总RNA提取及mRNA纯化 Trizol试剂一步法提取转染pcDNA3.1(-)-TAHCCP1和空载体pcDNA3.1(-)的细胞HepG2总RNA(分别标记为实验组和对照组),样品经分光光度计检测吸光度A值,并行热稳定实验,于-20  $^{\circ}$ C和70  $^{\circ}$ C保温1 h后,经琼脂糖凝胶电泳检测28 S、18 S条带变化。纯化mRNA并行电泳检测。

1.2.3 探针标记及芯片制备 常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化。Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5  $\mu$ g), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5  $\mu$ g),乙醇沉淀后溶解在20  $\mu$ L 5  $\times$  SSC+2 g/L SDS杂交液中。芯片包含的1 152个cDNA以通用引物进行PCR扩增,PCR产物长度为1 000-3 000 bp。靶基因以0.5 g/L溶解于3  $\times$  SSC溶液中,用Cartesian公司的Cartesian 7 500点样仪及

TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min),紫外线(UV)交联,再分别用2 g/L SDS、水及2 g/L的硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用。

1.2.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在95  $^{\circ}$ C水浴变性5 min,将混合探针加在基因芯片上,置于60  $^{\circ}$ C杂交15-17 h,依次以2  $\times$  SSC+2 g/L SDS、1 g/L  $\times$  SSC+2 g/L SDS、1 g/L  $\times$  SSC洗涤10 min,室温晾干。

1.2.5 检测与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片。用预先选定的内参照基因(24条管家基因,每个基因点2个点,共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度,计算Cy5/Cy3比值。阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.000,红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3<0.500,为绿色荧光,显示表达减弱。

## 2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-TAHCCP1的表达载体构建 TAHCCP1真核表达质粒pcDNA3.1(-)-TAHCCP1经限制性内切酶分析和核苷酸序列测定,证实含有TAHCCP1完整的开放读码框架,序列准确无误。

2.2 总RNA及mRNA的定性、定量分析 实验组和对照组总RNA的吸光度比值A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>分别为1.898和1.912,热稳定实验70  $^{\circ}$ C保温1 h与-20  $^{\circ}$ C 1 h电泳条带比较,显示28 S条带无明显降解,电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA, mRNA主要集中于0.9-4.0 kb的连续条带。

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1 152个cDNA。为了监控芯片杂交技术体系的整个过程,在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因,共8个点),这些点的杂交信号均很低,证实了数据的可靠性。由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色),对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色),红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异,黄色代表表达水平无差异。按阳性标准,从1 152个基因中筛选出差异表达基因共208条,其中110条基因表达增强,98条基因表达降低。

2.4 差异表达基因分析 TAHCCP1上调基因类型:在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在2.000以上,就判断为TAHCCP1的上调基因。在我们的研究中发现有110种基因的表达水平上调,表1列出部分上调基因。TAHCCP1基因下调基因:在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在0.500以下,就判断为TAHCCP1的下调基因。在我们的研究中发现有98种基因的表达水平下调,表2列出部分下调基因。

## 3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白是HCV基因组编码的一种最为重要的具有多种生物学活性的结构蛋白质,与HCV感染的靶细胞的细胞周期与细胞凋亡的分子生物学调节机制密切相关<sup>[5-10]</sup>。核心蛋白是一种作用很强的转

表1 TAHCCP1上调的部分基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_001226	凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶 6(CASP6)	2.173
2	NM_006101	肿瘤中高表达的富含亮氨酸的蛋白(HEC)	2.314
3	NM_025190	丙型肝炎病毒 NS3 蛋白反式激活蛋白 6(NS3TP6)	2.403
4	NM_004661	CDC23 细胞周期分裂蛋白(CDC23)	2.503
5	NM_000857	鸟苷酸环化酶 1(GUCY1B3)	2.829
6	NM_014225	蛋白磷酸酶(PPP2R1A)	2.981
7	NM_005637	分泌滑液的肉瘤转位蛋白(SS18)	3.159
8	NM_003202	转录因子 7(TCF7)	3.368
9	NM_003330	硫氧还蛋白还原酶(TR)	3.459
10	NM_053274	FKBP 相关蛋白 48(FAP48)	3.614
11	NM_002736	cAMP 依赖的蛋白激酶(PRKAR2B)	4.534
12	NM_001961	真核翻译延伸因子 2(EEF2)	5.105

表2 TAHCCP1下调的部分基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_003142	La 自身抗原	0.267
2	NM_001551	免疫球蛋白结合蛋白 1(IGBP1)	0.269
3	NM_002624	预折叠蛋白 5(PFDN5)	0.289
4	NM_002292	层粘连蛋白(LAMB2)	0.323
5	NM_005950	金属硫蛋白(MT1G)	0.347
6	NM_005627	血清 / 糖皮质激素调节激酶(SGK)	0.350
7	NM_000581	谷胱甘肽过氧化物酶(GPX1)	0.350
8	NM_003790	肿瘤坏死因子受体超家族成员 12(TNFRSF12)	0.373
9	NM_006609	丝裂素活化的蛋白激酶激酶 2(MAP3K2)	0.381
10	NM_003254	组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP1)	0.412
11	NM_002166	DNA 结合的显性负相螺旋环螺旋蛋白(ID2)	0.412
12	NM_001350	死亡相关蛋白 6(DAXX)	0.417
13	NM_033306	凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶 4(CASP4)	0.420
14	NM_021138	TNF 受体相关因子 2(TRAF2)	0.432
15	NM_012317	肿瘤中下调的亮氨酸拉链蛋白(LDOC1)	0.451
16	NM_006098	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(GNB2L1)	0.452
17	NM_012341	G 蛋白结合蛋白(CRFG)	0.473

录激活因子,能够影响细胞信号转导途径,激活多种病毒及细胞基因启动子,调控着细胞基因的转录<sup>[11-15]</sup>.我们利用抑制性消减杂交技术,对于表达HCV核心蛋白表达载体转染的HepG2细胞进行研究,结合生物信息学技术克隆了核心蛋白反式激活作用的新靶基因,命名为TAHCCP1,该基因的细胞内生物学功能未知.

基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到两组组织或细胞基因表达谱的差异,在研究新基因的功能上显示出其优越性<sup>[16-18]</sup>.我们用常规分子生物学技术构建了TAHCCP1的真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP1,并用空载体作为阴性对照,利用脂质体转染HepG2细胞,提取总RNA,逆转录为cDNA,进行基因芯片技术分析.结果表明,在筛选的1152个cDNA中,有

110个基因表达水平上调,98种基因的表达水平下调,其中包括一些未知功能的基因.

在上调的基因中,NS3TP6是丙型肝炎病毒NS3蛋白反式激活蛋白6,TAHCCP1对其表达水平上调,表明HCV感染靶细胞后病毒不是孤立存在的,病毒编码蛋白与肝细胞蛋白、肝细胞蛋白与肝细胞蛋白之间存在复杂的相互调节作用<sup>[9]</sup>.细胞分裂周期蛋白CDC23与酿酒酵母的CDC23高度同源,是促进细胞分裂后期复合物(anaphase-promoting complex, APC)的成员,对于细胞周期由G2期向M期过渡是必不可少的. APC能够催化细胞周期蛋白B与泛素(cyclin B-ubiquitin)形成共轭复合物,在泛素介导的细胞周期蛋白B的蛋白水解过程中起重要作用,推测TAHCCP1通过上调CDC23



的表达对细胞周期有调控作用<sup>[20]</sup>。蛋白磷酸酶,为钙依赖的磷酸酶,对T细胞的激活非常重要,其表达升高可能与机体的免疫功能相关<sup>[21]</sup>。硫氧还蛋白还原酶(TR)是硒蛋白质,为嘧啶核苷氧化还原酶家族成员之一,能够还原催化硫氧还蛋白及其他底物,调节细胞内多种氧化还原作用敏感蛋白,在硒元素新陈代谢和保护电离辐射诱导的氧化应激及随之增强的转录因子AP-1 DNA结合活性过程中起重要作用。在 $\beta$ -干扰素/全反式维甲酸诱导细胞凋亡过程中,TR是关键的调节因子,TR可迅速诱导细胞凋亡,研究发现羧基末端表面功能域缺失突变的TR可以组成型激活TR依赖的细胞凋亡应答,促进p53依赖的基因表达,抑制细胞生长调节<sup>[22]</sup>。此外,TAHCCP1对真核翻译延伸因子2的表达水平显著上调,高达5倍,提示TAHCCP1促进蛋白质的翻译合成<sup>[23]</sup>。

下调的基因中,人La自身抗原,能够与HCV 5'-非翻译区的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)相互作用,刺激IRES介导的HCV翻译。TAHCCP1通过下调La自身抗原表达水平,反馈调节HCV基因组的翻译<sup>[24]</sup>。免疫球蛋白结合蛋白1(IGBP1)为B细胞信号转导分子 $\alpha 4$ ,参与B细胞增生分化以及B细胞受体复合物介导的多种信号转导途径,在机体的体液免疫应答过程中发挥至关重要的作用,在表达TAHCCP1的细胞,IGBP1分子水平显著下调,提示免疫功能低下,这与HCV感染患者免疫功能低下的临床表现是一致的<sup>[25]</sup>。预折叠蛋白是辅助其他蛋白正确折叠和有效组装的伴侣蛋白,该蛋白的第五亚单位蛋白前折叠素5(prefoldin)可与原癌基因*c-myc*相互结合,抑制*c-myc*的转录活性,被公认为是候选的肿瘤抑制基因。可见,TAHCCP1下调肿瘤抑制基因前折叠素5的表达,间接激活原癌基因*c-myc*的转录,参与HCV核心蛋白的肝细胞恶性转化机制<sup>[26]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶(GPX4)是体内抗氧化损伤的重要酶,参与过氧化氢解毒作用。在培养的胸部肿瘤细胞中,该酶能够保护CD95诱导的细胞凋亡<sup>[27]</sup>。MAP3K2是丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族成员之一,优先活化参与MAP激酶信号途径的一些激酶,包括MAPK7和MAP2K4。MAP3K2能够直接磷酸化并激活IK $\kappa$ B激酶(IKKs),在核转录因子NF- $\kappa$ B信号转导途径中起重要作用。该激酶也能够结合并活化蛋白激酶C相关的激酶2(PRKCL2/PRK2),参与PRKCL2调节的信号过程<sup>[28]</sup>。凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶胱冬肽酶4是半胱氨酸-精氨酸蛋白酶家族成员,胱冬肽酶家族酶的依次活化,在细胞凋亡的各时相起着至关重要的作用<sup>[29]</sup>。可见,TAHCCP1下调上述基因的表达,参与细胞信号转导途径。

总之,TAHCCP1在体内免疫调节、氧化还原代谢、信号转导、蛋白质的翻译合成方面可能具有一定的作用,可能参与细胞凋亡及细胞内的信号传导功能的调控。作为人体中正常存在的基因,其具体的功能尚需要进一步研究来证实。

#### 4 参考文献

- 1 刘妍, 成军. 丙肝病毒致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 2 刘妍, 成军, 邵得志, 王琳, 钟彦伟, 夏小兵. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活SV40病毒早期启动子/增强子的研究. 军医进修学院学报 2001;22:186-188
- 3 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 4 刘妍, 王建军, 成军, 杨倩, 纪冬, 王春花, 党晓燕, 张玲霞. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因TAHCCP1的克隆化研究. 解放军医学杂志 2004;29:237-239
- 5 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV核心蛋白与截短型HBV表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. 中华肝病杂志 2002;10:354-357
- 6 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
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 8 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆HCV核心蛋白结合蛋白基因1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 9 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白AI结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 10 成军, 任进余, 李莉, 陆志橡, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 11 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 12 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 13 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:A185
- 14 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 15 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- 16 Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- 17 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 18 Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066
- 19 洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白上调NS3TP6基因启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2004;12:813-816
- 20 Zhao N, Lai F, Fernald AA, Eisenbart JD, Espinosa R, Wang PW, Le Beau MM. Human CDC23: cDNA cloning, mapping to 5q31, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics* 1998;53:184-190
- 21 Zolnierowicz S. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1225-1235
- 22 Anestalt K, Arner ES. Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J Biol Chem* 2003;278:15966-15972
- 23 Hanes J, Freudenstein J, Rapp G, Scheit KH. Construction of a plasmid containing the complete coding region of human elongation factor 2. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992;373:201-204
- 24 Pudi R, Abhiman S, Srinivasan N, Das S. Hepatitis C virus

- internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J Biol Chem* 2003;278:12231-12240
- 25 Onda M, Inui S, Maeda K, Suzuki M, Takahashi E, Sakaguchi N. Expression and chromosomal localization of the human alpha 4/IGBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway. *Genomics* 1997;46:373-378
- 26 Watanabe K, Ozaki T, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Hosoda M, Hayashi S, Todo S, Nakagawara A. Physical interaction of p73 with c-Myc and MM1, a c-Myc-binding protein, and modulation of the p73 function. *J Biol Chem* 2002;277:15113-15123
- 27 Chen X, Scholl TO, Leskiw MJ, Donaldson MR, Stein TP. Association of glutathione peroxidase activity with insulin resistance and dietary fat intake during normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5963-5968
- 28 Zhao Q, Lee FS. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* 1999;274:8355-8358
- 29 Nasir J, Theilmann JL, Vaillancourt JP, Munday NA, Ali A, Scherer S, Beatty B, Nicholson DW, Hayden MR. Interleukin-1beta-converting enzyme (ICE) and related cell death genes ICERel-II and ICERel-III map to the same PAC clone at band 11q22.2-22.3. *Mamm Genome* 1997;8:611-613

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

• 研究快报 •

## 酵母双杂交技术筛选白细胞中乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 张树林

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

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白结合蛋白的基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV核心蛋白编码基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出HBV核心蛋白编码基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在辅有X- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落17个, 其中肿瘤高甲基化1基因3个, 编码线粒体蛋白的DNA聚合酶 $\gamma$ 基因1个, 乙酰辅酶A合成酶3基因1个, 假定翻译起始因子

基因1个, 趋化因子受体5基因1个, 线粒体核糖体蛋白L41基因1个, Kyot结合蛋白基因1个, Ran结合蛋白基因1个, 真核细胞翻译延伸因子2基因2个, 未知基因5个。

结论: 成功克隆出乙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白, 为进一步研究HBV核心蛋白在病毒装配、损害肝细胞、感染致病等方面的具体作用提供了新线索。

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 张树林. 酵母双杂交技术筛选白细胞中乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12): 2880-2882

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2880.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害人类健康的致病病毒因子, 除引起急、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 导致肝纤维化(LC), 还与肝细胞癌(HCC)的发生密切相关<sup>[1]</sup>. HBV属嗜肝DNA病毒, 基因组为3 200千碱基对(kb)部分双链环状DNA. HBV有2个核心相关的开放读框, 其中核心蛋白基因编码21 ku的HBcAg. HBcAg有高度免疫原性, 几乎所有HBV感染者都产生抗-HBc, 同时有T细胞免疫应答<sup>[1-2]</sup>. HBV的蛋白与肝细胞和白细胞中的蛋白之间的相互作用在HBV感染、慢性肝炎和致肝细胞癌过程中起着重要的作用. 我们曾用酵母双杂交技术筛选了肝细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白的基因, 证明HCV核心蛋白与肝脏脂肪变的关系, 为探讨HCV致病

- internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J Biol Chem* 2003;278:12231-12240
- 25 Onda M, Inui S, Maeda K, Suzuki M, Takahashi E, Sakaguchi N. Expression and chromosomal localization of the human alpha 4/IGBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway. *Genomics* 1997;46:373-378
- 26 Watanabe K, Ozaki T, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Hosoda M, Hayashi S, Todo S, Nakagawara A. Physical interaction of p73 with c-Myc and MM1, a c-Myc-binding protein, and modulation of the p73 function. *J Biol Chem* 2002;277:15113-15123
- 27 Chen X, Scholl TO, Leskiw MJ, Donaldson MR, Stein TP. Association of glutathione peroxidase activity with insulin resistance and dietary fat intake during normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5963-5968
- 28 Zhao Q, Lee FS. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* 1999;274:8355-8358
- 29 Nasir J, Theilmann JL, Vaillancourt JP, Munday NA, Ali A, Scherer S, Beatty B, Nicholson DW, Hayden MR. Interleukin-1beta-converting enzyme (ICE) and related cell death genes ICERel-II and ICERel-III map to the same PAC clone at band 11q22.2-22.3. *Mamm Genome* 1997;8:611-613

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

• 研究快报 •

## 酵母双杂交技术筛选白细胞中乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 张树林

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

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白结合蛋白的基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV核心蛋白编码基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出HBV核心蛋白编码基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在辅有X- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落17个, 其中肿瘤高甲基化1基因3个, 编码线粒体蛋白的DNA聚合酶 $\gamma$ 基因1个, 乙酰辅酶A合成酶3基因1个, 假定翻译起始因子

基因1个, 趋化因子受体5基因1个, 线粒体核糖体蛋白L41基因1个, Kyot结合蛋白基因1个, Ran结合蛋白基因1个, 真核细胞翻译延伸因子2基因2个, 未知基因5个。

结论: 成功克隆出乙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白, 为进一步研究HBV核心蛋白在病毒装配、损害肝细胞、感染致病等方面的具体作用提供了新线索。

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 张树林. 酵母双杂交技术筛选白细胞中乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12): 2880-2882

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2880.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害人类健康的致病病毒因子, 除引起急、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 导致肝纤维化(LC), 还与肝细胞癌(HCC)的发生密切相关<sup>[1]</sup>. HBV属嗜肝DNA病毒, 基因组为3 200千碱基对(kb)部分双链环状DNA. HBV有2个核心相关的开放读框, 其中核心蛋白基因编码21 ku的HBcAg. HBcAg有高度免疫原性, 几乎所有HBV感染者都产生抗-HBc, 同时有T细胞免疫应答<sup>[1-2]</sup>. HBV的蛋白与肝细胞和白细胞中的蛋白之间的相互作用在HBV感染、慢性肝炎和致肝细胞癌过程中起着重要的作用. 我们曾用酵母双杂交技术筛选了肝细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白的基因, 证明HCV核心蛋白与肝脏脂肪变的关系, 为探讨HCV致病

的分子生物学机制提供了重要线索<sup>[3-6]</sup>。为进一步研究 HBV 与免疫系统的关系,我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中与 HBcAg 结合蛋白基因。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、cDNA 白细胞文库、以上产品均购自 Clontech 公司。酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基 SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade、X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司,半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司。复杂高效感受态(FSB),本室自制。大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ),本室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 诱饵质粒的构建及表达** HBV 核心蛋白基因的酵母表达载体 pGBKT7-HBV core 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109 由本室构建。

**1.2.2 酵母白细胞文库的构建** cDNA 白细胞文库进行增殖后,提出质粒,转化入酵母细胞(Y187),经文库滴定,确定文库细胞计数大于  $1 \times 10^{12}$  细胞/mL。

**1.2.3 诱饵与白细胞文库的酵母配合** 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于  $1 \times 10^{12}$  细胞/mL)与白细胞文库混合,30℃轻摇配合过夜,24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(QDO)25 块。同时进行阳性对照实验及文库滴定。生长 16 d 后把长出的大于 3 mm 的酵母集落,在铺有 X- $\alpha$ -半乳糖苷酶的 QDO 上检查  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性,认为在 QDO 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落。

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

## 2 结果

**cDNA 测序与同源性分析初步结果** 配合后筛选出既能在 4 缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有 X- $\alpha$ -gal 的 4 缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 17 个克隆并测序,与 GenBank 数据库进行初步比较,发现其中含肿瘤高甲基化 1 基因 3 个,编码线粒体蛋白的 DNA 聚合酶  $\gamma$  基因 1 个,乙酰辅酶 A 合成酶 3 基因 1 个,假定翻译起始因子基因 1 个,趋化因子受体 5 基因 1 个,线粒体核糖体蛋白 L41 基因 1 个,Kyot 结合蛋白基因 1 个,Ran 结合蛋白基因 1 个,真核细胞翻译延伸因子 2 基因 2 个,未知蛋白基因 5 个(表 1)。

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

同源蛋白质	同源性(%)	相同克隆数
肿瘤高甲基化 1 (HIC1)	98-100	3
编码线粒体蛋白的 DNA 聚合酶 $\gamma$ (POLG)	99	1
乙酰辅酶 A 合成酶 3	99	1
假定翻译起始因子	99	1
趋化因子受体 5	100	1
线粒体核糖体蛋白 L41	100	1
Kyot 结合蛋白	99	1
Ran 结合蛋白 (RanBPM)	99	1
真核细胞翻译延伸因子 2	100	2
未知蛋白	97-100	5

## 3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)基因组中的核心基因以第一和第二个开始密码子 ATG 分为前 -C 和 C 区,前 -C 区的 ATG 在 1 841 nt, C 区 ATG 在 1 901 nt,前 -C 与 C 区有共同的终止密码子,在 2 458 nt. HBcAg 有保守的三维结构,分子质量 21 ku. 其 1-144 aa 是核壳装配区,而羧基端的 150-185 aa 段是精氨酸富集区. HBcAg 的羧基末端是与 RNA/DNA 的结合区段,而且受细胞激酶作用而部分磷酸化,磷酸化对核心内 DNA 合成、复制和传染的建立很重要. HBcAg 有鱼精蛋白样亲胞核性羧基末端,可介导细胞核内转运信号,大量 HBcAg 进入细胞核内<sup>[7-9]</sup>。

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用的一种有效的基因分析方法,他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法。酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白 X 和 Y 分别融合到一酵母转录激活因子的结合结构域(BD)和激活结构域(AD)上,X 与 Y 的相互作用重构了激活因子,从而导致下游“报告基因”的转录,产生容易探测到的表型。我们使用的是酵母双杂交系统 3(Clontech 公司商品化的双杂交系统),由于有 3 个表达基因用来筛选及严格的对照,其阳性率达 95% 以上,假阳性率 5% 以下<sup>[10-14]</sup>。

实验中我们在真核表达载体 pGBK-T7 中构建 pGBKT7-HBV core 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBV 核心蛋白基因,与人白细胞 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合,筛选出与之相互作用的蛋白基因 17 种,其中肿瘤高甲基化基因(HIC1)是肿瘤抑制基因的代表,在正常组织活跃表达,而在各种肿瘤细胞表达低下,与 17p13.3 的 CpG 岛联合使其异常高甲基化及在多种常见人类肿瘤 HIC1 转录失活<sup>[15]</sup>,HBcAg 可与之结合,表明 HBcAg 可能与 HCC 的发生有关。人线粒体 DNA 是 16 569 bp 的双链 DNA,编码的 13 个蛋白产物为氧化磷酸化用来合成真核细胞所需的 ATP,而编码线粒体蛋白的 DNA 聚合酶  $\gamma$ (POLG)是惟一的参与合成 mtDNA 的聚合酶, POLG 由于校正效率的降低而

有错误倾向,由于变异、外因和某些抗病毒药物抑制, POLG 的活性缺陷可增强 mtDNA 的变异<sup>[16-18]</sup>; 另外 HbcAg 可与线粒体核蛋白 L41 结合, 这些都支持 HBV 核心蛋白通过肝细胞线粒体介导 HBV 的复制和装配。乙酰辅酶 A 合成酶是用来合成脂肪酸, 在肝线粒体外膜、微粒体、细胞质膜和过氧化物酶发现有活性表现, 乙酰辅酶 A 合成酶活性依赖某些外因, 如用去垢剂处理微粒体和过氧化物酶可诱导抑制乙酰辅酶 A 合成酶<sup>[19-20]</sup>。趋化因子受体 5 (CCR5) 主要表达于单核细胞, 也选择性表达于 Th1 细胞。有人报告, CCR5 尽管都表达在活化的效应性 Th1、Th2 细胞上, 强度亦相仿, 但仍认为 CCR5 是 Th1 细胞的标志, 人免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 通过 CD4 分子作为第一受体, 以趋化因子受体 CXCR4、CCR5 等作为第二受体实现其对靶细胞的感染, 并导致 HIV 感染细胞之间发生融合, 形成合胞体, 这是 HIV 在体内进行扩散的主要形式, 也是 HIV 感染导致机体 CD<sup>+</sup>4 细胞绝对数下降的一个重要原因<sup>[21]</sup>。Kyot 结合蛋白 (KBP) 基因至少编码三个转录本 (KBP1、KBP2、KBP3), 三个转录本与 Kyot 结合的区域和能力是一样的, 说明三者的功能一样, 通过酵母双杂交证明 Kyot2 和 KBP 相互作用, 而且 Kyot 通过其 LIM 区域介导二者结合, LIM 区域是半胱氨酸富集的锌结合基序, 参与蛋白之间的结合, LIM 蛋白能和受体酪氨酸激酶和蛋白激酶 C (PKC) 结合, 可能参与信号转导, LIM 区域作为接头分子促进蛋白复合体的形成, KBP 与 Kyot 的 LIM 区域结合, 说明 KBP 可能参与调节 Kyot 的功能<sup>[22]</sup>。Ran 是 Ras 样核 GTPase, 参与核质转运、微管装配及核膜形成<sup>[23-24]</sup>, RanBPM 是位于细胞中心的蛋白, 作为 Ran 结合蛋白参与核质的转运过程<sup>[25]</sup>。未知功能新基因的发现也为我们研究 HBV 的致病作用提供了新线索, 但需要进一步研究证实。

通过本次实验我们得知 HBcAg 能与多种蛋白相结合, 其中包括几种免疫因子, 使我们进一步了解了 HBV 病毒与免疫系统的相互关系。通过以上结果提供的这些线索, 我们可以进行更深入的研究, 进一步弄清各种与 HBcAg 结合的蛋白及作用机制, 为阻断 HBV 感染及肝细胞癌 (HCC) 发生探索新道路。

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997:55-70
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:47-50
- 3 成军. 丙型肝炎与肝脏脂肪变的相关性. 中西医结合肝病杂志 2002;12:257-259
- 4 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎病毒脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 5 张健, 成军, 李莉, 刘爱兵, 吴勤, 董菁, 王琳, 陆荫英. 慢性丙型肝炎患者血清载脂蛋白 AI 和 AII 水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 6 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠

- 娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 7 Wingfield PT, Stahl SJ, Williams RW, Steven AC. Hepatitis core antigen produced in Escherichia coli: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry* 1995;34:4919-4932
- 8 Hatton T, Zhou S, Standring DN. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* 1992;66:5232-5241
- 9 Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 1992;66:4107-4116
- 10 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 11 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 12 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 13 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 14 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 15 Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, Kuerbitz SJ, Baylin SB. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1995;1:570-577
- 16 Faraj A, Fowler DA, Bridges EG, Sommadossi JP. Effects of 2', 3'-dideoxynucleosides on proliferation and differentiation of human pluripotent progenitors in liquid culture and their effects on mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:924-930
- 17 Lewis W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med* 1995;1:417-422
- 18 Ropp PA, Copeland WC. Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics* 1996;36:449-458
- 19 Lewin TM, Van Horn CG, Krisans SK, Coleman RA. Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Arch Biochem Biophys* 2002;404:263-270
- 20 Wilson KS, Noller HF. Molecular movement inside the translational engine. *Cell* 1998;92:337-349
- 21 Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia growth and development study, Multicenter AIDS cohort study, Multicenter hemophilia cohort study, San Francisco city cohort, ALIVE study. *Science* 1996;273:1856-1862
- 22 Rong L, Jian W, Hua H. KBP, a novel protein interacting with LIM protein KyoT. *Gene* 2003;304:133-141
- 23 Azuma Y, Dasso M. The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:302-307
- 24 Heald R, Weis K. Spindles get the ran around. *Trends Cell Biol* 2000;10:1-4
- 25 Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* 1998;143:1041-1052

# 前哨淋巴结活检在胃癌外科中的应用

陆 林, 邢承忠, 徐惠绵, 郑 彬

陆林, 邢承忠, 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

郑彬, 锦州市中心医院普通外科 辽宁省锦州市 121000  
辽宁省教育厅课题资助项目, No. 202013171

项目负责人: 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: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-11

## 摘要

**目的:** 探讨胃癌前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)的临床应用及临床意义。

**方法:** 40 例胃癌患者作为研究对象, 于术中肿瘤四周注射亚甲兰, 寻找并摘取最早蓝染集中的淋巴结, 即前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)。所取得的SLN进行HE染色组织学检查及CK20、CEA抗原表达的免疫组化方法检查。

**结果:** 40 例胃癌患者中取得SLN的38例, 检出率为38/40 (95%), 术后病理证实 I、II 期胃癌 15 例, III、IV 期胃癌 25 例。由SLNB预测胃周淋巴结转移 I、II 期胃癌的准确率 93.33%, III、IV 期的准确率 69.57%; 特异性均为 100%; I、II 期胃癌的灵敏性 87.5%, III、IV 期的灵敏性 68.18%。

**结论:** SLNB是预测胃癌淋巴结转移的一种有效方法, 他能准确的预测 I、II 期胃癌胃周淋巴结转移情况, 而在 III、IV 期胃癌中SLNB不能准确预测胃周淋巴结转移情况。

陆林, 邢承忠, 徐惠绵, 郑彬. 前哨淋巴结活检在胃癌外科中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2883-2886  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2883.asp>

## 0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率均居恶性肿瘤之首。根治性手术是治疗胃癌最可靠的方法, 他包括充分切除患癌脏器, 彻底清除区域淋巴结, 完全杀灭腹腔脱落癌细胞<sup>[1]</sup>。胃癌淋巴结转移状态不仅与预后有关, 而且也涉及淋巴结清扫范围<sup>[2]</sup>。不必要的扩大根治术往往是增加手术死亡率的原因, 但至今为止还没有一种可靠的方法在术前或术中预测胃癌的淋巴结转移的状态。前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)是接受肿瘤转移的第一个淋巴结, 他反映肿瘤的转移情况, 近年来胃癌的前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)也逐渐引人关注。我们应用生物染料法示踪 SLN, 并采用常规病理及免疫组化方法检测 SLN, 以判定 SLN 预测胃周淋巴结转移状态的准确率、敏感性及特异性, 探讨 SLN 在胃癌外科中的意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集我院 40 例胃癌患者, 男 28 例, 女 12 例, 年龄 36-79 岁(平均 55.8 岁)。术前均行纤维胃镜检查及病理活检以明确诊断。所有患者均行胃癌根治术, 手术后均行系统病理检查, 常规分组剥离淋巴结, 胃癌分期及淋巴结分组分站均参照日本胃癌学会制定的第 13 版日本胃癌处理规约<sup>[3]</sup>及国际 TNM 分期标准。

### 1.2 方法

**1.2.1 SLN 标记及检出方法** 手术开腹后, 常规探查腹腔, 然后探查及确认肿瘤部位。用 5 mL 注射器抽取 4 mL 亚甲兰液(1% 亚甲兰注射液, 按 1:1 比例, 以注射用水稀释), 注射器连接 5 号头皮针或蓝芯注射针头, 在紧邻肿瘤周围 1 cm 内的正常胃壁上选对称四点注射, 每点注射剂量为 1 mL, 注射后即可见到蓝染料沿淋巴管向大小弯流动。注射后 5-10 min 内沿染色淋巴管寻找兰染集中的淋巴结(即 SLN), 将其切除, 单独选检。胃癌及淋巴结标本经 40 mL/L 多聚甲醛缓冲液固定, 常规石蜡包埋。每例患者的每枚 SLN 包埋于一个蜡块, 每只蜡块进行连续切片, 切片厚度为 5  $\mu$ m, 进行 HE 染色常规组织学检查, 并行免疫组化染色检测 CK20 和 CEA 抗原的表达。

**1.2.2 免疫组化检测方法** 采用 PV-9000 二步法免疫组化染色, 试剂盒购自美国 Zymed 公司。石蜡切片经二甲苯脱蜡、酒精处理, 浸入 30 mL/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, 然后蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min, (行 CK20 检测的切片须行高压锅加热抗原修复, 冷却, PBS 冲洗)滴入鼠抗人-抗工作液, 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜, PBS 冲洗, 2 min, 3 次, 滴加聚合物辅助剂(Polymer Helper), 室温 20 min, PBS 冲洗 2 min, 3 次, 滴加辣根酶标记羊抗小鼠 IgG 多聚体(Poly peroxidase-antimouse IgG), 室温 20 min, PBS 冲洗 2 min, 3 次, DAB 显色苏木素复色, 脱水、透明、封片。

**1.2.3 结果判定** CK20 和 CEA 阳性反应物主要定位于胞质, 呈棕黄色颗粒着色。CK20 和 CEA 抗体与正常细胞的交叉反应, 可通过其细胞大小、形态及胞核的特性与淋巴结中转移癌细胞相鉴别, HE 染色检测阴性而 CK20 或 CEA 抗体免疫组化检测阳性的淋巴结均视为微转移<sup>[4-5]</sup>。

**统计学处理** 采用 SPSS10.0 软件, 数据行  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

**2.1 胃癌 SLN 的分布** 40 例胃癌中有 38 例找到 SLN, 检出率为 95%(38/40), 共送检 SLN 84 枚, 平均每例摘取 2.21 枚(1-5 个), 多位于肿瘤周围第 I 站淋巴结中, 胃

下部癌 SLN 多位于 No(3)和 No(6)淋巴结;胃中部癌 SLN 多位于 No(3)和 No(4)淋巴结;胃上部癌 SLN 多位于 No(1)淋巴结。3 例 SLN 出现在第 II 站淋巴结中(3/38, 7.89%), 这 3 例出现在 No(7)和 No(8)淋巴结, 其中 1 例仅出现在 No(7)淋巴结。

2.2 胃癌 SLN 阳性率和微转移检查 术后病理证实, 40 例胃癌中 I、II 期占 15 例; III、IV 期 25 例, 2 例未找到 SLN, 其中 1 例为 III 期, 另 1 例为 IV 期。检出的 84 枚 SLN, 用 HE 染色方法及用 CK20、CEA 抗体免疫组化方法检测分别发现 41、46、44 枚淋巴结转移(SLN+)。其中 HE 染色常规病理检查方法阳性的 SLN, CK20 及 CEA 抗原免疫组化检测也均为阳性。各种方法检测后总的阳性淋巴结总数为 47 枚, 其中 6 枚淋巴结为微转移。6 枚微转移的淋巴结出现在 5 个 III 期病例中, 其中 CK20+、CEA- 者 2 例; CK20+、CEA- 者 3 例; CEA+、CK20- 者 1 例(表 1)。

2.3 胃癌 SLN 预测胃癌淋巴结转移 找到 SLN 的 38 例中, 有 22 例前哨淋巴结存在转移, 其中 15 例非前哨淋巴结(non-SLN)亦存在转移, 7 例前哨淋巴结为胃周淋巴结惟一转移部位。有 16 例 SLN 无转移, 其中 8 例 non-SLN 存在转移。由 SLNB 预测胃周淋巴结转移情况, 准确率 78.95%(30/38)、敏感性 73.33%(22/30)、特异性 100%(8/8)。15 例 I、II 期胃癌中, 7 例前哨淋巴结有转移(5 例为胃周淋巴结惟一转移部位), 8 例前哨淋巴结无转移(1 例非前哨淋巴结存在转移), 由 SLNB 预测胃周淋巴结转移状态的准确率为 93.33%(14/15)、敏感性 87.5%(7/8)、特异性 100%(7/7)。III、IV 期胃癌 23 例中, 有 15 例前哨淋巴结存在转移, 其中 13 例非前哨淋巴结也存在转移(2 例为胃周淋巴结惟一转移部位), 8 例前哨淋巴结无转移, 其中 7 例非前哨淋巴结存在转移, 由 SLNB 预测胃周淋巴结转移情况的准确率为 69.57%(16/23)、敏感性 68.18%(15/22)、特异性 100%(1/1)。I、II 期胃癌 SLNB 的准确率、敏感性明显高于 III、IV 期胃癌 SLNB( $P < 0.05$ )(表 2)。

表 1 不同染色方法 SLN 和微转移情况

染色方法	SLN+n	阳性比例(%)	微转移 LN 数
HE	41	48.8	
CK20	46	54.8	5
CEA	44	52.3	3
总计	47	55.9	6

表 2 由 SLN 状态预测胃周淋巴结转移情况分析

分期	敏感性(%)	特异性(%)	假阴性率(%)	准确率(%)
I、II 期	87.5 <sup>a</sup>	100	12.5	93.33 <sup>c</sup>
III、IV 期	68.18	100	31.82	69.57
合计	73.33	100	26.67	78.95

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs III、IV。

### 3 讨论

SLN 最先由 Cabanas 于 1977 年提出, 他当时在进行阴茎背侧淋巴管造影时发现了一组特殊的淋巴结。在阴茎癌患者中, 这组淋巴结是最先发生转移的淋巴结, 故命名为前哨淋巴结, 并且指出如果前哨淋巴结被检测出有肿瘤转移, 患者需要接受正规的淋巴结清扫术; 反之, 如果 SLN 没有肿瘤转移, 则进一步的淋巴结清扫并非必要的。Morton *et al* 对恶性黑色素瘤和乳腺癌患者的研究, 将前哨淋巴结定义为原发肿瘤区淋巴结引流途径中最先到达的一个或一组淋巴结, 他的位置随原发肿瘤位置改变而改变, 在不同个体中也有所不同<sup>[6]</sup>。这是一个在实践基础上抽象而成的定义, 因此为大家普遍认可。从理论上讲, 前哨淋巴结能准确的反映区域淋巴结的转移情况。恶性肿瘤的 SLNB 已成为目前肿瘤学和外科学的研究热点, 被誉为过去 10 a 间肿瘤外科最有影响的进展之一<sup>[7]</sup>。有关胃癌的 SLN 研究虽然才刚刚开始, 但其有望在术前或术中准确评估区域淋巴结转移状态。通过对胃癌前哨淋巴结活检, 判断区域淋巴结转移情况, 有可能改变一部分患者的淋巴结清扫方法和范围, 从而使一部分患者受益于微创手术<sup>[8]</sup>。

胃的淋巴引流系统高度发达, 因而胃癌的淋巴结转移错综复杂<sup>[9]</sup>。尽管经过长期大量的研究, 但胃癌淋巴结的转移规律至今仍不是十分清楚, 总的说大部分胃癌细胞沿区域淋巴结由近及远序贯转移, 但亦有小部分呈现随机性和跳跃性淋巴结转移现象。日本的 Kitagawa 教授强调指出: SLN 并不限定位置, 只要是首先转移的淋巴结就可视为 SLN, 当 SLN 发生在第二或第三站时, 其发挥的功能相当于第一站, 因此胃癌淋巴结转移的跳跃性和随机性并不构成胃癌 SLN 检测的障碍, 相反, 体现了胃癌 SLN 检测的必要性<sup>[10]</sup>。本组实验表明, SLN 多出现在第一站淋巴结中, 38 例中有 35 例 SLN 仅出现在第一站(35/38 92.1%), 但 2 例 SLN 同时出现在第 1、2 站, 1 例 SLN 只单独出现在第 2 站。

胃癌发生微转移的现象较常见<sup>[11]</sup>。微转移是指非血液系统的恶性肿瘤在发展过程中, 播散并存活于淋巴系统、血循环、骨髓、肝、肺等组织器官中的微小肿瘤细胞灶, 常无任何临床表现, 常规检查方法包括普通病理检查等都很难发现, 微转移细胞能否在宿主组织器官形成转移灶, 取决于癌细胞的生物学特性、机体的免疫状态以及宿主组织器官微环境, 多数发生凋亡, 少数进入休眠甚至增生<sup>[12]</sup>。然而, 微转移是肿瘤转移、复发的基础和前提, 微转移的检测有利于判断预后, 指导治疗。前哨淋巴结活检可以为精确的临床分期提供重要的依据。对 SLN 重点和强化的病理检查(连续薄层切片、免疫组化染色、RT-PCR), 可以使病理医生通过最小的投入而发现早期不易为常规染色所检测出的隐匿转移或微转移灶<sup>[13]</sup>。对胃癌而言, 淋巴结状态是决定分期的重要因素之一, 也是判断预后及指



导治疗的重要指标.我们用免疫组化方法检测SLN中的CK20和CEA抗原表达,可以准确评估胃癌患者SLN中微转移情况.CK20是角蛋白的一个亚型,为细胞骨架的组分之一,CK20的上皮细胞特异性更为严格,正常组织中,仅见于胃肠道和泌尿道黏膜细胞,其他如乳腺、平滑肌、血细胞、淋巴细胞和骨髓细胞均为阴性.CK20的表达在细胞发生化生、恶变、肿瘤转移等改变时持续表达阳性<sup>[14]</sup>.CEA在所有的胃癌细胞系中,不论其分化程度如何均有表达,但在正常的淋巴细胞中不表达<sup>[15]</sup>.因而这两种抗原可作为检测淋巴结中胃癌细胞的标记物,应用免疫组化方法检测CK20、CEA抗原表达,方法简便、直观,且能尽可能多的发现微转移,提高判定胃周淋巴结转移及分期的准确性.我们应用CK20和CEA抗体检测SLN,发现5例患者共6枚SLN有微转移,说明联合应用可提高微转移的检出率.文献报道<sup>[16-17]</sup>,常规病理检查阴性的患者中,出现淋巴结微转移的比例为9-33%之间.本组为6/43(13.95%).应用CK20、CEA抗体免疫组化方法检测SLN,可以更准确的进行临床分期,判断预后及指导治疗,从而促进胃癌整体诊治水平的进一步提高.

对于胃癌SLN的检出方法,至今仍无一种共识的统一标准.生物染料的选择、染料注射部位及方法,注射后摘取SLN的时机及SLN病理检查仍缺乏一致标准<sup>[18]</sup>.目前,亦有应用放射胶体示踪的方法,可以检出位置较深和较远的淋巴结,但也存在放射性对比差异及病灶部残留放射性的干扰问题.生物染料法SLN的检出率为92-99%<sup>[19-20]</sup>.Hiratsuka *et al*应用染料法检测胃癌SLN,每例摘取 $2.6 \pm 1.7$ 个SLN<sup>[19]</sup>.我们采用亚甲兰四点注射,注射时采用5号头皮针潜行刺入浆膜,并边注射边撤出针头,以加大点注射的范围,也能防止蓝染料溢出污染周围组织影响观察.我们的检出率为38/40(95%),平均每例摘取2.21个淋巴结,2例未找到SLN的属Ⅲ、Ⅳ期胃癌,可能是由于淋巴管内癌转移使之闭塞,蓝染料无法到达SLN所致.

胃癌的预后与淋巴结有无转移有密切关系,所以对SLNB而言SLN的组织学状态预测胃周淋巴区域转移情况的准确性是十分重要的,也是SLNB临床意义的表现.我们的实验,38例找到SLN的病例中,由SLN状态预测胃周淋巴结转移情况的准确率为78.95%,Ⅰ、Ⅱ期胃癌为93.33%,Ⅲ、Ⅳ期胃癌为69.57%;敏感性为73.33%,Ⅰ、Ⅱ期为87.5%,Ⅲ、Ⅳ期为68.18%;假阴性率为26.67%,Ⅰ、Ⅱ期为12.5%,Ⅲ、Ⅳ期为31.82%.说明SLNB在Ⅰ、Ⅱ期胃癌中的准确性较高,即SLN在Ⅰ、Ⅱ期胃癌中较准确地预测胃周淋巴结状态,而在Ⅲ、Ⅳ期胃癌中,SLNB的准确性低,假阳性率高.我们分析在Ⅲ、Ⅳ期胃癌中,肿瘤已浸及浆膜,黏膜下淋巴管网被扰乱,已发生转移的可能性大,肿瘤最先转移的淋巴结(SLN)早已被癌细胞占据或阻塞,此时应用生物染料示踪SLN,则无法找到真正

的SLN,所以我们考虑对Ⅲ、Ⅳ期胃癌,应采用一种新的示踪方法来寻找SLN.总之,SLNB是预测胃癌淋巴结转移的一种有效方法,他能准确的预测Ⅰ、Ⅱ期胃癌胃周淋巴结转移情况,而在Ⅲ、Ⅳ期胃癌中SLNB不能准确预测胃周淋巴结转移情况.

#### 4 参考文献

- 1 张文范,张荫昌,陈峻青.胃癌.第2版.上海:上海科学技术出版社,2001:10
- 2 陈峻青.关于胃癌、大肠癌淋巴结转移诊断和治疗的若干问题.中华医学杂志 2000;20:69-70
- 3 陈峻青.日本胃癌处理规约第13版重要修改内容简介.中国实用外科杂志 1997;77:645-646
- 4 Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer* 1997;79:1069-1076
- 5 夏加增,朱正刚,刘炳亚,燕敏,尹浩然.免疫组化检测胃癌淋巴结微转移的意义.世界华人消化杂志 2000;8:1113-1116
- 6 Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;127:392-399
- 7 Tsioulis GJ, Wood TF, Morton DL, Bilchik AJ. Lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes up-stage gastrointestinal neoplasms. *Arch Surg* 2000;135:926-932
- 8 Palaia R, Cremona F, Delrio P, Izzo F, Ruffolo F, Parisi V. Sentinel node biopsy in gastric cancer. *J Chemother* 1999;11:230-231
- 9 Sano T, Katai H, Sasako M, Maruyama K. Gastric lymphography and detection of sentinel nodes. *Recent Results Cancer Res* 2000;157:253-258
- 10 Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Watanabe M, Ohgami M, Otani Y, Ozawa S, Hasegawa H, Furukawa T, Kumai K, Ikeda T, Nakahara T, Kubo A, Kitajima M. The role of the sentinel lymph node in gastrointestinal cancer. *Surg Clin North Am* 2000;80:1799-1809
- 11 Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, Sano T, Katai H. Can sentinel node biopsy indicate rational extent of lymphadenectomy in gastric cancer surgery? Fundamental and new information on lymph-node dissection. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384:149-157
- 12 Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992;340:685-689
- 13 Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Ozawa S, Ohtani Y, Furukawa T, Yoshida M, Nakamura E, Matsuda J, Shimizu Y, Nakamura K, Kumai K, Kubo A, Kitajima M. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node sampling in esophageal and gastric cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:293-304
- 14 Schuster R, Max N, Mann B, Heufelder K, Thilo F, Grone J, Rokos F, Buhr HJ, Thiel E, Keilholz U. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer* 2004;108:219-227
- 15 Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, Shimizu N, Tsuji E, Yamaguchi H, Mafune K, Tange T, Tatematsu M, Kaminishi M. Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: a comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer* 2003;105:136-143
- 16 Isozaki H, Kimura T, Tanaka N, Satoh K, Matsumoto S, Ninomiya M, Ohsaki T, Mori M. Esophagus gastrointestinal surgical treatment study group. An assessment of the feasibility of sentinel lymph node-guided surgery for gastric cancer. *Gastric Cancer* 2004;7:149-153
- 17 Dowlatshahi K, Fan M, Bloom KJ, Spitz DJ, Patel S, Snider

- HC Jr. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: A preliminary study. *Cancer* 1999;86:990-996
- 18 Pfeifer JD. Sentinel lymph node biopsy. *Am J Clin Pathol* 1999; 112:599-602
- 19 Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, Furukawa H,

- Motomura K, Ohigashi H, Kameyama M, Sasaki Y, Kabuto T, Ishiguro S, Imaoka S, Koyama H. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001;129:335-340
- 20 Wong JH, Steinman S, Calderia C, Bowles J, Namiki T. Ex vivo sentinel node mapping in carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 2001;233:515-521

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

• 研究快报 •

## 应用表达谱芯片技术筛选 HBcAg 反式调节基因

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室感染三科 北京市 100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室感染三科. [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn)  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

**目的:** 筛选与克隆HBcAg激活基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制。

**方法:** 以分子生物学技术构建 HBcAg 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-HBcAg, 以表达质粒 pcDNA3.1(-)-HBcAg 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-) 为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取 mRNA. 应用基因表达谱芯片技术对差异表达 mRNA 进行检测和分析。

**结果:** HBcAg 表达质粒 pcDNA3.1(-)-HBcAg 经酶切鉴定和 DNA 测序鉴定正确. 经基因表达谱芯片分析, 29 种基因的表达水平上调, 17 种基因的表达水平下调。

**结论:** 筛选到一些与细胞内信号传导、免疫调节、细胞凋亡、蛋白质翻译合成、肿瘤发生相关的 HBcAg 反式调节的靶基因。

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬. 应用表达谱芯片技术筛选 HBcAg 反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2886-2890  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2886.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝 DNA 病毒, 是一种严重

危害人类健康的致病因子. 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关<sup>[1]</sup>. HBcAg 是由 HBV DNA C 基因区编码的一种结构性蛋白, 有保守的三维结构, 可因血清型不同而有 183-185 个氨基酸残基(aa), 在乙型肝炎病毒(HBV)的生活周期中, 病毒核心抗原(HBcAg)、病毒 mRNA 和 DNA 聚合酶共同构成核心颗粒, 在核心颗粒中完成病毒 DNA 的合成<sup>[2-3]</sup>. 基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)是由大量目的基因片段有序、密集地固定于玻片或尼龙膜上制成芯片, 将两组组织或细胞的 mRNA 逆转录成 cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因<sup>[4-7]</sup>. 为从不同角度对 HBcAg 的反式调节基因进行验证及了解 HBcAg 对于肝细胞基因表达谱的影响, 我们应用基因表达谱芯片技术检测肝癌细胞系在 HBcAg 基因转染后差异表达的基因谱的变化。

### 1 材料和方法

**1.1 试剂** HepG2 细胞及感受态 *E.coli* JM109 (本室保存), pcDNA3.1(-) 真核表达载体 (Invitrogen); FuGENE6 转染试剂, 总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Gibco 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, 表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供. pcDNA3.1(-)-HBcAg 表达载体由本室构建。

**1.2 目的基因的扩增与纯化** 以质粒 pCP10 中所含的 HBV ayw 亚型的 DNA 序列为模板, 用 PCR 方法扩增 HBcAg 基因片段. 上游引物为: 5' -GCT AGC CAT GGA CAT CGA CCC TTA TA-3', 下游引物为: 5' -GGT ACC CTA ACA TTG AGG TTC CCG AG-3'. PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 以 GeneClean II kit (Bio 101 公司) 回收纯化 550 bp DNA 条带。

- HC Jr. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: A preliminary study. *Cancer* 1999;86:990-996
- 18 Pfeifer JD. Sentinel lymph node biopsy. *Am J Clin Pathol* 1999; 112:599-602
- 19 Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, Furukawa H,

- Motomura K, Ohigashi H, Kameyama M, Sasaki Y, Kabuto T, Ishiguro S, Imaoka S, Koyama H. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001;129:335-340
- 20 Wong JH, Steinman S, Calderia C, Bowles J, Namiki T. Ex vivo sentinel node mapping in carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 2001;233:515-521

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

• 研究快报 •

## 应用表达谱芯片技术筛选 HBcAg 反式调节基因

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室感染三科 北京市 100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室感染三科. [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn)  
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

**目的:** 筛选与克隆HBcAg激活基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制。

**方法:** 以分子生物学技术构建 HBcAg 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-HBcAg, 以表达质粒 pcDNA3.1(-)-HBcAg 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-) 为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取 mRNA. 应用基因表达谱芯片技术对差异表达 mRNA 进行检测和分析。

**结果:** HBcAg 表达质粒 pcDNA3.1(-)-HBcAg 经酶切鉴定和 DNA 测序鉴定正确. 经基因表达谱芯片分析, 29 种基因的表达水平上调, 17 种基因的表达水平下调。

**结论:** 筛选到一些与细胞内信号传导、免疫调节、细胞凋亡、蛋白质翻译合成、肿瘤发生相关的 HBcAg 反式调节的靶基因。

徐志强, 成军, 张鸿飞, 王建军, 刘妍, 纪冬. 应用表达谱芯片技术筛选 HBcAg 反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2886-2890  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2886.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝 DNA 病毒, 是一种严重

危害人类健康的致病因子. 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关<sup>[1]</sup>. HBcAg 是由 HBV DNA C 基因区编码的一种结构性蛋白, 有保守的三维结构, 可因血清型不同而有 183-185 个氨基酸残基(aa), 在乙型肝炎病毒(HBV)的生活周期中, 病毒核心抗原(HBcAg)、病毒 mRNA 和 DNA 聚合酶共同构成核心颗粒, 在核心颗粒中完成病毒 DNA 的合成<sup>[2-3]</sup>. 基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)是由大量目的基因片段有序、密集地固定于玻片或尼龙膜上制成芯片, 将两组组织或细胞的 mRNA 逆转录成 cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因<sup>[4-7]</sup>. 为从不同角度对 HBcAg 的反式调节基因进行验证及了解 HBcAg 对于肝细胞基因表达谱的影响, 我们应用基因表达谱芯片技术检测肝癌细胞系在 HBcAg 基因转染后差异表达的基因谱的变化。

### 1 材料和方法

**1.1 试剂** HepG2 细胞及感受态 *E.coli* JM109 (本室保存), pcDNA3.1(-) 真核表达载体 (Invitrogen); FuGENE6 转染试剂, 总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Gibco 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, 表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供. pcDNA3.1(-)-HBcAg 表达载体由本室构建。

**1.2 目的基因的扩增与纯化** 以质粒 pCP10 中所含的 HBV ayw 亚型的 DNA 序列为模板, 用 PCR 方法扩增 HBcAg 基因片段. 上游引物为: 5' -GCT AGC CAT GGA CAT CGA CCC TTA TA-3', 下游引物为: 5' -GGT ACC CTA ACA TTG AGG TTC CCG AG-3'. PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 以 GeneClean II kit (Bio 101 公司) 回收纯化 550 bp DNA 条带。

1.3 细胞培养和取材 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞,细胞生长至对数期时,以脂质体转染试剂FuGENE分别将2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-HBcAg和空载体pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞,48 h后收获细胞,每5  $\times$  10<sup>6</sup> 个细胞加入1 mL Trizol 试剂,立即于液氮中保存。

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

1.5 探针标记 参照 Schena *et al*<sup>[1]</sup> 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5  $\mu$ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5  $\mu$ g)。乙醇沉淀后溶解在 20  $\mu$ L 5  $\times$  SSC+2 g/L SDS 杂交液中。

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

1.7 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95  $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min,将混合探针加在基因芯片上,置于 60  $^{\circ}$ C 杂交 15–17 h。依次以 2  $\times$  SSC+2 g/L SDS、1  $\times$  SSC+2 g/L SDS、1  $\times$  SSC 洗涤 10 min,室温晾干。

1.8 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片。用预先选定的内参照基因(24 条管家基因,每个基因点 2 个点,共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正。用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度,计算 Cy5/Cy3 比值。阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0,红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5,为绿色荧光,显示表达减弱。

## 2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 pcDNA3.1(-)-HBcAg 载体经 *Kpn* I/*Nhe* I 双酶切鉴定可见 550 bp 的 HBcAg 基因 DNA 条带,证明载体构建正确(图 1)。

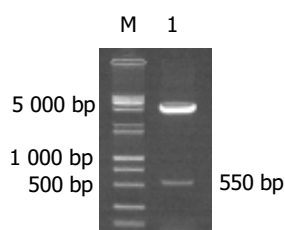


图 1 pcDNA3.1(-)-HBcAg 载体经 *Kpn* I/*Nhe* I 双酶切电泳图。

2.2 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度  $A_{260}/A_{280} = 1.82$ , 热稳定实验 70  $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20  $^{\circ}$ C 1 h 的电泳条带比较,显示 28 S 条带无明显降解,电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA。

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA。为了监控芯片杂交体系,在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因,共 8 个点),这些点的杂交信号均很低,证实了数据的可靠性。由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色),对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色),红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异,黄色代表表达水平无差异。按阳性标准,从 1 000 个基因中筛选出差异常表达基因共 46 条,其中 29 条基因表达显著增强(Cy5/Cy3 > 2.0),17 条基因表达显著降低(Cy5/Cy3 < 0.5)。

2.4 差异表达基因分析 表达显著增强的基因有 29 条(表 1)。表达显著降低的基因有 17 条(表 2)。

## 3 讨论

HBcAg 存在于 Dane 颗粒的核心,是 HBV 的结构蛋白即病毒核壳蛋白,他反映血清中 Dane 颗粒的存在及肝内 HBV 的复制。HBcAg 由 HBV 基因组的 C 开放读码区(ORF)编码,从第二个 ATG(1 901 nt)起始翻译(终止密码子在 2 458 nt)。HBcAg 有保守的三维结构,可因血清型不同而有 183–185 个氨基酸残基(aa),*M<sub>r</sub>* 21 000,180 个 HBcAg 形成 27 nm 的正 20 面体以构成核心颗粒。HBcAg 已被证明含有 HBV 特异性 DNA 聚合酶,是有能力合成 DNA 的病毒特异性酶,是 HBV 复制的标志。存在于乙型肝炎患者血液和肝组织内的 HBcAg 具有重要的生物学特性和临床病理意义。HBcAg 具有高度免疫原性,在 T 细胞和 B 细胞水平上,HBcAg 的抗原性较 HBcAg 强 100 倍,几乎所有 HBV 感染者都产生抗-HBc,HBcAg 既可作为 T 细胞依赖性抗原,也可作为非 T 细胞依赖性抗原,诱导强烈细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)应答<sup>[8]</sup>。对 HBcAg 的免疫应答在病毒清除中可能有重要作用<sup>[9–10]</sup>。HBcAg 有鱼精蛋白样亲胞核性的羧基末端,可介导细胞核内转运信号,使大量 HBcAg 进入细胞核内,而其他嗜肝 DNA 病毒的核壳蛋白都不向核内转运。在病毒成熟过程中,核壳和外膜相互作用,形成病毒颗粒分泌的信号<sup>[11–12]</sup>。HBcAg 具有保护病毒 mRNA,防止其被 RNA 酶降解的作用,对于乙肝病毒前基因组 RNA 的装配、基因组 DNA 的合成具有重要的作用。HBcAg 有高免疫原性,HBcAg 与 HBcAg 一同为细胞毒性 T 细胞(Tc)细胞识别的主要靶抗原。HBcAg 在 HBV 的装配和致病机制中是必不可少的,HBcAg 是否还通过其他途径影响免疫应答,损害肝细胞的功能,是否参与肝细胞癌的发生,如何作用,是研究 HBcAg 复杂功能中需要解决的关键点。寻找肝细胞中 HBcAg 的相互作用的基因,并进一步探明其机制,对解答上述问题有着重要意义。

表1 表达显著增加的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_005917	苹果酸脱氢酶 1(MDH1)	2.010
2	NM_013943	细胞内氯化物通道蛋白 4(CLIC4)	2.018
3	NM_000176	核受体亚家族 3, C 组, 1 号(NR3C1)	2.020
4	AF012086	Ran 结合蛋白 2(RanBP2alpha)	2.034
5	AF072928	肌管蛋白相关蛋白 6	2.038
6	AK055660	克隆 IMR321000219	2.045
7	NM_001892	酪蛋白激酶 1, $\alpha 1$ (CSNK1A1)	2.065
8	NM_004661	细胞分裂周期蛋白 23(CDC23)	2.068
9	NM_005335	造血细胞特异性 Lyn 底物 1(HCLS1)	2.071
10	AF070674	凋亡蛋白 1 抑制剂(MIHC)	2.085
11	AB014731	平滑肌细胞相关蛋白 3(SMAP-3)	2.113
12	NM_003591	cullin2(CUL2)	2.122
13	NM_005836	翻译抑制蛋白 p14.5(UK114)	2.133
14	NM_053274	FK506 结合蛋白相关蛋白(FAP48)	2.145
15	AJ243706	视网膜母细胞瘤结合蛋白(rbbp2h1a gene)	2.162
16	NM_000817	谷氨酸脱羧酶 1(GAD1)	2.170
17	NM_007268	免疫球蛋白超家族蛋白(Z39IG)	2.178
18	NM_006407	维生素 A 反应性细胞骨架相关蛋白(JWA)	2.289
19	NM_003129	鲨烯环氧酶(SQLE)	2.291
20	D50683	转化生长因子 $\beta$ II 受体 $\alpha$	2.326
21	NM_006995	Butyrophilin 亚家族 2 成员 A2 (BTN2A2)	2.353
22	NM_006918	固醇 C5 去饱和酶(SC5DL)	2.366
23	NM_006183	神经降压素(NTS)	2.398
24	NM_002736	cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位 2 $\beta$ (PRKAR2B)	2.429
25	NM_001316	染色体分离蛋白 1(CSE1L)	2.556
26	AF134802	cofilin 亚型 1	2.614
27	BC017169	未知基因 MGC:9535	2.619
28	NM_007034	DnaJ 样热休克蛋白 40(HLJ1)	2.630
29	NM_014887	假设蛋白(CG005)	2.813

表2 表达显著降低的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_015385	Src 同源区 3 蛋白 5 (SH3D5)	0.352
2	AB032951	KIAA1125 蛋白	0.358
3	NM_021138	TNF 受体相关因子 2 (TRAF2)	0.365
4	AF110908	TNF 受体相关因子 3(TRAF-3)	0.481
5	NM_000269	表达在 NME1 的非转移性细胞蛋白 1	0.373
6	NM_006609	丝裂原激活蛋白激酶激酶 2(MAP3K2)	0.415
7	NM_001910	组织蛋白酶 E(CTSE)	0.447
8	NM_002388	微小染色体维持缺陷蛋白 3(MCM3)	0.450
9	NM_006913	环指蛋白 5(RNF5)	0.452
10	NM_005345	M,70 000 热休克蛋白 1A(HSPA1A)	0.461
11	AF090094	克隆 IMAGE 172979	0.464
12	NM_002421	基质金属蛋白酶 1(MMP1)	0.468
13	NM_004728	DEAD/H 盒多肽 21 (DDX21)	0.367
14	NM_013330	表达在二磷酸核苷激酶的非转移性细胞蛋白 7(NME7)	0.485
15	NM_006077	钙结合的过敏相关的自身抗体 1(CBARA1)	0.492
16	NM_001343	果蝇同源的丝裂原反应蛋白 2(DAB2)	0.496
17	NM_033138	调钙蛋白的结合蛋白 1(CALD1)	0.497

我们用分子生物学技术构建了 HBcAg 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-HBcAg, 并用空载体作为阴性对照, 利用脂质体转染 HepG2 细胞, 之后从中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 进行基因芯片技术分析. 结果表明, 29 种基因的表达水平上调, 17 种基因的表达水平下调.

在差异表达的基因中包括各种参与氧化还原反应的酶类(苹果酸脱氢酶、谷氨酸脱羧酶 1、鲨烯环氧酶、固醇 C5 去饱和酶)、细胞信号转导和细胞周期相关蛋白基因(HCLS1、翻译抑制蛋白、转化生长因子  $\beta$  II 受体  $\alpha$ 、酪蛋白激酶 1、cAMP 依赖蛋白激酶、SH3D5)、细胞凋亡(CLIC4、MIHC、TRAF2、TRAF3)、免疫反应调节蛋白基因(FKBP 相关蛋白、cullin2)及肿瘤发生相关基因(视网膜母细胞瘤结合蛋白)等及未知基因.

上调的基因中, CLIC4 是氯化物细胞内通道蛋白家族中的成员<sup>[13]</sup>, 存在于角化细胞的线粒体和细胞质内, 参与细胞凋亡过程<sup>[14-15]</sup>, 在多重压力作用下, CLIC4 从胞质向胞核内迁移, 免疫金电镜和共聚焦分析显示核内 CLIC4 表达先于细胞凋亡. Ran 是真核细胞核运输过程中必需的小 GTP 酶, 在细胞 mRNA 加工, 细胞周期调节等方面发挥作用, Ran 结合蛋白 2 即 RanBP2 是核孔蛋白, 在细胞核浆物质转运过程中起重要作用<sup>[16-17]</sup>. 细胞分裂周期蛋白 CDC23 与酿酒酵母的 CDC23 高度同源, 是促进细胞分裂后期复合物(anaphase-promoting complex, APC)的成员, 对于细胞周期由 G2 期向 M 期过渡是必不可少的. APC 能够催化细胞周期蛋白 B 与泛素(cyclin B-ubiquitin)形成共轭复合物, 在泛素介导的细胞周期蛋白 B 的蛋白水解过程中起重要作用, HBcAg 通过上调 CDC23 的表达对细胞周期有调控作用<sup>[18]</sup>. HCLS1 基因表达于人造血细胞内<sup>[19]</sup>, 编码蛋白-酪氨酸激酶的底物, 这种细胞内蛋白与 B 和 T 淋巴细胞抗原受体的信号传导有关. 凋亡蛋白 1 抑制剂能够抑制细胞凋亡, 促进肿瘤细胞的生长<sup>[20]</sup>. Cullin2 基因为肿瘤抑制基因<sup>[21]</sup>. FKBP 相关蛋白(FAP48)是细胞内与免疫调节有密切关系的蛋白, 可以与肽基脯氨酰异构酶 FK506 结合蛋白 59(FK506-binding protein 59, FKBP59)和 FKBP12 蛋白结合, 由于其相对分子质量为  $M_r$  48 000, 故命名为 FKBP 相关蛋白(FAP48), 此三种蛋白均具有大环内酯类分子的结合位点, 可能是这些免疫抑制剂药物受体的天然的共同配体分子. FAP48 与 FKBP 分子之间的结合可被大环内酯类物 FK506 所阻断, 说明免疫亲和素分子中的结合位点与 FK506 的结合位点相重叠. FAP48 的过表达可以抑制细胞的增生, 促进 IL2 的合成, 在免疫调节及临床疾病的发生、发展过程中具有十分重要的作用<sup>[22-23]</sup>. 鲨烯环氧酶(SQLE)与脂类代谢相关, SQLE 参与胆固醇的生物合成, 是胆固醇生物合成过程中重要的限速酶, 其升高可以促进血中胆固醇水平升高, 许多药物通过抑制其活性可起到降低血中胆固醇的作用<sup>[24-26]</sup>. cAMP 依赖的蛋白激酶调节亚单位 II  $\beta$  PRKAR2B 是参与细胞信号转导途径主要因子<sup>[27]</sup>.

在下调的基因中, SH3D5<sup>[28]</sup>、丝裂素活化的蛋白激酶激酶激酶 2 参与细胞内信号传导途径. TRAF2、TRAF-3 具有重要的介导肿瘤坏死因子信号的作用, 能够活化核因子 kappaB、JNK 和细胞凋亡<sup>[29-30]</sup>.

微小染色体维持缺陷 3 蛋白是 DNA 复制中起重要作用的核蛋白<sup>[31]</sup>. DEAD/H 盒多肽(DDX21)是推定的重要的 RNA 解旋酶, 参与众多细胞的 RNA 二级结构加工过程, 如翻译起始、核糖体 RNA 合成及加工过程. DDX21 在肿瘤组织中低表达, 而在正常组织中有显著的高水平表达. HBcAg 对 DDX21 的表达有下调作用, 提示, HBcAg 蛋白在一定程度上可能下调细胞核糖体 RNA 加工与合成<sup>[32]</sup>. 钙调素结合蛋白 1(CALD1)与体内金属代谢有关. 基质金属蛋白酶 1(MMP1)<sup>[33]</sup>具有细胞毒性作用, 其可能的机制是通过分解赖以维持细胞生存的基质蛋白而提高细胞毒性, 也可分解底物产生促使细胞死亡的分子, 另外还可作用于细胞表面受体而影响细胞生存.

总之, 我们利用基因表达谱芯片分析了 HBcAg 对肝细胞基因表达谱的影响, HBcAg 能够上调或下调 HepG2 细胞中许多不同基因表达的变化, 这些基因变化是复杂的, 有的甚至是矛盾的, 这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、免疫应答、物质运输、细胞凋亡、肿瘤发生等生物过程密切相关. 我们的实验结果为了解 HBcAg 在肝细胞中的生物学效应提供了某些线索, 当然, 还需要进一步的实验加以深入研究.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-88
- 2 Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett* 1999;442:1-6
- 3 Le Pogam S, Shih C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- 4 Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarray for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:1517-1523
- 5 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 6 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537
- 7 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- 8 Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. *Hum Immunol* 1999;60:1013-1017
- 9 Marinos G, Torre F, Chokshi S. Induction of T-helper cell response to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B: a major factor in activation of the host immune response to the hepatitis B virus. *Hepatology* 1995;22:1040-1049
- 10 Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-232
- 11 Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM, Steven AC, Wingfield PT. The morphogenic linker peptide of HBV

- capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J* 2002;21:876-884
- 12 Karpenko LI, Ivanisenko VA, Pika IA, Chikaev NA, Eroshkin AM, Veremeiko TA, Ilyichev AA. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids* 2000;18:329-337
- 13 Berryman MA, Goldenring JR. CLIC4 is enriched at cell-cell junctions and colocalizes with AKAP350 at the centrosome and midbody of cultured mammalian cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;56:159-172
- 14 Suh KS, Mutoh M, Nagashima K, Fernandez-Salas E, Edwards LE, Hayes DD, Crutchley JM, Marin KG, Dumont RA, Levy JM, Cheng C, Garfield S, Yuspa SH. The organellar chloride channel protein CLIC4/mtCLIC translocates to the nucleus in response to cellular stress and accelerates apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:4632-4641
- 15 Fernandez-Salas E, Suh KS, Speransky VV, Bowers WL, Levy JM, Adams T, Pathak KR, Edwards LE, Hayes DD, Cheng C, Steven AC, Weinberg WC, Yuspa SH. mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Mol Cell Biol* 2002;22:3610-3620
- 16 Miyauchi Y, Yogosawa S, Honda R, Nishida T, Yasuda H. Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem* 2002;277:50131-50136
- 17 Nothwang HG, Rensing C, Kubler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurnit D, Hildebrandt F. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998;47:383-392
- 18 Zhao N, Lai F, Fernald AA, Eisenbart JD, Espinosa R, Wang PW, Le Beau MM. Human CDC23: cDNA cloning, mapping to 5q31, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics* 1998;53:184-190
- 19 Egashira M, Kitamura D, Watanabe T, Niikawa N. The human HCLS1 gene maps to chromosome 3q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72:175-176
- 20 Gordon GJ, Appasani K, Parcells JP, Mukhopadhyay NK, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma. *Carcinogenesis* 2002;23:1017-1024
- 21 Duerr EM, Gimm O, Neuberger DS, Kum JB, Clifford SC, Toledo SP, Maher ER, Dahia PL, Eng C. Differences in allelic distribution of two polymorphisms in the VHL-associated gene CUL2 in pheochromocytoma patients without somatic CUL2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3207-3211
- 22 成军, 刘妍, 杨倩, 王建军, 洪源, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对 FAP48 信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:962-965
- 23 Krummrei U, Baulieu EE, Chambraud B. Proliferate the FKBP-associated protein FAP48 is an antiproliferative molecule and a player in T cell activation that increases IL2 synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2444-2449
- 24 Hiyoshi H, Yanagimachi M, Ito M, Yasuda N, Okada T, Ikuta H, Shinmyo D, Tanaka K, Kurusu N, Yoshida I, Abe S, Saeki T, Tanaka H. J Lipid Res. Squalene synthase inhibitors suppress triglyceride biosynthesis through the farnesol pathway in rat. *Hepatocytes* 2003;44:128-135
- 25 Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Clinical trichophyton rubrum strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:82-86
- 26 Sawada M, Matsuo M, Seki J. Inhibition of cholesterol synthesis causes both hypercholesterolemia and hypocholesterolemia in hamsters. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1577-1582
- 27 Solberg R, Sistonen P, Traskelin AL, Berube D, Simard J, Krajci P, Jahnsen T, de la Chapelle A. Mapping of the regulatory subunits RI beta and RII beta of cAMP-dependent protein kinase genes on human chromosome 7. *Genomics* 1992;14:63-69
- 28 Chamnongpol S, Li X. SH3 domain protein-binding arrays. *Methods Mol Biol* 2004;278:183-190
- 29 Gotoh Y, Oishi K, Shibata H, Yamagiwa A, Isagawa T, Nishimura T, Goyama E, Takahashi M, Mukai H, Ono Y. Protein kinase PKN1 associates with TRAF2 and is involved in TRAF2-NF-kappaB signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:688-694
- 30 Ramalingam P, Chu WS, Tubbs R, Rybicki L, Pettay J, Hsi ED. Latent membrane protein 1, tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF-2, TRAF-3, and nuclear factor kappa B expression in posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1335-1339
- 31 Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Takisawa H, Nojima H. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of Xenopus DNA replication licensing factor. *Cell* 1995; 81:601-609
- 32 Valdez BC, Yang H, Hong E, Sequitin AM. Genomic structure of newly identified paralogue of RNA helicase II/Gu: detection of pseudogenes and multiple alternatively spliced mRNAs. *Gene* 2002;284:53-61
- 33 Conant K, St Hillaire C, Nagase H, Visse R, Gary D, Haughey N, Anderson C, Turchan J, Nath A. Matrix metalloproteinase 1 interacts with neuronal integrins and stimulates dephosphorylation of Akt. *J Biol Chem* 2004;279:8056-8062



# 肝癌切除术后高凝状态对肿瘤转移的影响

白莉, 毛高平, 张映辉, 曹传平

白莉, 毛高平, 张映辉, 曹传平, 中国人民解放军空军总医院消化内科  
北京市 100036

项目负责人: 白莉, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院消化内科, bai\_li@hotmail.com

电话: 010-66928046

收稿日期: 2004-10-15 接受日期: 2004-11-04

## 摘要

**目的:** 探讨肝癌手术切除后机体凝血活性的改变对肿瘤复发和转移的影响。

**方法:** 切除正常成年615小鼠部分肝脏, 24 h后取血测凝血活性。在部分肝切除(PH)的动物同时给予脾接种转移性肝癌细胞, 在手术前后给予纤溶酶抗凝治疗, 饲养动物11 d后分析肿瘤转移程度。

**结果:** 单纯PH组术后血小板聚集(PLT)和纤维蛋白原(Fbg)含量明显增加( $P=0.018<0.05$ ,  $P=0.012<0.05$ ), 提示凝血活性显著增高; 由于凝血因子消耗, 部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)显著延长( $P=0.007<0.01$ ,  $P=0.0019<0.01$ )。在给予PH组动物纤溶酶处理后, 除PT外, 几乎全部恢复到手术前水平( $P>0.05$ )。手术+抗凝治疗组肿瘤转移程度较单纯手术组有明显减少( $P=0.003<0.01$ )。

**结论:** PH后机体高凝状态与术后肿瘤转移增强可能有明显相关性。

白莉, 毛高平, 张映辉, 曹传平. 肝癌切除术后高凝状态对肿瘤转移的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2891-2893

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2891.asp>

## 0 引言

文献报道, 肝癌切除后2-3 a内复发多为原发灶播散<sup>[1-2]</sup>, 复发的因素主要与术前肿瘤的生物学特性包括肿瘤的大小、瘤结节的数目、门静脉癌栓、术后机体的免疫状态、原有肝脏病变情况如肝炎和肝硬化的状态有关。手术本身诱发血液高凝状态有助于循环血中的瘤细胞附着在血管内皮, 在其他因素的参与下穿透血管壁进入组织形成转移病灶, 这些瘤细胞来源于原发病灶的脱落和医源性如手术挤压瘤体。手术因素造成肝癌复发出现在较早期, 因此与外科治疗的成败密切相关。我们针对手术后血液高凝状态对肝癌术后转移的影响进一步分析。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 615小鼠, 18-22 g, 雌雄各半, 共32只, 购自预防医学科学院实验动物中心。615小鼠H<sub>22</sub>肝癌腹

水瘤细胞购自中国医学科学院病理系。纤溶酶由航空医学研究所馈赠。

## 1.2 方法

**1.2.1 部分肝切除(PH)动物模型** 将实验动物分为PH组、PH+纤溶酶治疗组和非PH对照组。PH组动物在乙醚麻醉下腹部正中行纵形切口, 取鼠肝右叶切除占全肝重量的25%的肝组织, 局部压迫止血后关腹。在术后24 h用乙醚麻醉后开腹经下腔静脉取血, 立即按照1:9比例与含枸橼酸钠的抗凝剂充分混合。

**1.2.2 肝转移动物模型及抗凝治疗** 小鼠随机分为PH组、PH+纤溶酶治疗组和对照组。同上方法切除占全肝1/3体积肝脏, 取活体615小鼠H<sub>22</sub>肝癌腹水瘤细胞 $1 \times 10^6$ 脾包膜下注射, 动物被饲养11 d后断颈处死, 取肝脏进行转移集落计数。治疗组每只动物给予纤溶酶0.1 mg (1 g/L, 航空医学研究所)尾静脉注射, 隔日给药一次, 术前及术后各两次。

**1.2.3 凝血活性指标** 凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(Fbg)、部分凝血活酶时间(APTT)和血小板聚集(PLT)采用临床常规方法检测。PH组、PH+纤溶酶治疗组和对照组动物分别为10、12和10只。所有检测均重复三次。

**1.2.4 转移瘤定级标准** 参照高进制定的标准稍加改进<sup>[3,4]</sup>。0级: 无转移。I级: 在肝的一个叶内有1-2个小转移灶, 直径0.2-0.5 mm。II级: 肝内有3-5个小转移灶或1-2个较大转移灶, 直径0.5-1 mm。III级: 肝内转移灶>1 mm, 但<1 cm, 或小转移灶数目较多, 未波及全肝者。IV级: 肝内肿块>1 cm, 或弥散性病灶波及全肝者。本研究中所计数的肝转移灶均为肝表面肉眼所见的病灶。

**统计学处理** 各组计量数据以均数±标准差(mean±SD)表示, 采用SPSS统计软件进行组间显著性分析和非参数对比分析。

## 2 结果

**2.1 PH动物手术前、后凝血活性测定结果** PH后24 h采集静脉血测定APTT、Fbg、PT和PLT(图1)。经t检验学分析, PH组的实验动物体内凝血活性在术后24 h已发生明显的变化。与非PH对照组比较, 单纯PH组显示术后PLT和Fbg含量明显增加( $P=0.018<0.05$ ,  $P=0.012<0.05$ ), 提示凝血活性显著增高; 由于凝血因子的消耗, 反映内源性凝血系统活性的APTT和外源性凝血系统活性的PT显示明显延长( $P=0.007<0.01$ ,  $P=0.0019<0.01$ )。在给予PH组动物纤溶酶处理后, 除PT外, 几

乎全部恢复到手术前水平( $P>0.05$ )(图 1)。

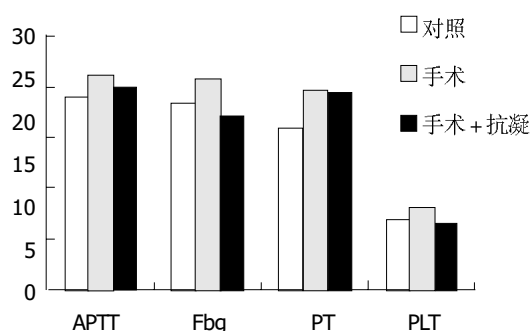


图 1 手术组与手术 + 抗凝治疗组动物凝血活性测定结果。

2.2 抗凝治疗对术后肝癌转移的影响 PH同时脾接种瘤细胞,在术后 11 d 杀鼠,留取肝脏进行肿瘤转移分析,结果如表 1。

经 SPSS 的非参数统计分析,治疗组肿瘤转移程度较对照组有显著性差异( $P = 0.003 < 0.01$ , 表 1)。

表 1 PH 同时抗凝治疗后肝内肿瘤转移病灶分析

组别	n	肿瘤分期				
		0	I	II	III	IV
对照组	40	0	0	3	21	16
治疗组	38	0	3	4	27	4

### 3 讨论

凝血功能异常是某些恶性肿瘤的基本特征,如乳腺癌、原发性肝癌等患者均存在血液高凝状态。根据统计,约有 60% 以上的恶性肿瘤患者出血时间缩短,部分凝血因子增高。在晚期肿瘤患者中,纤维蛋白原含量增高,血小板寿命缩短。一方面,肿瘤细胞可激活血小板和纤维蛋白原引起机体凝血功能障碍,出现血栓形成、出血、甚至弥漫性血管内凝血。另一方面,肿瘤细胞、血小板和纤维蛋白三者形成瘤栓,这有助于肿瘤细胞躲避机体免疫系统的识别而发生浸润、生长和转移。因此,异常凝血机制是促恶性肿瘤转移的关键因素之一。尹格平<sup>[14]</sup>发现老年癌症患者手术后血小板P-选择素(CD62P)及血小板反应蛋白(thrombospondin,一种可接受促分裂原刺激的钙结合糖蛋白,对血栓块具有稳定作用,主要见于血小板的 $\alpha$ 颗粒)在男性患者较术前分别升高了 10.41 和 5.09 倍,女性升高了 2.47 和 2.01 倍。

手术能导致机体凝血活性增高。肝部分切除术后,凝血活性明显增强在文献中已有报道,如 Skurzak *et al* 检测 10 名健康供肝者在部分肝切除后机体血凝状态时发现,术后第 5 和第 10 d 分别有 4 和 6 例供肝者出现血液高凝状态,1 例在第 8 d 出现深静脉血栓<sup>[15]</sup>。不仅肝脏手术可引起机体凝血活性明显增强,腹部大手术的患者手术后也出现高凝状态,原因与血小板反应性增加有关<sup>[3]</sup>。我们的实验提示 PH 术后动物体内凝血系统

活性明显增强,瘤细胞在术后 48–72 h 就发现有附着于血管壁,故从形态学上证实,肿瘤细胞的黏附、着床、转移与凝血活性显著增高有关。不仅如此,由于手术创伤可造成内皮细胞的损伤,使血小板和凝血酶活化,纤维蛋白原及纤维蛋白含量增加,所以外科手术术后极易于在微血管内形血栓。此外,小血管的损伤造成涡流形成,也有助于肿瘤细胞的滞留和黏附。在手术或非手术因素诱发的严重感染的情况下,血管内皮细胞损伤脱落、胶原组织暴露,血小板与之发生黏附、聚集和释放反应,其释放的产物可使血小板进一步聚集成大量血小板微血栓,有利于血小板、纤维蛋白和瘤细胞三体复合物的形成,为肿瘤细胞的着床提供有利条件。就凝血酶本身来说,对肿瘤转移的作用是通过骨桥蛋白(Osteopontin, OPN, 一种唾液酸蛋白,可与细胞结合充当细胞与细胞外基质之间的桥梁)而实现的<sup>[9]</sup>。肿瘤细胞可合成 OPN,它具有 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)的结构,是细胞黏附的位点,通过与整合素( $\alpha_v\beta_3$ )结合介导细胞的黏附和游走<sup>[15-6]</sup>。凝血酶除了能强烈诱导血小板聚集外,又是一种强烈的促分裂剂。他还可诱导细胞表面整合素  $\alpha_{IIb}\beta_3$  的表达,从而促使肿瘤细胞黏附于内皮细胞和间质蛋白上<sup>[7]</sup>。

吴孟超 *et al* 发现临床肝切除术后复发早者可在术后 2 mo 内,高峰期术后 1–2 a,而术后 5 a 以上复发的病例较少<sup>[13]</sup>。关于术后复发的原因多数人认为这是由于原有在残余肝脏内的微卫星病灶迅速生长的原因。但肝移植术后的肝癌复发提示,残留在血流中的肿瘤细胞因其嗜肝性可能重新种植在肝脏。据文献报道,术前肿瘤的大小、有无血管受侵或癌栓、血中甲胎蛋白(AFP)的水平等均与移植后的复发有关<sup>[10-12]</sup>。肿瘤的负荷愈大,进入血循环中瘤细胞的比例愈大。因此,尽管肝移植后,已将病变的肝脏摘除,肝癌复发的原因可考虑为,脱落进入或移植手术过程中挤压进入血流中的癌细胞在手术创伤诱发的炎症因子和生长因子的刺激下迅速生长,成为复发病灶的来源<sup>[8]</sup>。大量应用免疫抑制剂削弱了机体自我识别能力也是其中的原因之一。此时,肝脏血流动力学的改变有助于残留在血液中的瘤细胞滞留、着床。在严重感染的情况下,内皮细胞损伤脱落,胶原组织暴露,血小板黏附、聚集,释放出腺苷二磷酸(ADP)、腺苷三磷酸(ATP)、儿茶酚胺和 5-羟色胺等产物使血小板进一步聚集,形成大量血小板微血栓,沉着于微循环。血小板被激活后,通过花生四烯酸形成过氧化物前列腺素 G<sub>2</sub>(PGG<sub>2</sub>)、前列腺素 H<sub>2</sub>(PGH<sub>2</sub>)、血栓烷 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)等前列腺素产物,他们不仅可促进血小板聚集,还可使小血管收缩。内毒素在 IL-1、TNF、血小板活化(PAF)等介导下损伤内皮细胞,有助于在此形成微血栓。目前认为,血小板与肿瘤细胞间具有黏附作用,机制可能为:肿瘤细胞和血小板表面的糖分子之间具有相互作用;肿瘤细胞和血小板有广泛的植物血凝素(lectin)的表达;高转移的肿瘤细胞能表达各

种异常的内源性 lectin 或含涎酸的糖结合位点. 肿瘤细胞上的涎酸化糖蛋白结合点能识别血小板上的糖配体 lectin 分子. 所以, 在肝脏肿瘤被切除之后, 或肝癌患者接受肝移植后出现的转移有各种因素的影响, 但血流动力学的改变, 尤其是血液高凝状态和术后的损伤因素是不能忽视的促转移因素之一.

#### 4 参考文献

- 1 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展. 中国肿瘤 1999;8:18-20
- 2 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展. 中华外科杂志 1998;36:515-518
- 3 Mahla E, Lang T, Vicenzi MN, Werkgartner G, Maier R, Probst C, Metzler H. Thromboelastography for monitoring prolonged hypercoagulability after major abdominal surgery. *Anesth Analg* 2001;92:572-577
- 4 尹格平, 孙晓明, 方强三. 老年癌症患者手术前后血小板活化状态检测的临床意义. 中国肿瘤临床与康复 1998;5:26-28
- 5 Hu DD, Lin EC, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW. Biochemical Characterization of the binding of osteopontin to integrins  $\alpha v \beta 1$  and  $\alpha v \beta 5$ . *J Bio Chem* 1995;270:26232-26238
- 6 Liaw L, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF, Giachelli CM. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 1995;77:665-672
- 7 Umansky V, Rocha M, Schirmmacher V. Liver endothelial cells: participation in host response to lymphoma metastasis. *Cancer Met Res* 1996;15:273-279

- 8 Hwang S, Lopez CA, Heck DE, Garder CR, Laskin DL, Laskin JD, Denhardt DT. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cell. *J Biol Chem* 1994;269:711-715
- 9 Feng B, Rollo EE, Denhardt DT. Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity: evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:453-462
- 10 Todo S, Furukawa H. Japanese study group on organ transplantation. Living donor liver transplantation for adult patients with hepatocellular carcinoma: experience in Japan. *Ann Surg* 2004;240:451-459
- 11 Ravaioli M, Ercolani G, Cescon M, Vetrone G, Voci C, Grigioni WF, D'Errico A, Ballardini G, Cavallari A, Grazi GL. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Further considerations on selection criteria. *Liver Transpl* 2004;10:1195-1202
- 12 Shetty K, Timmins K, Brensing C, Furth EE, Rattan S, Sun W, Rosen M, Soulen M, Shaked A, Reddy KR, Olthoff KM. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. *Liver Transpl* 2004;10:911-987
- 13 杨甲梅, 吴孟超, 陈汉, 张晓华, 周伟平, 严以群, 李波, 姚晓平, 吴伯文. 中晚期肝癌外科综合治疗的基本模式. 中华外科杂志 1996;34:537-539
- 14 白莉, 黄洁, 黄志强. 肝癌术后复发的影响因素分析. 中华实验外科杂志 1998;15:345-346
- 15 Cerutti E, Stratta C, Romagnoli R, Schellino MM, Skurzak S, Rizzetto M, Tamponi G, Salizzoni M. Thromboelastogram monitoring in the perioperative period of hepatectomy for adult living liver donation. *Liver Transpl* 2004;10:289-294

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

• 研究快报 •

## 酵母双杂交技术筛选 HCV E1 蛋白结合的肝细胞蛋白基因

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 张树林, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选肝细胞中与HCV E1蛋白结合蛋白的编码基因.

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV E1基因, 连接入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞

AH109并在其内表达, 然后与转化了人肝cDNA文库质粒 pACT2的酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基和X- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析.

结果: 获得了19个与E1蛋白特异性结合的阳性克隆, 其中16个克隆为已知蛋白基因和3个克隆为未知功能蛋白基因.

结论: 成功克隆出与丙型肝炎病毒E1蛋白结合的肝细胞蛋白, 为进一步研究HCV E1在HCV致病中的作用提供了新线索.

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 张树林, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹. 酵母双杂交技术筛选 HCV E1 蛋白结合的肝细胞蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2893-2895

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2893.asp>

种异常的内源性 lectin 或含涎酸的糖结合位点. 肿瘤细胞上的涎酸化糖蛋白结合点能识别血小板上的糖配体 lectin 分子. 所以, 在肝脏肿瘤被切除之后, 或肝癌患者接受肝移植后出现的转移有各种因素的影响, 但血流动力学的改变, 尤其是血液高凝状态和术后的损伤因素是不能忽视的促转移因素之一.

#### 4 参考文献

- 1 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展. 中国肿瘤 1999;8:18-20
- 2 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展. 中华外科杂志 1998;36:515-518
- 3 Mahla E, Lang T, Vicenzi MN, Werkgartner G, Maier R, Probst C, Metzler H. Thromboelastography for monitoring prolonged hypercoagulability after major abdominal surgery. *Anesth Analg* 2001;92:572-577
- 4 尹格平, 孙晓明, 方强三. 老年癌症患者手术前后血小板活化状态检测的临床意义. 中国肿瘤临床与康复 1998;5:26-28
- 5 Hu DD, Lin EC, Kovach NL, Hoyer JR, Smith JW. Biochemical Characterization of the binding of osteopontin to integrins  $\alpha v \beta 1$  and  $\alpha v \beta 5$ . *J Bio Chem* 1995;270:26232-26238
- 6 Liaw L, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF, Giachelli CM. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 1995;77:665-672
- 7 Umansky V, Rocha M, Schirmmacher V. Liver endothelial cells: participation in host response to lymphoma metastasis. *Cancer Met Res* 1996;15:273-279

- 8 Hwang S, Lopez CA, Heck DE, Garder CR, Laskin DL, Laskin JD, Denhardt DT. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cell. *J Biol Chem* 1994;269:711-715
- 9 Feng B, Rollo EE, Denhardt DT. Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cells from macrophage NO-mediated cytotoxicity: evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:453-462
- 10 Todo S, Furukawa H. Japanese study group on organ transplantation. Living donor liver transplantation for adult patients with hepatocellular carcinoma: experience in Japan. *Ann Surg* 2004;240:451-459
- 11 Ravaioli M, Ercolani G, Cescon M, Vetrone G, Voci C, Grigioni WF, D'Errico A, Ballardini G, Cavallari A, Grazi GL. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Further considerations on selection criteria. *Liver Transpl* 2004;10:1195-1202
- 12 Shetty K, Timmins K, Brensing C, Furth EE, Rattan S, Sun W, Rosen M, Soulen M, Shaked A, Reddy KR, Olthoff KM. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. *Liver Transpl* 2004;10:911-987
- 13 杨甲梅, 吴孟超, 陈汉, 张晓华, 周伟平, 严以群, 李波, 姚晓平, 吴伯文. 中晚期肝癌外科综合治疗的基本模式. 中华外科杂志 1996;34:537-539
- 14 白莉, 黄洁, 黄志强. 肝癌术后复发的影响因素分析. 中华实验外科杂志 1998;15:345-346
- 15 Cerutti E, Stratta C, Romagnoli R, Schellino MM, Skurzak S, Rizzetto M, Tamponi G, Salizzoni M. Thromboelastogram monitoring in the perioperative period of hepatectomy for adult living liver donation. *Liver Transpl* 2004;10:289-294

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

• 研究快报 •

## 酵母双杂交技术筛选 HCV E1 蛋白结合的肝细胞蛋白基因

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 张树林, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选肝细胞中与HCV E1蛋白结合蛋白的编码基因.

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV E1基因, 连接入酵母表达载体pGBKT7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞

AH109并在其内表达, 然后与转化了人肝cDNA文库质粒pACT2的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基和X- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析.

结果: 获得了19个与E1蛋白特异性结合的阳性克隆, 其中16个克隆为已知蛋白基因和3个克隆为未知功能蛋白基因.

结论: 成功克隆出与丙型肝炎病毒E1蛋白结合的肝细胞蛋白, 为进一步研究HCV E1在HCV致病中的作用提供了新线索.

陈天艳, 蔺淑梅, 成军, 王琳, 张树林, 刘敏, 王建军, 黄燕萍, 杨媛, 白桂芹. 酵母双杂交技术筛选 HCV E1 蛋白结合的肝细胞蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2893-2895

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2893.asp>

## 0 引言

1989年发现的丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是输血后病毒性肝炎的重要病原体,可引起急、慢性病毒性肝炎,与肝硬化、肝细胞癌(HCC)的发生密切相关<sup>[1-2]</sup>. HCV是单股正链RNA病毒,全长约9.6 ku核苷酸(nt),含有一个大的开放读码框架(ORF),编码3 010个氨基酸残基(aa)的病毒前体蛋白,多蛋白前体可被宿主和病毒的蛋白酶切割产生至少10个独特的蛋白. HCV包膜糖蛋白E1是一种多功能蛋白质,与HCV感染的慢性化和抗病毒免疫关系密切<sup>[3]</sup>. 我们利用酵母双杂交技术筛选肝细胞中与其相互作用的蛋白基因,进一步阐明E1在HCV致病中的作用机制及丙型肝炎防治具有重要意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** pGBKT7-BD克隆载体, AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)、人cDNA肝细胞文库酵母、YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基, X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司,半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司.复杂高效感受态(FSB)本室自制.大肠杆菌(DH5 $\alpha$ )本室保存.引物合成及DNA测序由上海博亚公司承担.

### 1.2 方法

**1.2.1 诱饵质粒的构建及表达** 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV E1蛋白编码基因,连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒,酶切鉴定后,用醋酸锂法转入酵母细胞AH109,由本室构建<sup>[4]</sup>.

**1.2.2 肝细胞文库的扩增与转化** 按照文库扩增手册操作滴定肝细胞文库原液,欲达到 $3 \times 10^{12}$ /L,于LB-Amp琼脂平板进行扩增,刮取收集菌液,以Qiagen Maxi试剂盒提取质粒DNA,高效醋酸锂法转入酵母细胞Y187,于SD/-Leu琼脂培养基生长扩增,同时滴定转化文库,收集酵母菌落,以 $1 \times 10^6$ /份分装备用,由本室构建保存<sup>[5]</sup>.

**1.2.3 诱饵与肝细胞文库的酵母配合** 挑取在SD/-Trp选择培养基上生长转化子(计数大于 $1 \times 10^{12}$ /L)与肝细胞文库混合,30℃轻摇配合过夜,22 h后可见少许颗粒状物,显微镜下可见三叶状体.将配合产物铺板,SD/-

Trp/-Leu/-His 25块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25块.同时进行阳性对照实验及文库滴定.生长14 d后把长出的大于3 mm的酵母集落,在铺有X- $\alpha$ -半乳糖苷酶的QDO上检查 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性,认为在QDO培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落.

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

## 2 结果

**2.1 部分筛选克隆Bgl II酶切鉴定结果** pACT2内含有两个Bgl II酶切位点,分别位于多克隆位点两侧,使用该酶消化将释放出肝细胞文库片段(图1).

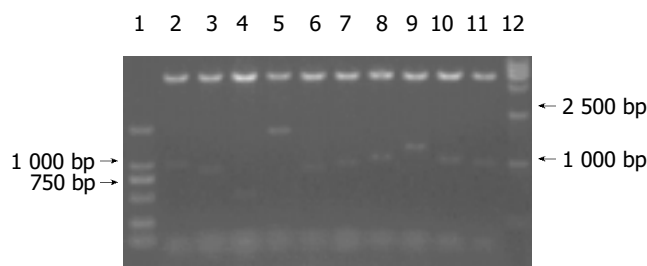


图1 部分不同的克隆Bgl II酶切鉴定. 1、12:泳道分别为DNA2000 Marker和DNA10000Marker, 2-11:泳道为不同克隆的酶切电泳图.

**2.2 cDNA测序与同源性分析初步结果** 配合后筛选出能在4缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基和铺有X- $\alpha$ -gal的4缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落19个克隆测序,与GenBank数据库进行初步比较.3个为未知功能蛋白基因,其余16个均与已知基因的部分序列高度同源(99-100%),详细结果(表1).

## 3 讨论

丙型肝炎病毒感染易慢性化,与肝纤维化及肝细胞癌的发生、发展过程密切相关<sup>[6]</sup>.肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用,可能是病毒感染导致肝细胞损伤和HCC发生、发展的重要原因.酵母双杂交系统是一种分析真

表1 阳性克隆与GenBank同源序列比较

已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
人类凝血因子IX	7	100
人类3-羟-3-甲基戊二酰-辅酶A合成酶2(线粒体)	2	97-100
人类富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白超家族	1	100
人类转位子相关蛋白delta	1	100
人类核孔蛋白214 Ku(NUP214)	1	100
人类ELYS转录因子样蛋白TMBS62	4	99-100
未知功能基因	3	98-100

核细胞中蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种遗传学方法。

我们采用酵母双杂交技术对HCV E1蛋白的肝细胞结合蛋白进行筛选, 共获得19个阳性克隆, 经过测序分析及与GenBank数据库进行比较, 其中16个克隆均为已知蛋白基因, 3个克隆为未知功能蛋白基因。其中筛选到值得注意的一些蛋白基因, 如血液病相关的蛋白包括凝血因子IX, 核孔蛋白214 ku, ELYS转录因子。凝血因子IX是血友病B相关因子, 血友病B是一种由于人凝血因子IX缺陷导致的遗传性严重出血性疾病, 临床治疗主要依靠输血或凝血酶原复合物, 因此容易感染获得性免疫缺陷综合征(AIDS)及肝炎病毒, 尤其是丙型肝炎病毒。我们的研究结果HCV E1蛋白可与凝血因子IX结合, 推测当血友病B患者合并HCV感染时, 是否会因此作用影响到血友病B患者的病情, 具体的相互作用尚不知晓。ELYS是一个转录因子, 转录起始区包括的GATA-1, -2, -3, 热休克因子(HSF) 2, 及NF- $\kappa$ B的转录因子的DNA元件。ELYS是来源于卵黄囊的胚胎大分子, 可以在胞质和胞核之间穿梭, 具有转录激活和抑制域, 动物实验证实主要在胚胎造血组织表达, 即卵黄囊, 肝, 胸腺等, 在成年期表达下降。初步的研究结果表明ELYS似乎是一个与幼年期和成年期的造血事件有关的转录因子<sup>[7-8]</sup>。核孔蛋白214 ku(NUP214), 核孔复合体(NPC)是一个大的分子结构, 跨越真核核膜, 形成了一个通路调解核与细胞质间大分子流动, 已经证实不同的核孔蛋白在调解NPC功能及蛋白、RNAs核质转运中有独特的作用, 与人类某些疾病密切相关。核孔蛋白214 ku, 又称CAN, 为癌基因, 是真核细胞核孔复合体的成分之一, 包含核孔复合体特异蛋白的FG重复序列, 定位于核孔复合体胞质侧表面, 调控细胞周期进展、核质的转运。该基因3'-端在6号染色体与DEK基因形成融合基因, 与急性髓性白血病、骨髓增生异常综合征有关<sup>[9-11]</sup>。上述结果提示丙型肝炎病毒感染与血液系统疾病之间的关系值得我们进一步关注。

另外我们还筛选到富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白超家族, 免疫球蛋白超家族在基因组中是蛋白领域中最大的家族之一, 也是多细胞真核生物最主要家族之一, 超家族成员与细胞识别、细胞表面受体、免疫系统的各种功能有关<sup>[12]</sup>。富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白超家族(ISLR), 分子质量为46 ku, 包含亮氨酸

重复序列, 基因位于人类染色体15q23-q24。对于蛋白与蛋白相互作用、细胞黏附非常重要, 其本身也可与其他蛋白或细胞相互作用<sup>[13]</sup>。另一个是转位子相关蛋白(translocon-associated protein, TRAP)  $\delta$ , 是转膜蛋白复合体亚单位(以前称之为信号序列受体), 位于进入内质网的新生分泌蛋白上。参与激素原的生物合成<sup>[14]</sup>。

总之, 以上结果为我们了解HCV E1蛋白的生物学功能提供了新的线索, 病毒蛋白与肝细胞这些蛋白相互结合的具体的作用方式及功能还需进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 2 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
- 3 郝飞, 余宙耀. 丙型肝炎基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1998:47
- 4 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆HCV 核心蛋白结合蛋白基因1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 5 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 6 成军. 丙型肝炎病毒致病的分子生物学机制. 解放军医学杂志 2003;28:23-27
- 7 Kimura N, Takizawa M, Okita K, Natori O, Igarashi K, Ueno M, Nakashima K, Nobuhisa I, Taga T. Identification of a novel transcription factor, ELYS, expressed predominantly in mouse foetal haematopoietic tissues. *Genes Cells* 2002;7:435-446
- 8 Okita K, Nobuhisa I, Takizawa M, Ueno M, Kimura N, Taga T. Genomic organization and characterization of the mouse ELYS gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:327-332
- 9 Cronshaw JM, Matunis MJ. The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:34-39
- 10 Kraemer D, Wozniak RW, Blobel G, Radu A. The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1519-1523
- 11 Gould VE, Orucevic A, Zentgraf H, Gattuso P, Martinez N, Alonso A. Nup88 (karyoporin) in human malignant neoplasms and dysplasias: correlations of immunostaining of tissue sections, cytologic smears, and immunoblot analysis. *Hum Pathol* 2002;33:536-544
- 12 Teichmann SA, Chothia C. Immunoglobulin superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 2000;296:1367-1383
- 13 Nagasawa A, Kubota R, Imamura Y, Nagamine K, Wang Y, Asakawa S, Kudoh J, Minoshima S, Mashima Y, Oguchi Y, Shimizu N. Cloning of the cDNA for a new member of the immunoglobulin superfamily (ISLR) containing leucine-rich repeat (LRR). *Genomics* 1997;44:273-279
- 14 Holthuis JC, van Riel MC, Martens GJ. Translocon-associated protein TRAP delta and a novel TRAP-like protein are coordinately expressed with pro-opiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. *Biochem J* 1995;312:205-213

# 补锌对大鼠血清锌和实验性肝纤维化的影响

王育强, 蔡德海

王育强, 武警医学院附院传染病学教研室 天津市 300162  
蔡德海, 武警医学院科研部 天津市 300162  
武警医学院资助课题, No. WY2002-24  
项目负责人: 王育强, 300162, 天津市, 天津武警医学院附属医院传染病学教研室. wangyuqiang12356@sohu.com  
电话: 022-60578766  
收稿日期: 2004-09-13 接受日期: 2004-10-11

## 摘要

**目的:** 观察不同剂量补锌对大鼠血清锌含量及实验性肝纤维化的影响。

**方法:** 将 Wistar 大鼠 46 只分为正常对照组、四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 模型组、高糖组、补锌高剂量组和低剂量组。后四组动物每只给 CCl<sub>4</sub> 油溶液 0.15 mL 腹腔内注射 2 次/wk, 共注射 8 wk; 后三组大鼠分别给予高糖、葡萄糖酸锌, 观察每一种情况对大鼠血清锌含量、肝功能和肝纤维化形成过程产生的影响。

**结果:** 实验的 4 wk 和 8 wk 时, 补锌组与模型组及高糖组血清 ALT 均增高, 各组间差异不明显, 但补锌组 AST 均明显降低, 与模型组及高糖组比较有较明显差异 ( $164.8 \pm 54.72^a$ ,  $143.5 \pm 46.6^b$  vs  $262.0 \pm 142.4$ ,  $260.4 \pm 125$ ,  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ )。补锌组大鼠血清锌含量在 8 wk 时均较模型组明显增高 ( $30.4 \pm 4.6$ ,  $30.4 \pm 4.6$  vs  $16.2 \pm 4.3$ ,  $P<0.01$ )。维持在正常水平, 并对大鼠肝纤维化有一定抑制作用, 但两个剂量组间未见明显差异 ( $36.3 \pm 5.4$  vs  $30.4 \pm 4.6$ )。高糖使大鼠的体重明显增加, 未见大鼠肝纤维化的改善。

**结论:** 补锌对肝损伤动物血清锌及肝纤维化的影响表现在后期, 采用低剂量较长期的补锌方法可能有效安全。

王育强, 蔡德海. 补锌对大鼠血清锌和实验性肝纤维化的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2896-2898  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2896.asp>

## 0 引言

微量元素锌制剂临床广泛应用于肝病的辅助治疗, 本组资料旨在观察持续补锌对四氯化碳所致肝纤维化大鼠血清锌含量的影响及对肝纤维化有无抑制作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ Wistar 大鼠 46 只, 体重  $180 \pm 20$  g, 随机分为 5 组, 正常对照组 6 只、模型组 10 只、高糖组 10 只、葡萄糖酸锌高剂量和低剂量组各 10 只; 三精葡萄糖酸锌, 每 10 mL 含锌 3.35 mg, 批号 03082951。

**1.2 方法** 正常对照组腹腔内注射生理盐水 0.15 mL/次, 2 次/wk, 其余组每只动物给 CCl<sub>4</sub> 油溶液 0.15 mL (CCl<sub>4</sub> 用等容积花生油稀释) 腹腔内注射 2 次/wk, 共注射 8 wk<sup>[1-4]</sup>, 同时补锌高剂量组用三精牌葡萄糖酸锌 20 mL 溶于清水 80 mL 中, 低剂量组 10 mL 溶于清水 90 mL 中, 由这两组动物分别自由饮用, 饮完为止, 均隔日饲喂 1 次。高糖组按每只动物给 1.0 g 白糖的量溶于清水中饲喂, 1 次/d; 所有各组动物均饲喂同样普通饲料; 在第 4 wk 于大鼠眼眶内取血测血清锌含量及肝功能 1 次, 第 8 wk 处死动物前, 所有动物均测体重, 腹主动脉取血, 血清置于去离子试管内, 测血清锌含量, 测定仪器使用原子吸收分光光度计, 用 TRITON-X 液稀释, 使用火焰原子吸收法测定, 取三次的均值。剖取大鼠肝脏做病理检查, 通过 HE 常规染色和 Masson 三色胶原染色对肝组织切片进行病理组织学检查<sup>[5]</sup>; 同时各组分别检查肝功能, 并观察其变化。

## 2 结果

**2.1 各组动物之间肝功能的比较 (表 1)** 实验中模型组和高糖组各死亡 2 只动物; 4 wk 和 8 wk 时除正常对照组外, 其余各组 ALT 均增高, 各组间差异不明显, 但补锌组 AST 和模型组与高糖组比较有较明显差异 ( $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ )。

表 1 实验 4 wk 与 8 wk 时各组动物肝功能指标及组间的比较 (mean  $\pm$  SD)

分组	n	ALT ( $\mu$ g/L)(4 wk)	AST ( $\mu$ g/L)(4 wk)	ALT ( $\mu$ g/L)(8 wk)	AST ( $\mu$ g/L)(8 wk)
正常对照组	6	$18.7 \pm 7.3$	$73.3 \pm 17.2$	$21.7 \pm 6.3$	$84.3 \pm 17.2$
模型对照组	8	$213.6 \pm 133.2$	$262.0 \pm 142.4$	$183.6 \pm 133.2$	$262.0 \pm 142.4$
高糖组	8	$198.4 \pm 95.4$	$250.4 \pm 125$	$191.4 \pm 119.4$	$260.4 \pm 125$
高锌组	10	$201.4 \pm 39.9$	$164.8 \pm 54.72^a$	$176.4 \pm 39.9$	$164.8 \pm 54.72^a$
低锌组	10	$196.6 \pm 31.5$	$145.5 \pm 50.6^b$	$173.6 \pm 31.5$	$143.5 \pm 46.6^b$

$^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$  vs 模型组和高糖组。

2.2 大鼠体重和各级的血清锌含量(表2) 动物在8 wk时各组体重差别增大,高糖组体重明显增高,各组血清锌值在4 wk时未显示明显差异,在8 wk时补锌组血清锌值与模型组和高糖组动物比较有明显差异( $P<0.01$ ),补锌组未见与正常对照组的差异。

表2 各组动物在4 wk和8 wk时血清锌值及8 wk时体重状态比较(mean  $\pm$  SD)

分组	4 wk时血清锌值( $\mu\text{mol/L}$ )	8 wk时血清锌值( $\mu\text{mol/L}$ )	8 wk时各组体重(g)
正常对照	28.8 $\pm$ 4.6	30.5 $\pm$ 5.4	254 $\pm$ 22.5
模型组	25.9 $\pm$ 3.9	16.2 $\pm$ 4.3	176 $\pm$ 36.5
高糖组	26.6 $\pm$ 4.5	14.6 $\pm$ 5.6	356 $\pm$ 56.6
高锌组	32.4 $\pm$ 5.5	36.3 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	286 $\pm$ 30.5
低锌组	30.1 $\pm$ 4.4	30.4 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	264 $\pm$ 36.6

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 模型组及高糖组。

2.3 各组动物8wk时与正常对照组的肝病理状态比较(表3) 各组动物镜下病理状态比较显示,正常对照大鼠肝小叶结构正常,无肝纤维化;模型组全部呈肝细胞片状坏死,汇管区周围纤维化,广泛纤维增生,部分假小叶形成;高糖组均呈片状肝坏死,纤维组织增生重,细胞索排列紊乱,小叶结构紊乱;高锌组和低锌组多数动物肝细胞索排列尚整齐,广泛纤维组织增生,但小叶结构尚完整保留。

表3 光镜下大鼠肝纤维化状态比较

分组	n	第8 wk时各组大鼠肝纤维化程度				
		0	I	II	III	IV
正常对照	6	6				
模型组	8			1	6	1
高糖组	8			1	6	1
高锌组	10		2	6	2	0
低锌组	10		2	5	3	0

### 3 讨论

在肝病的治疗中,给予患者含锌的微量元素制剂是普遍采用的辅助治疗手段。目前,在临床上应用的含锌制剂有复合蛋白锌、施尔康、葡萄糖酸锌、安达美注射液等<sup>[6-8]</sup>,其多为复合制剂,我们给予大鼠的葡萄糖酸锌为单一的含锌制剂,我们认为更适合观察锌对血清锌含量的影响及显示锌对肝纤维化有无抑制作用。

大量研究表明,锌具有重要的抗氧化作用。一方面长期慢性锌摄入可诱导金属硫蛋白(MT)的产生从而发挥其长期有效的抗氧化作用;另一方面锌又可参与组成一些重要的抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GPX),通过这些抗氧化酶有效地清除自由基,无论人体或动物实验都表明,长期缺锌可导致这

些酶活性的下降,机体清除自由基能力减弱;补锌还能够有效增强DNA聚合酶活性,增强了DNA的结构稳定性和完整性<sup>[9-11]</sup>;锌还可以提高肝组织中被抑制的全部胶原酶的活性<sup>[12]</sup>;以往研究还显示锌不足导致体内锌平衡破坏,促进了胸腺、脾脏组织中淋巴细胞的凋亡,造成体内淋巴细胞数目减少,使机体免疫功能下降<sup>[13]</sup>。上述机制均对肝脏损伤后的纤维化形成过程产生影响。

我们的实验显示,与模型组比较,实验大鼠持续补给葡萄糖酸锌4 wk时低锌剂量和高锌剂量组对大鼠肝功能均有一定保护作用,AST较模型组低,这一作用可持续至第8 wk,但对ALT始终无明显影响,这可能与四氯化碳对肝脏损害作用过强有关。在4 wk时,各组动物血清锌含量未显示明显差异,补锌组动物血清锌并未增高,这一结果需要进一步研究,但提示动物早期只要正常饲料喂养,对锌的摄取和调节尚能稳定;8 wk时,模型组动物血清锌含量明显降低,而补锌可纠正这一情况。低锌动物毛发晦暗,无光泽,生长慢,补锌组动物无此情况<sup>[13-18]</sup>;提示在肝损害后期,锌的摄取和调节出现问题,在临床上对存在长期肝损害的患者是否更需补锌,值得探讨。

我们在实验中还发现,补锌的两个剂量组肝纤维化程度均较模型组减轻,表明在慢性肝损伤过程中,适当补锌对肝细胞膜有稳定作用,可在一定程度上减轻肝纤维化。本实验高剂量组和低剂量组在对血清锌含量和肝纤维化影响方面未显示明显的剂量差异,是否提示锌作为某些金属酶的活性中心,如果缺乏会导致胶原酶活性降低<sup>[14-19]</sup>,但达一定量后,对机体的影响作用并未相应增强,因为锌浓度过大可造成肝肾损害<sup>[18]</sup>从补锌的安全和有效考虑,对慢性肝损伤采用较低剂量和较长时期补锌这一辅助治疗手段可能更好。

在肝病的治疗中,医师和患者都在寻求合理营养疗法,以求更好疗效,由于肝病患者脂肪代谢障碍,作为供能物质,葡萄糖摄入明显增加<sup>[6, 20-21]</sup>,但营养摄入的差异会不会对肝纤维化的程度产生影响。我们的分析显示,实验大鼠持续摄入高糖后,实验终末和模型组比较并未显示大鼠肝纤维化程度的明显差别,高糖饮食对肝脏病理改变无明显影响,大鼠在持续摄入高糖后体重明显增加,可能对肝功能修复不利。因此肝病的饮食治疗应是营养平衡,易于吸收,不加重肝脏负担,同时,有利于肝细胞的恢复。与应用高糖比较,补锌不仅是营养补充,且有一定减轻肝细胞损害作用。

总之,我们的实验显示在慢性肝损伤过程中适当补锌是较好的辅助治疗措施。由于慢性肝损伤治疗过程中难以持续测定血清锌含量,因此采用低剂量较长期的补锌方法可能既有效,也安全。

### 4 参考文献

- 1 刘克辛. 抗肝疾患药物开发的工具. 肝疾患基础及其实验动物模型. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 48-49
- 2 李锋, 李宣海, 程五凤, 谢良民. 补充VE、Se对大鼠肝纤维化和



- 抗氧化功能影响的研究. 营养学报 2003;25:61-64
- 3 吕鹏. 四氯化碳腹腔注射制备肝纤维化模型的实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:339-340
- 4 李校天, 高红旗, 蒋树林, 姚希贤. 四氯化碳和免疫血清法大鼠肝纤维化模型进程的时效关系对比研究. 中国医师杂志 2003;10:1315-1317
- 5 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:228-271
- 6 池肇春, 刘勇立, 马素真. 简明肝病诊疗手册. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1996:30-67
- 7 张叶青, 刘平, 都广礼, 王宪波, 李凤华. 二甲基亚硝胺肝硬化大鼠血清元素含量变化及其意义. 肝脏 2003;8:34-36
- 8 于占洋, 侯哲. 微量元素与疾病诊断及治疗. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:170-171
- 9 张月红, 程义勇, 洪燕, 王冬兰, 李树田. 锌缺乏对大鼠骨骼矿化的影响. 中华预防医学杂志 2003;37:121-124
- 10 高围澈, 黄连珍, 李涛, 杨雪锋. 缺锌对衰老小鼠抗氧化系统和肝脏DNA损伤修复功能的影响. 中华老年医学杂志 2003;22:543-546
- 11 张越, 唐小云, 杨丽群, 贾秀坤, 梁再斌. 锌对天冬氨酸转氨酶和线粒体酶功能的影响. 工业卫生与职业病 2004;30:95-96
- 12 王慧芬, 王业东. 肝脏疾病. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 2001:282-283
- 13 单延春, 盛晓阳, 洪昭毅. 锌缺乏对生长期大鼠免疫细胞凋亡的影响. 营养学报 2004;26:94-97
- 14 Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T. Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are GPI-anchored to cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 2004;2(待发表)
- 15 Zmarzly A, Simon K, Krause K, Rotter K, Gasiorowski J. Zinc status in ex-intravenous drug users infected by HIV, without clinical presentation of AIDS. *Wiad Lek* 2004;57:249-254
- 16 Rodovicius H, Viezeleiene D, Sadauskiene I, Valentukonyte S, Ivanov L. The effects of zinc ions on activities of tRNA<sup>Leu</sup> and leucyl-tRNA synthetase of mice liver. *Medicina (Kaunas)* 2004;40:982-986
- 17 Hulisz D. Efficacy of zinc against common cold viruses: an overview. *J Am Pharm Assoc (Wash DC)* 2004;44:594-603
- 18 Hammond GM, Loewen ME, Blakley BR. Diagnosis and treatment of zinc poisoning in a dog. *Vet Hum Toxicol* 2004;46:272-275
- 19 Lim NC, Freake HC, Bruckner C. Illuminating zinc in biological systems. *Chemistry* 2004;14[Epub ahead of print]
- 20 Coutinho EM. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(5 Suppl 1):85-92
- 21 Ming ZJ, Liu SZ, Cao L. Effect of total glucosides of centella asiatica on antagonizing liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2004;8:731-734

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

• 研究快报 •

## 全人源肝癌噬菌体单链抗体库的鉴定及筛选

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 药立波

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032

药立波, 中国人民解放军第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西省西安市 710032

国家自然科学基金资助项目, No. 30371399

项目负责人: 窦科峰, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科. gdwk@fmmu.edu.cn

电话: 029-83375259

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-11

结论: 利用噬菌体抗体库技术结合减数筛选得到了肝癌噬菌体单链抗体及其基因, 且筛选后的抗体片段与人肝癌细胞有特异性的结合活性.

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 药立波. 全人源肝癌噬菌体单链抗体库的鉴定及筛选. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2898-2901

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2898.asp>

### 摘要

目的: 对全人源肝癌噬菌体单链抗体库进行鉴定, 筛选肝癌抗体, 同时对抗体的活性进行鉴定.

方法: PCR鉴定阳性重组菌TG1中人肝癌ScFv的插入率. 先以人成纤维细胞黏附后再以肝癌细胞SMMC-7721为抗原对所建抗体库进行3轮“黏附-洗脱-扩增”的亲和筛选. 将筛选后的ScFv进行PCR鉴定及双酶切鉴定; 通过ELISA法鉴定其与人肝癌细胞的结合活性.

结果: ScFv基因插入率为70%. 在亲和筛选过程中, 肝癌噬菌体单链抗体得到富集, 收获率逐轮得到提高, 第3轮为第1轮的214倍. 筛选后的ScFv进行PCR鉴定及双酶切鉴定后, 均可检测到目的基因. 得到3株特异性肝癌单链抗体.

### 0 引言

有关抗肿瘤单链抗体(ScFv)的报道较多, 但大多是通过基因工程技术把鼠源杂交瘤抗体改造成小分子单链抗体, 仍属鼠源抗体<sup>[1-3]</sup>. 我们已利用噬菌体抗体库技术, 从200例原发性肝癌患者的B淋巴细胞中克隆出抗体重链和轻链可变区基因, 以具有氨苄青霉素抗性的pDAN5为载体, 参照Sblattero *et al*<sup>[4]</sup>的方法, 构建了全人源肝癌单链抗体噬菌体呈现库. 本文中我们利用该抗体库进行肝癌噬菌体单链抗体基因克隆并进行抗体的活性分析.

### 1 材料和方法

1.1 材料 表达载体噬菌粒pDAN5、大肠杆菌TG1、肝

- 抗氧化功能影响的研究. 营养学报 2003;25:61-64
- 3 吕鹏. 四氯化碳腹腔注射制备肝纤维化模型的实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:339-340
- 4 李校天, 高红旗, 蒋树林, 姚希贤. 四氯化碳和免疫血清法大鼠肝纤维化模型进程的时效关系对比研究. 中国医师杂志 2003;10:1315-1317
- 5 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:228-271
- 6 池肇春, 刘勇立, 马素真. 简明肝病诊疗手册. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1996:30-67
- 7 张叶青, 刘平, 都广礼, 王宪波, 李凤华. 二甲基亚硝胺肝硬化大鼠血清元素含量变化及其意义. 肝脏 2003;8:34-36
- 8 于占洋, 侯哲. 微量元素与疾病诊断及治疗. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:170-171
- 9 张月红, 程义勇, 洪燕, 王冬兰, 李树田. 锌缺乏对大鼠骨骼矿化的影响. 中华预防医学杂志 2003;37:121-124
- 10 高围澈, 黄连珍, 李涛, 杨雪锋. 缺锌对衰老小鼠抗氧化系统和肝脏DNA损伤修复功能的影响. 中华老年医学杂志 2003;22:543-546
- 11 张越, 唐小云, 杨丽群, 贾秀坤, 梁再斌. 锌对天冬氨酸转氨酶和线粒体酶功能的影响. 工业卫生与职业病 2004;30:95-96
- 12 王慧芬, 王业东. 肝脏疾病. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 2001:282-283
- 13 单延春, 盛晓阳, 洪昭毅. 锌缺乏对生长期大鼠免疫细胞凋亡的影响. 营养学报 2004;26:94-97
- 14 Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T. Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are GPI-anchored to cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 2004;2(待发表)
- 15 Zmarzly A, Simon K, Krause K, Rotter K, Gasiorowski J. Zinc status in ex-intravenous drug users infected by HIV, without clinical presentation of AIDS. *Wiad Lek* 2004;57:249-254
- 16 Rodovicius H, Viezeleiene D, Sadauskiene I, Valentukonyte S, Ivanov L. The effects of zinc ions on activities of tRNA<sup>Leu</sup> and leucyl-tRNA synthetase of mice liver. *Medicina (Kaunas)* 2004;40:982-986
- 17 Hulisz D. Efficacy of zinc against common cold viruses: an overview. *J Am Pharm Assoc (Wash DC)* 2004;44:594-603
- 18 Hammond GM, Loewen ME, Blakley BR. Diagnosis and treatment of zinc poisoning in a dog. *Vet Hum Toxicol* 2004;46:272-275
- 19 Lim NC, Freake HC, Bruckner C. Illuminating zinc in biological systems. *Chemistry* 2004;14[Epub ahead of print]
- 20 Coutinho EM. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(5 Suppl 1):85-92
- 21 Ming ZJ, Liu SZ, Cao L. Effect of total glucosides of centella asiatica on antagonizing liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2004;8:731-734

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

• 研究快报 •

## 全人源肝癌噬菌体单链抗体库的鉴定及筛选

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 药立波

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032

药立波, 中国人民解放军第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西省西安市 710032

国家自然科学基金资助项目, No. 30371399

项目负责人: 窦科峰, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科. gdwk@fmmu.edu.cn

电话: 029-83375259

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-11

**结论:** 利用噬菌体抗体库技术结合减数筛选得到了肝癌噬菌体单链抗体及其基因, 且筛选后的抗体片段与人肝癌细胞有特异性的结合活性。

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 药立波. 全人源肝癌噬菌体单链抗体库的鉴定及筛选. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2898-2901

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2898.asp>

### 摘要

**目的:** 对全人源肝癌噬菌体单链抗体库进行鉴定, 筛选肝癌抗体, 同时对抗体的活性进行鉴定。

**方法:** PCR鉴定阳性重组菌TG1中人肝癌ScFv的插入率. 先以人成纤维细胞黏附后再以肝癌细胞SMMC-7721为抗原对所建抗体库进行3轮“黏附-洗脱-扩增”的亲和筛选. 将筛选后的ScFv进行PCR鉴定及双酶切鉴定; 通过ELISA法鉴定其与人肝癌细胞的结合活性。

**结果:** ScFv基因插入率为70%. 在亲和筛选过程中, 肝癌噬菌体单链抗体得到富集, 收获率逐轮得到提高, 第3轮为第1轮的214倍. 筛选后的ScFv进行PCR鉴定及双酶切鉴定后, 均可检测到目的基因. 得到3株特异性肝癌单链抗体。

### 0 引言

有关抗肿瘤单链抗体(ScFv)的报道较多, 但大多是通过基因工程技术把鼠源杂交瘤抗体改造成小分子单链抗体, 仍属鼠源抗体<sup>[1-3]</sup>. 我们已利用噬菌体抗体库技术, 从200例原发性肝癌患者的B淋巴细胞中克隆出抗体重链和轻链可变区基因, 以具有氨苄青霉素抗性的pDAN5为载体, 参照Sblattero *et al*<sup>[4]</sup>的方法, 构建了全人源肝癌单链抗体噬菌体呈现库. 本文中我们利用该抗体库进行肝癌噬菌体单链抗体基因克隆并进行抗体的活性分析。

### 1 材料和方法

1.1 材料 表达载体噬菌粒pDAN5、大肠杆菌TG1、肝

癌细胞系 SMMC-7721 由本室保存; 人成纤维细胞系由西京医院烧伤科汤朝武技师惠赠; 辅助病毒 M13K07 由董红霖博士惠赠; rTaq 酶及限制性核酸内切酶 *Nhe* I、*Bss*H II 均为大连宝生物产品; 质粒提取试剂盒为杭州维特洁公司产品; PCR 引物序列为 5' -ACC TATT GCCT ACGG CAGC-3', 5' -ACTTTCAACAGTAGCGGCC GC-3', 由上海基康公司合成。

## 1.2 方法

1.2.1 噬菌体抗体库滴度测定 将 1-10  $\mu$ L 经适当稀释的噬菌体抗体库菌铺于氨苄青霉素培养板, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 计数集落, 计算集落形成单位(clone forming unit, cfu)。

1.2.2 PCR 法鉴定抗体基因插入率 挑取单个细菌集落, 加入 3 mL 含氨苄 100 mg/L 的 LB 培养过夜, 按质粒提取试剂盒说明书提取质粒, 取 2  $\mu$ L 为模板采用 25  $\mu$ L 体系, 进行 ScFv PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳检测相应的 DNA 扩增带。

1.2.3 人源肝癌噬菌体 ScFv 的筛选 取冻存抗体库菌种 1 mL, 进行噬菌体表面呈现, 调整滴度为  $10^{15}$  cfu/L。先以人成纤维细胞黏附后再以人肝癌细胞系 SMMC-7721 对初级库进行筛选, 然后以人肝癌细胞 SMMC-7721 进行黏附筛选。共进行 3 轮筛选。

1.2.4 阳性噬菌体单克隆 PCR 鉴定 挑取第三轮筛选出的单克隆, 按前述方法提取单克隆质粒进行 ScFv 基因克隆。随机挑取 20 个单克隆, 加入 3 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液过夜培养, 常规提取质粒。以质粒为模板进行 PCR 反应, 然后以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定是否扩增出目的基因。

1.2.5 阳性噬菌体单克隆酶切鉴定 随机挑取 10 个单克隆质粒以 *Nhe* I 及 *Bss* H II 双酶切, 以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定是否含有目的基因。

1.2.6 阳性单克隆 ScFv 活性分析 挑取阳性单克隆, 以不含目的基因的载体为对照。按前述方法进行噬菌体表面呈现, 收集上清即为噬菌体抗体。将单克隆 ScFv 及对照上清加入接种有人成纤维细胞及肝癌细胞的 96 孔板过夜, 再加入 HRP-羊抗 M13 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h, 加入 TMB 显色 10 min, 加入 2 mol/L 硫酸终止反应。酶标仪读板, 以 P/N>2.1 为阳性。

## 2 结果

2.1 抗体库滴度 经 10 倍系列稀释, 测定抗体库滴度为  $7.6 \times 10^{12}$  cfu/L。

2.2 PCR 法检测 20 个菌落, 14 个克隆扩增出 ScFv, 目的基因插入率为 70%(图 1)。

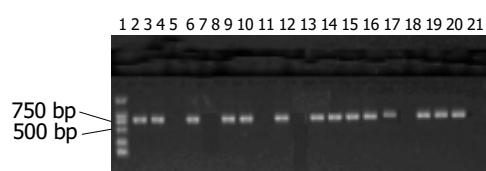


图1 PCR 扩增 ScFv 片段. 1: Marker.

2.3 肝癌噬菌体 ScFv 的筛选 以人成纤维细胞黏附后再以人肝癌细胞系 SMMC-7721 对噬菌体抗体库进行 3 轮富集筛选, 将每一轮洗脱下来的噬菌体再感染 TG1 细菌, 并取少量细菌铺盘, 测定噬菌体滴度, 计算每一轮筛选后噬菌体的收获率。噬菌体收获率由第 1 轮的  $2.2 \times 10^{-5}\%$  增到第 3 轮的  $4.7 \times 10^{-3}\%$ , 共增加了 214 倍(表 1)。

表 1 SMMC-7721 对噬菌体抗体库的亲亲和富集

富集轮次	噬菌体滴度(cfu/L)		噬菌体收获率(%)
	富集前	富集后	
1	$1.0 \times 10^{15}$	$2.2 \times 10^8$	$2.2 \times 10^{-5}$
2	$1.5 \times 10^{15}$	$3.5 \times 10^9$	$2.3 \times 10^{-4}$
3	$1.1 \times 10^{15}$	$5.2 \times 10^{10}$	$4.7 \times 10^{-3}$

2.4 噬菌体单克隆 ScFv PCR 鉴定 以来自 20 个单克隆菌落的质粒为模板进行 PCR 反应, 全部扩增出约 750 bp 片段(图 2)。

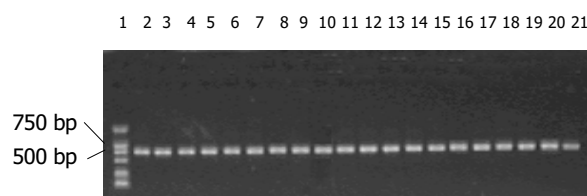


图2 PCR 扩增 ScFv 片段. 1: Marker

2.5 阳性单克隆 ScFv 酶切鉴定 随机挑取 10 个单克隆质粒以 *Nhe* I 及 *Bss* H II 双酶切, 均放出约 750 bp 片段(图 3)。

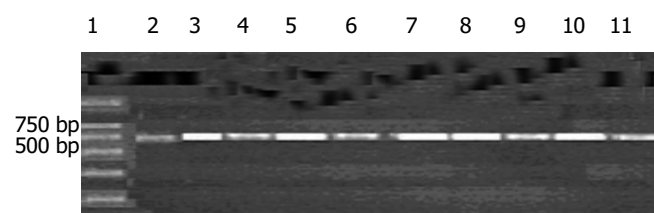


图3 10 个单克隆质粒 *Nhe* I 及 *Bss* H II 双酶切鉴定. 1: Marker.

2.6 阳性单克隆 ScFv 活性分析 随机选取 20 个克隆, 进行噬菌体表面呈现后的抗体上清对人成纤维细胞及 SMMC-7721 的结合活性进行 ELISA 检测。结果显示 18 个克隆与 SMMC-7721 呈阳性反应, 阳性率为 90%, 15 个克隆与成纤维细胞有交叉反应, 3 个克隆与成纤维细胞呈阴性反应(表 2)。

## 3 讨论

自从首次报道用小鼠 B 细胞杂交瘤技术制备 mAb 以来已有 29 a。FDA 批准同意用 mAb 治疗也已 18 a(OKT®3)。目前进行临床试验的 mAb 约有 140 种, 大部分仍是由

表2 3株 ScFv 与肝癌细胞结合的 A 值

克隆编号	SMMC-7721	成纤维细胞	P 值
11	0.366 ± 0.034	0.112 ± 0.011	< 0.01
18	0.295 ± 0.002	0.081 ± 0.006	< 0.01
23	0.306 ± 0.024	0.095 ± 0.005	< 0.01

阴性对照 A 值 = 0.06 ± 0.001.

鼠杂交瘤技术生产. 而噬菌体抗体为抗体的片段, 分子小、穿透力强、廓清快、异源性低, 而且能在原核系统中表达, 易于生产. 利用抗体库技术可简便地制备出针对不同肿瘤患者多种肿瘤的 mAb 片段, 这些 mAb 片段与细胞毒素、破坏细胞的酶和细胞因子等连接后, 可形成对肿瘤细胞有特异性杀伤作用的复合物, 称为免疫毒素或生物导弹. 对感染性疾病、器官移植排斥反应的防治及肿瘤的早期诊断、治疗, 以及手术及化疗后晚期肿瘤的辅助治疗均具有广阔的应用前景<sup>[5-7]</sup>.

噬菌体展示库技术在一定程度上较好地模拟了体内抗体生成亲和力成熟过程, 可快速高效地从大量克隆中筛选展示特异性抗体的噬菌体, 为制备高亲和性的抗体提供了有力工具. 其特点是“他既可识别相应的抗原并与其结合, 又能够感染宿主菌进行再扩增”. 该技术可绕过免疫制备全人源性抗体, 可有效避免鼠源性抗体在人体应用时诱发产生人抗鼠抗体(HAMA)等不良反应. 他将表型(与抗原特异结合)与基因型(含 V 区基因)联系在一起, 把识别抗原的能力和进行再扩增的能力结合起来, 是一种高效的筛选体系, 在人源性特异抗体的筛选和制备上独具优势<sup>[8-11]</sup>.

肿瘤抗原种类繁多, 免疫原性低, 难于纯化, 其抗体制备非常困难. 用常规方法制备的单抗往往种类单一, 亲和力较低, 且抗原性强, 限制了其在临床上的应用<sup>[9, 12-16]</sup>. 抗体基因的多样性提供了构建可能靶分子的新方法, 单链抗体的多样性使人们可从人自身噬菌体文库筛选的任何靶抗原上得到. 利用噬菌体抗体库技术建立的抗肿瘤基因文库, 可以绕过杂交瘤, 甚至绕过免疫, 很方便地得到针对多种肿瘤的不同抗原、不同决定簇的功能抗体片段.

目前文献报道的特异性噬菌体抗体, 多数是由固相纯化抗原筛选得到的. 经典筛选技术的前提条件是, 目的抗体所针对抗原的性质明确且可获得到纯品. 对于无法提纯或抗原性质不确定的抗原(如癌细胞表面受体), 采用传统的筛选方法可使抗原失活, 如某些膜蛋白, 因此, 需建立新的筛选系统或对传统的筛选技术进行改进. 直接用细胞系从单链噬菌体抗体库中筛选细胞表面受体结合的抗体已有报道. Kupsch *et al*<sup>[14]</sup>用肿瘤细胞作为靶抗原, 已从噬菌体抗体库中筛选出与黑色素瘤细胞特异性结合的抗体.

我们以 pDAN5 为载体, 从 200 例原发性肝癌患者的 B 淋巴细胞中克隆出抗体重链和轻链可变区基因,

构建了全人源肝癌单链抗体库, 滴度达  $10^{12}$ /L. PCR 法鉴定目的基因插入率为 70%. 以 SMMC-7721 细胞对该抗体库进行 3 轮筛选. 在“黏附-洗脱-扩增”的筛选过程中, 回收的噬菌体比率却逐渐增加, 3 轮共增加了 214 倍. 在洗脱下来的噬菌体中, 含 ScFv 基因的克隆比率也得到明显提高(由筛选前的 70% 增到筛选后的 100%), 证实了特异性噬菌体抗体在筛选过程中得到富集. 因此用噬菌体抗体库技术制备肿瘤单抗不失为一种有效的方法. 首先利用正常人成纤维细胞对非特异性噬菌体抗体进行黏附, 使得筛选出的抗体的特异性更强. 对阳性单克隆 ScFv 活性分析表明, 90% 的克隆与 SMMC-7721 呈阳性反应, 其中 3 株与人成纤维细胞呈阴性反应, 对肝癌细胞呈特异性结合. 我们将对这些克隆进一步分析, 以获得理想的全人源抗肝癌噬菌体抗体及其基因.

#### 4 参考文献

- 1 Szardenings M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res* 2003;23:307-349
- 2 Rojas G, Almagro JC, Acevedo B, Gavilondo JV. Phage antibody fragments library combining a single human light chain variable region with immune mouse heavy chain variable regions. *J Biotechnol* 2002;94:287-298
- 3 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南. 人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原 HAb18G 嵌合 Fab 抗体的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:271-275
- 4 Sblattero D, Bradbury A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2000;18:75-80
- 5 Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Drug Discov Today* 2003;8:845-851
- 6 Stockwin LH, Holmes S. The role of therapeutic antibodies in drug discovery. *Biochem Soc Trans* 2003;31:433-436
- 7 Winthrop MD, Denardo GL, Denardo SJ. Antibody phage display applications for nuclear medicine imaging and therapy. *Q J Nucl Med* 2000;44:284-295
- 8 Gao C, Mao S, Ronca F, Zhuang S, Quaranta V, Wirsching P, Janda KD. De novo identification of tumor-specific internalizing human antibody-receptor pairs by phage-display methods. *J Immunol Methods* 2003;274:185-197
- 9 Huston JS, George AJ. Engineered antibodies take center stage. *Hum Antibodies* 2001;10:127-142
- 10 Zampieri S, Mahler M, Bluthner M, Qiu Z, Malmegrim K, Ghirardello A, Doria A, van Venrooij WJ, Raats JM. Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: reactivity, specificity and epitope recognition. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:588-598
- 11 Azzazy HM, Highsmith WE Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 2002;35:425-445
- 12 Popkov M, Rader C, Barbas CF III. Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using phage display technology. *J Immunol Meth* 2004;291:137-151
- 13 Heitner T, Moor A, Garrison JL, Marks C, Hasan T, Marks JD. Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library. *J Immunol Methods* 2001;248:17-30
- 14 Kupsch JM, Tidman NH, Kang NV, Truman H, Hamilton S, Patel N, Newton Bishop JA, Leigh IM, Crowe JS. Isolation of human tumor-specific antibodies by selection of an antibody phage library on melanoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:925-931

- 15 Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* 2004;9:525-529
- 16 Korn T, Nettelbeck DM, Volkel T, Muller R, Kontermann RE.

Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *J Gene Med* 2004;6:642-651

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

• 研究快报 •

## 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白5反式调节基因的筛选

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室  
北京市 100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
北京市自然科学基金项目, No. 5042024  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

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

**方法:** 以分子生物学技术构建NS5ATP5的真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5ATP5, 以表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5ATP5转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA。应用基因表达谱芯片技术对差异表达mRNA进行检测和分析。

**结果:** HepG2细胞经转染NS5ATP5后, 有17条基因表达增强, 12条基因表达降低。

**结论:** 成功筛选了NS5ATP5的反式调节基因, 为进一步阐明NS5ATP5的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白5反式调节基因的筛选. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2901-2904  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2901.asp>

### 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的感染, 不仅能够引起急慢性病毒性肝炎, 而且能够引起肝纤维化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 严重危害人们的生命健康。我国目前一般人群的感染率达3.2%, 因而具

有很大的危害性<sup>[1-13]</sup>。HCV至少被分为10种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白NS5A基因(位于6258-7601 nt之间)编码的Mr 58 000的NS5A蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程中具有十分重要的作用<sup>[14-17]</sup>。研究表明, NS5A是一种作用很强转录激活因子<sup>[18-22]</sup>, 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染HCV的细胞发生恶性转化过程有关。我实验室应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对NS5A的反式调节基因进行了初步的研究, 筛选出了一系列已知及未知功能基因, 并将其中一个未知功能基因克隆, 命名为丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白5(human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, HCV NS5ATP5)<sup>[23]</sup>。此外, 我实验室已经对NS5ATP5进行酵母双杂交研究, 观察了他与白细胞之间有相互作用的蛋白<sup>[24]</sup>。为了从不同的角度对NS5ATP5的反式调节基因进行验证及研究, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对NS5ATP5反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究NS5ATP5的反式调节基因打下了基础。

### 1 材料和方法

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

#### 1.2 方法

**1.2.1 真核表达载体及细胞转染** NS5ATP5蛋白真核表达

- 15 Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* 2004;9:525-529
- 16 Korn T, Nettelbeck DM, Volkel T, Muller R, Kontermann RE.

Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *J Gene Med* 2004;6:642-651

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

• 研究快报 •

## 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白5反式调节基因的筛选

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室  
北京市 100039  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
北京市自然科学基金项目, No. 5042024  
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283  
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

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

**方法:** 以分子生物学技术构建NS5ATP5的真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5ATP5, 以表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5ATP5转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA。应用基因表达谱芯片技术对差异表达mRNA进行检测和分析。

**结果:** HepG2细胞经转染NS5ATP5后, 有17条基因表达增强, 12条基因表达降低。

**结论:** 成功筛选了NS5ATP5的反式调节基因, 为进一步阐明NS5ATP5的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白5反式调节基因的筛选. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2901-2904  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2901.asp>

### 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的感染, 不仅能够引起急慢性病毒性肝炎, 而且能够引起肝纤维化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 严重危害人们的生命健康。我国目前一般人群的感染率达3.2%, 因而具

有很大的危害性<sup>[1-13]</sup>。HCV至少被分为10种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白NS5A基因(位于6258-7601 nt之间)编码的Mr 58 000的NS5A蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程中具有十分重要的作用<sup>[14-17]</sup>。研究表明, NS5A是一种作用很强转录激活因子<sup>[18-22]</sup>, 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染HCV的细胞发生恶性转化过程有关。我实验室应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对NS5A的反式调节基因进行了初步的研究, 筛选出了一系列已知及未知功能基因, 并将其中一个未知功能基因克隆, 命名为丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白5(human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, HCV NS5ATP5)<sup>[23]</sup>。此外, 我实验室已经对NS5ATP5进行酵母双杂交研究, 观察了他与白细胞之间有相互作用的蛋白<sup>[24]</sup>。为了从不同的角度对NS5ATP5的反式调节基因进行验证及研究, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对NS5ATP5反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究NS5ATP5的反式调节基因打下了基础。

### 1 材料和方法

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

#### 1.2 方法

**1.2.1 真核表达载体及细胞转染** NS5ATP5蛋白真核表达

质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP5 为本室构建. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP5 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.2 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 NS5ATP5 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性、定量分析.

1.2.3 探针标记 逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5  $\mu$ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5  $\mu$ g). 乙醇沉淀后溶解在 20  $\mu$ L 5  $\times$  SSC+2 g/L SDS 杂交液中.

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

1.2.5 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95  $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60  $^{\circ}$ C 杂交 15–17 h. 依次以 2  $\times$  SSC+2 g/L SDS、1 g/L  $\times$  SSC + 2 g/L SDS、1 g/L  $\times$  SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

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

## 2 结果

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

2.2 NS5ATP5 蛋白上调基因类型 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上, 就判断为 HCV NS5ATP5 蛋白的上调基因. 在我们的研究中, 因上调基因种类较多, 故将 Cy5/Cy3 比值 3.000 以上的定为上调基因. 共发现有 17 种基因的表达水平上调, 其中包括 4 种未知功能基因(表 1).

2.3 HCV NS5ATP5 蛋白下调基因类型 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCV NS5ATP5 蛋白的下调基因. 基于上述同样原因, 本实验将 Cy5/Cy3 比值 0.300 以下的定为

下调基因. 在我们的研究中发现有 12 种基因的表达水平下调(表 2).

表 1 NS5ATP5 上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	3.009	人类 lumican (LUM)
2	3.010	人类 cullin 2 (CUL2)
3	3.016	未知功能基因
4	3.021	人类 ATPase
5	3.049	未知功能基因
6	3.189	未知功能基因
7	3.375	人类肌凝蛋白 X (MYO10)
8	3.397	人类免疫球蛋白超家族蛋白(Z39IG)
9	3.592	人类丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶抑制剂
10	3.686	人类墨角藻糖基转移酶 8 (FUT8)
11	3.746	人类 B 细胞相关蛋白(BRAC)
12	4.272	人类溶酶体相关膜蛋白 2 (LAMP2)
13	4.752	人类肿瘤坏死因子, 诱导蛋白 1
14	4.918	人类 TGF- $\beta$ 1IR $\alpha$
15	4.937	人类蛋白激酶
16	5.475	人类 N-myc 下游调节(NDRG1)
17	7.157	未知功能基因

表 2 NS5ATP5 下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.163	人类核仁蛋白
2	0.169	人 T 细胞受体重新排列 $\beta$ 链基因 V 区
3	0.176	人类色氨酸-tRNA 合成酶(WARS)
4	0.177	人胰岛素样生长因子 I IGF-I mRNA
5	0.215	人类促胸腺生成素(TMPO)
6	0.246	人类谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPX1)
7	0.248	人类 v-myb 鸟类髓母细胞过多症癌基因同族体样 2 (MYBL2)
8	0.252	人类真核翻译延长因子 2 (EEF2)
9	0.268	人类衔接子相关蛋白复合体 1
10	0.278	人类 $M_r$ 10 000 热休克蛋白 1(HSPE1)
11	0.286	人类 tetratricopeptide 重复位点 2 (TTC2)
12	0.294	人类迷你染色体维持缺乏

## 3 讨论

丙型肝炎病毒基因组的翻译是在有关酶的作用下合成一个长约 3 011 氨基酸的多蛋白前体, 然后在宿主信号肽酶和病毒编码的蛋白酶作用下裂解为各种蛋白, 即: 结构蛋白 C、E1、E2、p7, 和非结构蛋白 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B<sup>[25–27]</sup>, 其中非结构蛋白 NS5A 具有多种生物学功能, HCV NS5A 是病毒编码的一种功能广泛的蛋白质, 参与许多重要的调节过程. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝

氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58, p58 被认为是 p56 的超级磷酸化产物. NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- $\kappa$ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用<sup>[28]</sup>. Ghosh *et al*<sup>[29]</sup> 研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1, 激活人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能<sup>[30-32]</sup>. 目前认为 NS5A 蛋白是在细胞蛋白激酶作用下发生磷酸化修饰后发挥生物调节作用的. 不同磷酸化形式的 NS5A 蛋白具有不同反式激活作用是关于 NS5A 生物学功能研究的热点. 研究发现, NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 aa 之间. NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区(2 143-2 184, 2 220-2 273 aa)和一个脯氨酸富集区(2 282-2 327 aa). 酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与 NS5A 的反式激活活性相关, 两个酸性氨基酸区是 NS5A 的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区的一些氨基酸的突变可明显影响 NS5A 的转录激活作用, 但是这些突变更更多的是引起蛋白二级结构的改变.

我实验室应用 SSH 技术对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究, 筛选出了一系列已知及未知功能基因, 并把其中一个未知功能基因克隆化, 命名为 NS5ATP5. 为进一步研究 NS5ATP5 的功能, 从而对 NS5A 的生理学功能有进一步的了解, 我们应用表达谱芯片技术对 NS5ATP5 的反式调节基因进行研究.

因基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到 2 组不同的组织或细胞之间基因表达谱的差异, 故在 HCV 感染及其致癌机制的研究中具有重要的应用价值. 我们以 HepG2 细胞基因组 DNA 为模板, 应用聚合酶链反应技术(PCR)扩增的 NS5ATP5 基因片段, 常规分子生物学技术构建 NS5ATP5 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP5, 利用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞. 从转染和非转染细胞 HepG2 种提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 并进行基因芯片技术分析. 结果表明, 共有人类 lumican、人类 ATPase、人类免疫球蛋白超家族蛋白、人类丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶抑制剂等 17 种基因的表达水平上调, 其中包括 4 个未知功能基因. 有人类核仁蛋白、人 T 细胞受体重新排列  $\beta$  链基因 V 区、人类色氨酸-tRNA 合成酶、人胰岛素样生长因子等 12 种基因的表达水平下调. 总之, 我们的结果表明, NS5ATP5 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 基因芯片技术是研究反式调节基因的有效技术.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 2 刘妍, 成军. 丙肝病毒致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:10-13
- 3 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:A261
- 4 Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996;70:4438-4443
- 5 Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3893-3896
- 6 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362
- 7 Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redecker AG, Purcell RH, Myamura TJ, Dienstag L, Alter MJ, Stevens CE, Tagtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shister JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364
- 8 Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:685-689
- 9 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
- 10 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- 11 Deng ZL, Ma Y, Yuan L, Teng PK. The importance of hepatitis C as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Guangxi. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):75
- 12 Zhang LF, Peng WW, Yao JL, Tang TH. Immunohistochemical detection of HCV infection in patients with hepatocellular carcinoma and other liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:64-65
- 13 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- 14 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医杂志 2001;2:97-99
- 15 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 5'-非翻译区及其结合蛋白的研究进展. 国外医学微生物学分册 2001;24:7-9
- 16 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 17 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 刘友昭, 王琳, 李克, 杨继珍, 邵得志, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验和临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 18 成军. 慢性丙型肝炎病毒性肝脂肪肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 19 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活 SV40 病毒启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;24:81-83
- 20 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997; 71: 8856-8859
- 21 钟彦伟, 成军, 田小军, 陈新华, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 22 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 23 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 24 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 李强, 刘敏. 白细胞中与 NS5ATP5 蛋白结合的蛋白基因筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2004;12:51-53



- 25 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
- 26 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医杂志 2001;2:97-99
- 27 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 28 Gong GZ, Waris G, Tanveer R. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 29 Ghosh AK, Steele R, Meyer K. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 30 Kaneda Y, Yoshida MC, Kohno K, Uchida T, Okada Y. Chromosomal assignment of the gene for human elongation factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3158-3162
- 31 Gasparini P, Calvano S, Memeo E, Bisceglia L, Zelante L. Assignment of ferritin L gene (FTL) to human chromosome band 19q13.3 by in situ hybridization. *Ann Genet* 1997;40:227-228
- 32 Guo W, Adams V, Mason J, McCabe ER. Identification of a ferritin light chain pseudogene near the glycerol kinase locus in Xp21 by cDNA amplification for identification of genomic expressed sequences. *Biochem Mol Med* 1997;60:169-173

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

• 研究快报 •

## 胃黏膜细胞 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达与幽门螺杆菌感染的关系

范凯, 马坚妹, 胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 刘丽娜, 许国旺

范凯, 马坚妹, 大连医科大学解剖学教研室 辽宁大连市 116027  
胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 大连医科大学第二附属医院分子生物学实验室 辽宁省大连市 116027  
刘丽娜, 大连医科大学第一附属医院消化内科 辽宁省大连市 116001  
许国旺, 中国科学院大连化学物理研究所 辽宁省大连市 116011  
中国科学院知识创新工程领域前沿基金资助项目, No. DIPCK2001A4  
项目负责人: 吕申, 116027, 辽宁省大连市, 医科大学第二附属医院分子生物学实验室. fankai1973@yahoo.com.cn  
电话: 0411-84687554  
收稿日期: 2004-10-21 接受日期: 2004-10-27

### 摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与胃癌、癌旁及胃炎黏膜中 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达的关系。

方法: 高中分化腺癌 22 例, 低分化腺癌 37 例, 黏液癌 17 例, 浅表性胃炎 38 例, 正常对照 10 例, 用快速尿素酶方法检测 *H pylori* 感染, 用免疫组化 SP 法检测 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的表达。

结果: (1)hMSH2 在胃癌中的表达阳性率显著高于癌旁组织、胃炎黏膜和正常对照(67.1% vs 35.5%, 42.1%, 30.0%;  $P < 0.01$ ), 其中, 在低分化腺癌中阳性率显著高于高中分化腺癌和黏液癌(81.1% vs 54.5%, 52.9%;  $P < 0.05$ ); hMLH1 在胃癌中的表达阳性率低于非癌组织, 但无显著性差异, 其中, 在黏液癌的阳性率显著低于其他两种腺癌(47.1% vs 81.8%, 97.2%;  $P < 0.001$ ); p53 在胃癌中的表达阳性率显著高于癌旁组织、胃炎黏膜和正常对照(47.4% vs 7.9%, 0.0%, 0.0%;  $P < 0.001$ ), 其中, 在黏液癌和低分化腺癌中的阳性率显著高于高中分化腺癌(64.7%, 54.1% vs 22.7%;  $P < 0.05$ )。

(2)在全部被检组织中, *H pylori* 感染组 hMSH2 和 hMLH1 的表达阳性率均低于相应的非感染组, 其中, 胃癌 *H pylori* 感染组 hMSH2 的表达阳性率显著低于非感染组(56.8% vs 81.3%)( $P < 0.05$ )。胃癌及癌旁组织 *H pylori* 感染组 p53 的表达阳性率均高于非感染组, 但无显著性差异。

结论: 胃癌的发生发展可能与 hMSH2 和 p53 基因的高表达有关; *H pylori* 感染影响 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的正常表达, 这可能是 *H pylori* 致癌的机制之一。

范凯, 马坚妹, 胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 刘丽娜, 许国旺. 胃黏膜细胞 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2904-2907  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2904.asp>

### 0 引言

胃癌的发生发展涉及多种因素, *H pylori* 感染是其中值得关注的高危因素之一<sup>[1-2]</sup>。*H pylori* 感染导致胃癌与癌基因、抑癌基因和错配修复(Mismatch repair, MMR)基因的改变有关。研究证实, MMR 基因能够纠正 DNA 复制过程中产生的碱基错配, 避免癌相关基因的突变, 保证基因的完整性和遗传的稳定性, 从而抑制癌的发生。目前已发现的人类 MMR 基因包括来自 MutS 家族的 hMSH2, hMSH3, hMSH6 及来自 MutL 家族的 hMLH1, hPMS1, hPMS2 和最新被鉴定出来的 hMLH3, 其中, 最早发现的 hMSH2(human MutS homolog 2 gene)和 hMLH1(human MutL homolog 1 gene)与胃癌关系密切<sup>[3-4]</sup>。我们采用

- 25 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
- 26 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医杂志 2001;2:97-99
- 27 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 28 Gong GZ, Waris G, Tanveer R. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 29 Ghosh AK, Steele R, Meyer K. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 30 Kaneda Y, Yoshida MC, Kohno K, Uchida T, Okada Y. Chromosomal assignment of the gene for human elongation factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3158-3162
- 31 Gasparini P, Calvano S, Memeo E, Bisceglia L, Zelante L. Assignment of ferritin L gene (FTL) to human chromosome band 19q13.3 by in situ hybridization. *Ann Genet* 1997;40:227-228
- 32 Guo W, Adams V, Mason J, McCabe ER. Identification of a ferritin light chain pseudogene near the glycerol kinase locus in Xp21 by cDNA amplification for identification of genomic expressed sequences. *Biochem Mol Med* 1997;60:169-173

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

• 研究快报 •

## 胃黏膜细胞 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达与幽门螺杆菌感染的关系

范凯, 马坚妹, 胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 刘丽娜, 许国旺

范凯, 马坚妹, 大连医科大学解剖学教研室 辽宁大连市 116027  
胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 大连医科大学第二附属医院分子生物学实验室 辽宁省大连市 116027  
刘丽娜, 大连医科大学第一附属医院消化内科 辽宁省大连市 116001  
许国旺, 中国科学院大连化学物理研究所 辽宁省大连市 116011  
中国科学院知识创新工程领域前沿基金资助项目, No. DIPCK2001A4  
项目负责人: 吕申, 116027, 辽宁省大连市, 医科大学第二附属医院分子生物学实验室. fankai1973@yahoo.com.cn  
电话: 0411-84687554  
收稿日期: 2004-10-21 接受日期: 2004-10-27

### 摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与胃癌、癌旁及胃炎黏膜中 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达的关系。

方法: 高中分化腺癌 22 例, 低分化腺癌 37 例, 黏液癌 17 例, 浅表性胃炎 38 例, 正常对照 10 例, 用快速尿素酶方法检测 *H pylori* 感染, 用免疫组化 SP 法检测 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的表达。

结果: (1)hMSH2 在胃癌中的表达阳性率显著高于癌旁组织、胃炎黏膜和正常对照(67.1% vs 35.5%, 42.1%, 30.0%;  $P < 0.01$ ), 其中, 在低分化腺癌中阳性率显著高于高中分化腺癌和黏液癌(81.1% vs 54.5%, 52.9%;  $P < 0.05$ ); hMLH1 在胃癌中的表达阳性率低于非癌组织, 但无显著性差异, 其中, 在黏液癌的阳性率显著低于其他两种腺癌(47.1% vs 81.8%, 97.2%;  $P < 0.001$ ); p53 在胃癌中的表达阳性率显著高于癌旁组织、胃炎黏膜和正常对照(47.4% vs 7.9%, 0.0%, 0.0%;  $P < 0.001$ ), 其中, 在黏液癌和低分化腺癌中的阳性率显著高于高中分化腺癌(64.7%, 54.1% vs 22.7%;  $P < 0.05$ )。

(2)在全部被检组织中, *H pylori* 感染组 hMSH2 和 hMLH1 的表达阳性率均低于相应的非感染组, 其中, 胃癌 *H pylori* 感染组 hMSH2 的表达阳性率显著低于非感染组(56.8% vs 81.3%)( $P < 0.05$ )。胃癌及癌旁组织 *H pylori* 感染组 p53 的表达阳性率均高于非感染组, 但无显著性差异。

结论: 胃癌的发生发展可能与 hMSH2 和 p53 基因的高表达有关; *H pylori* 感染影响 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的正常表达, 这可能是 *H pylori* 致癌的机制之一。

范凯, 马坚妹, 胡少为, 王朝晖, 刘敏, 吕申, 刘丽娜, 许国旺. 胃黏膜细胞 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因表达与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2904-2907  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2904.asp>

### 0 引言

胃癌的发生发展涉及多种因素, *H pylori* 感染是其中值得关注的高危因素之一<sup>[1-2]</sup>。 *H pylori* 感染导致胃癌与癌基因、抑癌基因和错配修复(Mismatch repair, MMR)基因的改变有关。研究证实, MMR 基因能够纠正 DNA 复制过程中产生的碱基错配, 避免癌相关基因的突变, 保证基因的完整性和遗传的稳定性, 从而抑制癌的发生。目前已发现的人类 MMR 基因包括来自 MutS 家族的 hMSH2, hMSH3, hMSH6 及来自 MutL 家族的 hMLH1, hPMS1, hPMS2 和最新被鉴定出来的 hMLH3, 其中, 最早发现的 hMSH2(human MutS homolog 2 gene)和 hMLH1(human MutL homolog 1 gene)与胃癌关系密切<sup>[3-4]</sup>。我们采用

免疫组化SP法,检测了hMSH2, hMLH1和p53在胃癌、癌旁、胃炎和正常黏膜中的表达,并分析了 *H. pylori* 感染与这三种基因表达的关系,进一步探讨 *H. pylori*感染在胃癌发生发展中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 76例胃癌标本来自大连医科大学第一附属医院2000–2002年胃镜下活检组织,其中男性55例,女性21例。患者年龄39–89岁,中位年龄65岁。经病理检查确诊,高中分化腺癌22例,低分化腺癌37例,黏液癌17例。38例胃炎标本均为浅表性胃炎,其中男性21例,女性17例,年龄23–71岁,中位年龄40岁。正常对照标本10例,为胃镜及组织学检查胃黏膜大致正常, *H. pylori*阴性,且无其他系统疾病者。其中男性4例,女性6例,年龄24–64岁,中位年龄44岁。胃癌组织中 *H. pylori*阳性44例,阴性32例;癌旁组织中 *H. pylori*阳性49例,阴性27例;胃炎黏膜中 *H. pylori*阳性26例,阴性12例。所有患者均未进行过抗 *H. pylori*治疗。组织切片经HE染色后,由两位有10 a以上工作经验的病理医师采用双盲法进行病理组织学诊断。

### 1.2 方法

**1.2.1 *H. pylori*感染检测** 快速尿素酶试验及HE染色<sup>[5]</sup>:两项均为阳性,则判定该病例有 *H. pylori*感染。

**1.2.2 hMSH2, hMLH1和p53蛋白的检测** 采用抗hMSH2单克隆抗体(美国Calbiochem公司);抗hMLH1单克隆抗体(美国Pharmingen公司);抗p53单克隆抗体(DO7,美国Zymed公司);SP免疫组化试剂盒(美国Zymed公司)。标本经石蜡包埋后制成5 μm的切片,免疫组化过程按试剂盒说明书完成。已知阳性切片作阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。三种蛋白的阳性表达均以细胞核内出现棕黄色颗粒为准。计数5个高倍视野或500个细胞,阳性细胞百分比大于20%定为阳性表达。

**统计学处理** 采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

表1 hMSH2, hMLH1和p53基因在不同黏膜组织中的表达

组别	n	hMSH2		表达阳性率(%)	hMLH1		表达阳性率(%)	p53		表达阳性率(%)
		–	+		–	+		–	+	
胃癌组织	76	25	51	67.1 <sup>b</sup>	14	62	81.6	40	36	47.4 <sup>d</sup>
高中分化腺癌	22	10	12	54.5	4	18	81.8	17	5	22.7 <sup>e</sup>
低分化腺癌	37	7	30	81.1 <sup>e</sup>	1	36	97.2	17	20	54.1
黏液癌	17	8	9	52.9	9	8	47.1 <sup>b</sup>	6	11	64.7
癌旁组织	76	49	27	35.5	7	69	90.8	70	6	7.9
胃炎黏膜	38	22	16	42.1	4	34	89.5	38	0	0.0
正常黏膜	10	7	3	30.0	2	8	80.0	10	0	0.0

$\chi^2 = 17.646$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 非癌组织;  $\chi^2 = 52.479$ , <sup>d</sup> $P < 0.001$  vs 非癌组织;  $\chi^2 = 6.391$ , <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 高中分化腺癌、黏液癌;  $\chi^2 = 8.071$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 低分化腺癌、黏液癌;  $\chi^2 = 19.564$ , <sup>e</sup> $P < 0.001$  vs 其他两种腺癌。

**2.1 胃癌、癌旁及胃炎黏膜 *H. pylori*感染率**分别为57.9%(44/76), 64.5%(49/76)和68.4%(26/38),三组之间无显著性差异。

**2.2 hMSH2在胃癌中的表达**阳性率显著高于非癌组织( $P < 0.01$ ),在低分化腺癌中的表达阳性率显著高于高中分化腺癌和黏液癌( $P < 0.05$ )。hMLH1在胃癌的表达阳性率低于非癌组织,但无显著性差异( $P > 0.05$ ),其中在黏液癌的阳性表达率显著低于其他腺癌( $P < 0.01$ )。p53在胃癌中的表达阳性率显著高于非癌组织( $P < 0.01$ ),其中在黏液癌和低分化腺癌的阳性率显著高于高中分化腺癌( $P < 0.05$ )(表1)。

**2.3 所有被检组织中, *H. pylori*感染组 hMSH2和hMLH1的表达**阳性率均低于相应的非感染组,其中,胃癌 *H. pylori*感染和非感染组hMSH2的表达有显著差异( $P < 0.05$ )。胃癌及癌旁组织 *H. pylori*感染组p53的表达阳性率高于非感染组,但无显著性差异( $P > 0.05$ )(表2)。

## 3 讨论

*H. pylori*是一种基因异质性生物,具有多种毒力因子,1994年被国际癌症研究会确定为胃癌I类致癌因子。研究证实,胃黏膜细胞中hMSH2和hMLH1基因的异常表达与 *H. pylori*感染有关<sup>[6]</sup>。hMSH2和hMLH1具有识别和切除错配碱基的功能,在消化道和生殖腺等细胞增生活跃、DNA复制容易出现错误的部位常见这两种基因表达产物。研究发现,膀胱癌、宫颈癌、涎腺癌等恶性肿瘤中hMSH2的表达增强<sup>[7–9]</sup>。在我们的研究中,hMSH2在胃癌中的表达增强,且在低分化腺癌的表达强于高分化腺癌。这表明细胞增生旺盛有助于hMSH2的表达上调,并提示hMSH2的高表达可以作为包括胃癌在内的某些恶性肿瘤发生的标志。此外,我们还发现hMLH1在胃癌的表达低于非癌组织,提示胃癌的发生可能与hMLH1的低表达有关,这与Kakar *et al*<sup>[10]</sup>在大肠癌中的发现相似。hMLH1与hMSH2在表达上出现的不同,在一定程度上反映了二者功能上的区别。因此,联合检测这两种基因可能有助于预测胃癌的发生。

表2 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的表达与幽门螺杆菌感染的关系

组别	n	hMSH2		表达阳性率(%)	hMLH1		表达阳性率(%)	p53		表达阳性率(%)
		-	+		-	+		-	+	
<i>H. pylori</i> <sup>+</sup> 胃癌组织	44	19	25	56.8 <sup>a</sup>	10	34	77.2	21	23	52.3
<i>H. pylori</i> <sup>-</sup> 胃癌组织	32	6	26	81.3	4	28	87.5	19	13	40.6
<i>H. pylori</i> <sup>+</sup> 癌旁组织	49	34	15	30.6	6	43	87.8	43	6	12.2
<i>H. pylori</i> <sup>-</sup> 癌旁组织	27	15	12	44.4	1	26	96.3	27	0	0.0
<i>H. pylori</i> <sup>+</sup> 胃炎黏膜	26	16	10	38.5	17	9	34.6	26	0	0.0
<i>H. pylori</i> <sup>-</sup> 胃炎黏膜	12	6	6	50.0	7	5	41.7	12	0	0.0

$\chi^2=5.010$ , <sup>a</sup> $P<0.05$  vs *H. pylori*<sup>-</sup> 胃癌组织

p53基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的基因, 编码 *M. 53 000* 的核磷蛋白, 参与细胞增生调节。野生型 p53 使细胞 G<sub>1</sub> 期停滞, 损伤的 DNA 得以修复, 修复失败则诱导细胞凋亡。突变型 p53 则使 DNA 损伤的细胞不断增生为恶性肿瘤<sup>[11-12]</sup>。p53 基因突变后, 其蛋白产物半衰期延长, 抗原性稳定, 可以用免疫组化法检测。我们发现, p53 在胃癌的表达阳性率显著高于癌旁组织, 在低分化腺癌的表达强于高分化腺癌, 在胃炎和正常黏膜中无表达, 表明 p53 与胃癌的发生和分化有关<sup>[13-14]</sup>。

通过近几年来对 *H. pylori* 的深入研究, 大多数学者认为 *H. pylori* 感染所致的胃癌一般遵循从慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生到胃癌的演变过程。然而, *H. pylori* 感染导致胃癌的分子机制仍不清楚, 推测可能是通过 *H. pylori* 产生损伤因素如细胞毒素等, 以及减弱胃黏膜的保护因素如维生素 C 等, 使组织损伤、胃黏膜上皮细胞增生加速, 以致基因突变, 使细胞向恶性转化。目前, 关于 *H. pylori* 感染与 p53 关系的研究报道很不一致。一些研究发现胃癌中 *H. pylori* 阳性者 p53 的突变率明显高于 *H. pylori* 阴性者, 这种胃癌与突变型 p53 过度表达密切相关<sup>[15]</sup>; 而另有研究表明, p53 突变是不依赖 *H. pylori* 的事件, *H. pylori* 感染不会引起 p53 突变<sup>[16-18]</sup>; 还有学者认为仅毒素相关蛋白(CagA)阳性 *H. pylori* 感染在胃癌 p53 突变中起重要作用<sup>[19]</sup>。在我们的研究中, 胃癌及癌旁组织 *H. pylori* 感染组 p53 的表达阳性率均高于非感染组, 此差异虽不具有显著性, 但随着样本数量的增加, 这种趋势可能会更明显。这提示 *H. pylori* 感染可能促使 p53 基因突变, 突变产物失去抑癌活性, 促使胃黏膜细胞向恶性转化。

Kim *et al*<sup>[6]</sup>发现, 在胃黏膜培养细胞的培养液中添加 *H. pylori* 后, hMLH1 和 hMSH2 基因的表达均下降, 故认为 *H. pylori* 感染能引起 hMLH1 和 hMSH2 表达降低。我们发现, 在所有被检测的组织中, *H. pylori* 感染组 hMLH1 和 hMSH2 的表达阳性率均低于相应的非感染组, 其中, 胃癌 *H. pylori* 感染组 hMSH2 的表达阳性率显著低于非感染组, 这证实了 Kim 的结论, 也进一步说明 *H. pylori* 感染不仅对 p53 等下游基因的表达有影响, 同时对 MMR 这类上游基因的表达也有一定影响, 而

这种影响导致 DNA 复制过程中产生的碱基错配不能得到及时有效的修复, 进而造成其他基因不能正常表达。然而, 这种影响是通过何种具体机制实现的, 目前还不能确定。

总之, 胃癌的发生发展与 hMSH2 和 p53 基因的高表达有关; *H. pylori* 感染影响 hMSH2, hMLH1 和 p53 基因的正常表达, 这可能是 *H. pylori* 致癌的机制之一。

#### 4 参考文献

- 1 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784
- 2 Wu AH, Crabtree JE, Bernstein L, Hawtin P, Cockburn M, Tseng CC, Forman D. Role of *Helicobacter pylori* CagA+ strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus. *Int J Cancer* 2003;103:815-821
- 3 Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 4 Zhang QX, Ding Y, Le XP, Du P. Studies on microsatellite instability in p16 gene and expression of hMSH2 mRNA in human gastric cancer tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:437-441
- 5 王雪梅, 屈汉廷. 检测胃黏膜幽门螺杆菌感染不同方法之比较. *华人消化杂志* 1998;6:128-130
- 6 Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:542-553
- 7 Leach FS, Hsieh JT, Molberg K, Saboorian MH, McConnell JD, Sagalowsky AI. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer* 2000;88:2333-2341
- 8 Castrilli G, Fabiano A, La Torre G, Marigo L, Piantelli G, Ranelletti FO, Piantelli M. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human mismatch repair system in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 2002;31:234-238
- 9 陈炳锦, 石一复, 周彩云, 陈晓端. 错配修复基因 hMSH2 在宫颈腺癌组织中的表达. *现代妇产科进展* 2001;10:417-418
- 10 Kakar S, Burgart LJ, Thibodeau SN, Rabe KG, Petersen GM, Goldberg RM, Lindor NM. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer* 2003;97:1421-1427
- 11 Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989;342:705-708
- 12 Miracco C, Spina D, Vindigni C, Filipe MI, Tosi P. Cell proliferation patterns and p53 expression in gastric dysplasia. *Int J Cancer* 1995;62:49-54

- 13 卢文, 陈丽英, 龚华实. 胃癌和癌前病变中幽门螺杆菌感染和增生细胞核抗原、p53、c-erbB-2 的表达. 中华肿瘤杂志 1999; 21:25-127
- 14 孟华, 刘丽娜, 吕申. 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达. 世界华人消化杂志 2004;12:494-496
- 15 高歌, 周长玉, 林种玉. 胃癌与 Hp 感染及 c-myc, P53 基因表达的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:941-943
- 16 田素芳, 熊永炎, 余少平, 蓝菁. 胃癌及其有关病变的幽门螺杆菌感染与抑癌基因表达的相关性研究. 癌症 2002;21:970-973
- 17 杨桂彬, 胡伏连, 吕有勇. 胃黏膜病变演化过程中幽门螺杆菌感

- 染与 p53 变异和 MG-7 抗原及核仁组成区相关蛋白表达的关系. 中华医学杂志 2003;83:1332-1335
- 18 Blok P, Craanen ME, Offerhaus GJ, Dekker W, Kuipers EJ, Meuwissen SG, Tytgat GN. Molecular alteration in early gastric carcinoma. No apparent correlation with *Helicobacter pylori* status. *Am J Clin Pathol* 1999;111:241-247
- 19 Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T. Association between CagA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, ba-x and transforming growth factor-beta-RII gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2001;91:481-485

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

• 研究快报 •

## 肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-前-S蛋白结合蛋白基因筛选

蔺淑梅, 张树林, 成 军, 刘 敏, 王 琳, 王建军, 杨 倩, 黄燕萍, 白桂芹

蔺淑梅, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
成军, 刘敏, 王琳, 王建军, 杨倩, 黄燕萍, 白桂芹, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

**目的:** 筛选并克隆人肝细胞 cDNA 文库中与乙型肝炎病毒 (HBV) 前-前-S 蛋白相互作用蛋白的基因, 探讨前-前-S 在 HBV 致病中的作用。

**方法:** 构建前-前-S 的酵母细胞表达载体, 采用酵母双杂交系统筛选人肝细胞 cDNA 文库, 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析。

**结果:** 获得了 54 个与前-前-S 蛋白特异性结合的阳性克隆, 其中包括 30 种已知蛋白基因和 8 个未知功能基因。

**结论:** 克隆出与乙型肝炎病毒前-前-S 蛋白结合的肝细胞蛋白基因, 为进一步研究前-前-S 在 HBV 致病中的作用奠定了基础。

蔺淑梅, 张树林, 成军, 刘敏, 王琳, 王建军, 杨倩, 黄燕萍, 白桂芹. 肝细胞 cDNA 文库中乙型肝炎病毒前-前-S 蛋白结合蛋白基因筛选. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2907-2910

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2907.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染常见, 不仅引起急、慢性病

毒性肝炎, 而且与肝纤维化 (LF)、肝细胞癌 (HCC) 的发生发展密切相关<sup>[1-12]</sup>. HBV 是很小的包膜病毒, 病毒基因组结构精密, 约 3 200 个碱基对 (bp), HBV 至少有含 4 个开放读码框架 (ORF), 分别命名为 S、C、P、X 区, 4 个 ORF 中表达的氨基酸长度不同, 其生物学功能也不相同, 其中全 S 区又因不同的起始密码子 (ATG) 而又人为的分为前-S1、前-S2 和 S 三个区, 前-S1、前-S2 和表面抗原主蛋白是按照同一开放读码顺序 (in frame) 进行翻译的. 最近董菁 *et al*<sup>[13]</sup> 对于中国 HBV 流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现在前-S1 区之前还存在一个 ORF, 长度 135 bp, 编码 45 aa, 将其命名为前-前-S 区, 并在既往已克隆的 HBV 基因组中得到了证实. 杨倩 *et al*<sup>[14]</sup> 对前-前-S 基因启动子序列的鉴定和转录活性的研究证实, 前-前-S- 基因 ORF 上游的序列具有启动子活性, 进一步证实了董菁发现的前-前-S 编码基因存在. 基因是通过蛋白质之间的相互作用而实现其功能的, 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键<sup>[15-16]</sup>. 为进一步研究前-前-S 基因在 HBV 致病中的作用, 我们利用酵母双杂交技术寻找其与肝细胞中相互作用的蛋白, 并进一步阐明其作用机制, 这对于明确 HBV 致病机制, 有效防治乙型肝炎有着重要意义。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** pGBKT7-BD 克隆载体, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株 (K1612-1)、人 cDNA 肝细胞文库等均购自 Clontech 公司. 酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基, X- $\alpha$ -半乳糖苷酶 (Gal) 等购自 Clontech 公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司. 复杂高效感受态 (FSB), 本室自制. 大肠杆菌

- 13 卢文, 陈丽英, 龚华实. 胃癌和癌前病变中幽门螺杆菌感染和增生细胞核抗原、p53、c-erbB-2 的表达. 中华肿瘤杂志 1999; 21:25-127
- 14 孟华, 刘丽娜, 吕申. 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达. 世界华人消化杂志 2004;12:494-496
- 15 高歌, 周长玉, 林种玉. 胃癌与 Hp 感染及 c-myc, P53 基因表达的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:941-943
- 16 田素芳, 熊永炎, 余少平, 蓝菁. 胃癌及其有关病变的幽门螺杆菌感染与抑癌基因表达的相关性研究. 癌症 2002;21:970-973
- 17 杨桂彬, 胡伏连, 吕有勇. 胃黏膜病变演化过程中幽门螺杆菌感

- 染与 p53 变异和 MG-7 抗原及核仁组成区相关蛋白表达的关系. 中华医学杂志 2003;83:1332-1335
- 18 Blok P, Craanen ME, Offerhaus GJ, Dekker W, Kuipers EJ, Meuwissen SG, Tytgat GN. Molecular alteration in early gastric carcinoma. No apparent correlation with *Helicobacter pylori* status. *Am J Clin Pathol* 1999;111:241-247
- 19 Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T. Association between CagA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, ba-x and transforming growth factor-beta-RII gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2001;91:481-485

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

• 研究快报 •

## 肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-前-S蛋白结合蛋白基因筛选

蔺淑梅, 张树林, 成 军, 刘 敏, 王 琳, 王建军, 杨 倩, 黄燕萍, 白桂芹

蔺淑梅, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061  
成军, 刘敏, 王琳, 王建军, 杨倩, 黄燕萍, 白桂芹, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

**目的:** 筛选并克隆人肝细胞cDNA文库中与乙型肝炎病毒(HBV)前-前-S蛋白相互作用蛋白的基因, 探讨前-前-S在HBV致病中的作用。

**方法:** 构建前-前-S的酵母细胞表达载体, 采用酵母双杂交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析。

**结果:** 获得了54个与前-前-S蛋白特异性结合的阳性克隆, 其中包括30种已知蛋白基因和8个未知功能基因。

**结论:** 克隆出与乙型肝炎病毒前-前-S蛋白结合的肝细胞蛋白基因, 为进一步研究前-前-S在HBV致病中的作用奠定了基础。

蔺淑梅, 张树林, 成军, 刘敏, 王琳, 王建军, 杨倩, 黄燕萍, 白桂芹. 肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-前-S蛋白结合蛋白基因筛选. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2907-2910

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2907.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染常见, 不仅引起急、慢性病

毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关<sup>[1-12]</sup>. HBV是很小的包膜病毒, 病毒基因组结构精密, 约3 200个碱基对(bp), HBV至少有含4个开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 4个ORF中表达的氨基酸长度不同, 其生物学功能也不相同, 其中全S区又因不同的起始密码子(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2和S三个区, 前-S1、前-S2和表面抗原主蛋白是按照同一开放读码顺序(in frame)进行翻译的. 最近董菁<sup>et al</sup><sup>[13]</sup>对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现在前-S1区之前还存在一个ORF, 长度135 bp, 编码45 aa, 将其命名为前-前-S区, 并在既往已克隆的HBV基因组中得到了证实. 杨倩<sup>et al</sup><sup>[14]</sup>对前-前-S基因启动子序列的鉴定和转录活性的研究证实, 前-前-S-基因ORF上游的序列具有启动子活性, 进一步证实了董菁发现的前-前-S编码基因存在. 基因是通过蛋白质之间的相互作用而实现其功能的, 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键<sup>[15-16]</sup>. 为进一步研究前-前-S基因在HBV致病中的作用, 我们利用酵母双杂交技术寻找其与肝细胞中相互作用的蛋白, 并进一步阐明其作用机制, 这对于明确HBV致病机制, 有效防治乙型肝炎有着重要意义。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** pGBKT7-BD 克隆载体, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、人cDNA肝细胞文库等均购自Clontech公司. 酵母YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基, X-α-半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌

(DH5 $\alpha$ ), 本室保存.

## 1.2 方法

1.2.1 肝细胞文库的扩增与转化 按照文库扩增手册操作滴定肝细胞文库原液, 欲达到  $3 \times 10^{12}$  cfu/L, 于 LB-Amp 琼脂平板进行扩增, 刮取收集菌液, 以 Qiagene Maxi 试剂盒提取质粒 DNA, 高效醋酸锂法转入酵母细胞 Y187, 于 SD/Leu 琼脂培养基生长扩增, 同时滴定转化文库, 收集酵母菌落, 以  $1 \times 10^6$  / 份分装备用.

1.2.2 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 用多聚酶链反应(PCR)法扩增 HBV 前-S 蛋白编码基因, 连接入酵母表达载体 pGBKT-7 中构建诱饵质粒, 酶切鉴定后, 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109. 挑取 2-3 mm 大小在 SD/-Trp 培养基上生长的转化了 pGBKT7-前-S 质粒的酵母 AH109 单菌落接种于 SD/-Trp 培养基中, 30 °C 250 r/min 振摇过夜, 次日离心后用  $2 \times$  YPDA 培养液 5 mL 重悬细胞, 计数浓度大于  $1 \times 10^{12}$  /L, 与肝细胞文库酵母细胞在 50 mL  $2 \times$  YPDA 中 30 °C 轻摇配合约 22 h, 离心后用  $0.25 \times$  YPDA 8 mL 重悬细胞, 分别铺板于 150 mm 的 SD/-Trp/-Leu/-His(3 缺), SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(4 缺) 培养基板各 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 及 SD/-Trp/-Leu 培养基上检验配合效率. 生长 6-18 d 后挑取直径大于 3 mm 的菌落再次画线于铺有 X- $\alpha$ -gal 的 4 缺培养基上检查  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性, 认为在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落.

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

## 2 结果

2.1 部分筛选克隆 Bgl II 酶切鉴定结果 因质粒 pACT2 内含有两个 Bgl II 酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 故使用该内切酶消化将释放出所筛选到的肝细胞文库的基因片段(图 1). 图 1 中出现的各个大小不同的 DNA 片段表明我们筛选的克隆为阳性克隆.

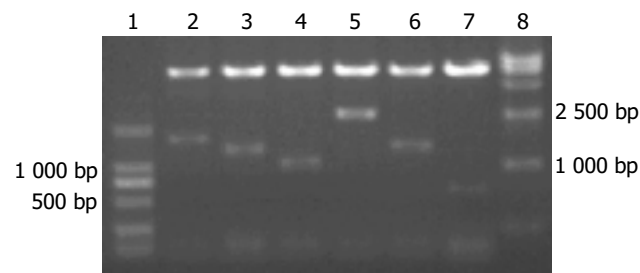


图 1 部分不同的克隆 Bgl II 酶切鉴定电泳图谱. 1, 8: 分别为 DNA2000 marker 及 DNA15000 marker; 2-7: 为不同的克隆酶切电泳结果.

2.2 cDNA 测序与同源性分析初步结果 我们共挑选 54 个阳性克隆测序, 测序结果与 GenBank 数据库进行初步比较, 其中 8 个克隆为未知功能基因, 其余 46 个均与已知基因序列高度同源(96-100%), 详细结果(表 1).

## 3 讨论

董菁 *et al*<sup>[17-19]</sup> 利用长距离精确聚合酶链反应(LA-PCR)和 TA 克隆-测序技术展示了同一患者来源的 HBV 基因组不同克隆之间的变异程度, 证明患者血清内的序列是不完全相同的, 符合准种表现. 董菁 *et al*<sup>[13]</sup> 在分析所获得的 5 个克隆的过程中, 在前-S1 区之上游发现还存在一个 ORF, 长度 135 bp, 编码 45 aa, 并将其命名为前-S 区. 选择的 GenBank 中 6 个其他克隆株进行比较, 其中 3 个克隆具有前-S 区 ORF, 另 3 个克隆由于在前-S 起始密码子的部位发生点替换突变而导致前-S 区不能表达. 董菁在 GenBank 中选择不同血清型的 HBV 基因组全序列, 应用 DNASIS 软件重新确定其 ORF, 结果发现甘人宝 *et al*<sup>[20]</sup>、Mukaide *et al*<sup>[21]</sup>、Okamoto *et al*<sup>[22]</sup> 克隆的 HBV 基因组序列中均存在前-S 区 ORF. 同时利用 NIH 网站的 BLAST 软件, 将前-S 区编码氨基酸序列输入后进行同源性搜索, 结果发现 5 个克隆中含有的氨基酸序列与董菁获得的序列有较高的同源性, 由此认为前-S 区是真实存在的.

HBV 表面抗原不仅是病毒遗传结构的包装蛋白, 而且截短型表面抗原中蛋白和大蛋白具有反式激活作用<sup>[13]</sup>, 这种功能是与表面抗原的多种形式激活癌基因有关<sup>[23]</sup>, 董菁进一步应用 DNA SIS 软件的蛋白质分析功能分析了前-S、前-S1、前-S2 和 S 基因的完全表达产物, 前-S 区较以往认为的大蛋白多出一个小的疏水区, 那么全 S 蛋白(含前-S 区)与大蛋白有不小的差异. 其中的 19(21)个疏水氨基酸在前-S 区形成了一个小的疏水功能域, 可能与蛋白的空间折叠或表面蛋白合成后分泌有关. 进一步研究前-S 所编码蛋白的功能及与之相互作用的蛋白具有重要意义.

我们应用酵母双杂交技术成功的筛选出肝细胞文库中与前-S 蛋白相互作用蛋白, 共获得 54 个阳性克隆, 经过测序分析及与 GenBank 数据库进行比较, 其中 8 个克隆为未知功能基因, 其余 46 均为已知蛋白基因, 值得我们关注的是筛选到一些与肝损伤及肝纤维化有关的蛋白基因. 已有的研究显示, 铁代谢异常与肝损伤密切相关, 有报道铁过载可增加 HBV 所致的肝细胞损害. 铁是 DNA、RNA 和蛋白质合成的必须辅助因子, 病毒侵入肝细胞后, 就利用细胞的蛋白质和核酸的合成机制进行复制, 细胞内铁可能参与了这个过程, 从而有利于病毒的复制进一步造成肝损伤; 铁及其结合蛋白具有免疫调节功能, 铁过量或缺乏可破坏免疫调节的平衡, 导致严重的有害的生理效应<sup>[24]</sup>. 表明 HBV 感染的发病与铁代谢可能有一定的联系. 进一步的研究还发现, 体内铁含量与干扰素(IFN)疗效密切关系, 血清

表 1 肝细胞中前-前-S蛋白结合的蛋白类型

筛选出的目的基因	相同克隆数	同源性(%)
人类醛缩酶 B	9	99-100
人类金属硫蛋白 2A	4	99-100
人类铁蛋白轻链	3	97-100
人类转铁蛋白受体 2 $\alpha$	1	99
人类金属蛋白酶组织抑制因子 1	2	99
人类成纤维细胞生长因子受体 4	1	99
人类精氨酸酶(肝)	2	100
人类补体 C8 $\alpha$ 亚单位	1	99
人类补体 C8 $\beta$ 亚单位	1	100
人类核孔 p54 蛋白质	1	100
人类羧酸酯酶 1(单核细胞/巨噬细胞丝氨酸酯酶 1)	1	99
人类羟酰辅酶 A 脱氢酶	1	99
人类细胞色素 C 氧化酶 II	1	99
人类细胞色素 P-450 s- 甲基乙苯妥英-4- 羟化酶	1	99
细胞色素 P-450(家族 2, 亚家族 E)	2	99
人类支链 $\alpha$ 酮酸脱氢酶激酶前体	1	98
人类氨基己糖酯(苷)酶 A( $\alpha$ 多肽)	1	99
人类苯丙氨酸羟化酶	1	99
人类 NADH 脱氢酶(辅酶 Q10) $\beta$ 亚成分	1	98
人类乙酰乳酸合酶同功酶	1	99
人类高半胱氨酸甲基转移酶 2	1	98
人类 3- 羟-3- 甲基戊二酰辅酶 A 裂解酶	1	99
人类谷氨酸氨连接酶	1	100
人类 $\alpha$ -2 糖蛋白 1(人类 $\alpha$ -2 糖蛋白)	1	99
人类蛋白酶体 26S 亚单位	1	100
人类视黄醇结合蛋白 4	1	100
人类 $\alpha$ 2 糖蛋白	1	96
人类酶原颗粒蛋白 16	1	100
人类 DAZ 相关蛋白 2	1	98
人类 RNA 聚合酶 II 羧基末端结构域(CTD)小磷酸酯酶 2	1	100
未知功能基因	8	98-100

铁蛋白水平与 IFN 疗效明显负相关, 高血清铁蛋白水平的患者对 IFN 疗效较差<sup>[25]</sup>. 转铁蛋白受体(TfR)是一种跨膜二聚体糖蛋白, 其功能是与 Fe-Tf (转铁蛋白)复合物结合后通过 Tf 循环将铁从细胞外转运到细胞内. 转铁蛋白是血液中一种主要的糖蛋白, 负责将肝组织(是铁贮藏的主要场所)的铁向其他组织的细胞运输. TfR 是细胞摄入铁的关键, 他表达的数量直接影响细胞的摄铁量. 我们的研究发现前-前-S蛋白可与铁代谢有关的两个关键蛋白(铁蛋白及转铁蛋白受体)相互作用, 推测 HBV 感染致肝损伤可能与 HBV 感染致铁代谢障碍有关, 为 HBV 感染致肝损伤机制的研究开辟了新的思路.

另外值得我们关注的是人类金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP-1), 在肝纤维化过程中 TIMP-1 通过对基质金属蛋白酶(MMPs, 主要是间质胶原酶即 MMP-1)

活性的抑制, 抑制了 I、III 型胶原等细胞外基质(ECM)的降解, 从而导致 ECM 在肝脏内的过度沉积, 促进了肝纤维化的形成和发展. 研究者发现在病损肝脏中 TIMP-1 的表达明显增高, TIMP-1 与肝纤维化的发生发展紧密相关<sup>[26-27]</sup>. 黄宇琦 *et al* 的动物实验表明, 肝纤维化发生发展过程中 TIMP-1 表达逐渐增强, 致二者的平衡被破坏, 大量 TIMP-1 的出现使间质胶原酶(人 MMP-1, 大鼠 MMP-13)MMP-13 失去活性, 造成肝损伤后增生的 ECM 成分尤其是 I、III 型胶原降解减少、沉积增多, 促进了肝纤维化、肝硬化的形成<sup>[28]</sup>. 杨长青 *et al* 研究发现, 反义 TIMP-1 对肝纤维化有一定的逆转作用<sup>[29]</sup>. 我们的研究发现, 前-前-S 蛋白能与人类金属蛋白酶组织抑制因子 1 结合, 这一结果将为 HBV 感染引起肝纤维化机制研究提供新的领域. 实验



还筛选到补体 $\alpha$ 及补体 $\beta$ 亚单位,提示前-前-S蛋白可能通过补体途径影响免疫系统功能,为研究HBV免疫损害方面的机制提出了新的思路。

除上述结果外,我们还筛选到多种能与前-前-S蛋白结合的蛋白,表明前-前-S蛋白可能具有广泛的作用,通过多种机制参与HBV感染的致病过程,其具体的作用机制尚需进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:1
- 2 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
- 3 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-211
- 4 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 5 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 6 张忠东, 成军, 张树林. 噬菌体展示技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:459-461
- 7 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 8 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 9 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 10 Walton CM, Wu CH, Wu GY. A ribonuclease H-oligo DNA conjugate that specifically cleaves hepatitis B viral messenger RNA. *Bioconj Chem* 2001;12:770-775
- 11 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 12 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 13 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 14 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:761-762
- 15 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 16 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979;7:335-346
- 17 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 18 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 19 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. HBsAg与抗-HBs同时阳性者体内S基因序列分析. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 20 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍. 克隆的adr亚型乙型肝炎病毒(pADR-1)的核苷酸顺序. 中国科学B辑 1986;5:55-57
- 21 Mukaide M, Kumazawa T, Hoshi A, Kawaguchi R, Hikiji K. The complete nucleotide sequence of hepatitis B virus, subtype adr (SRADR) and phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res* 1992;20:6105-6108
- 22 Okamoto H, Imai M, Shimozaki M, Hoshi Y, Iizuka H, Gotanda T, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of a cloned hepatitis B virus genome, subtype ayr: comparison with genomes of the other three subtypes. *J Gen Virol* 1986; 67 (Pt 11):2305-2314
- 23 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:96-100
- 24 Walker EM Jr, Walker SM. Effects of iron overload on the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:354-365
- 25 Distant S, Bjoro K, Hellum KB, Myrvang B, Berg JP, Skaug K, Raknerud N, Bell H. Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin in treatment in patients with chronic hepatitis C infection. *Liver* 2002;22:269-275
- 26 Zhang BB, Cai WM, Weng HL, Hu ZR, Lu J, Zheng M, Liu RH. Diagnostic value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood mononuclear cells for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2490-2496
- 27 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:86-90
- 28 黄宇琦, 高毅, 陈泽洪, 王宇, 方石岗, 杨继震, 李朝龙. 间质胶原酶及其抑制因子-1不平衡表达与肝纤维化的关系. 第一军医大学学报 1999;19:208-210
- 29 杨长青, 胡国龄, 谭德明, 张铮. 反义金属蛋白酶组织抑制因子-1表达质粒对实验性大鼠肝纤维化的影响. 中华内科杂志 2000;9:401-404

# 乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶 N 末端蛋白基因芯片研究

陈国凤, 王琳, 成军, 刘妍, 张健, 邵清, 张玲霞, 李莉

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

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

## 摘要

**目的:** 检测乙型肝炎病毒(HBV)DNA聚合酶N末端蛋白(TP)的表达对肝母细胞瘤细胞HepG2基因表达谱的影响, 进一步阐明TP在乙型肝炎慢性化及致肝细胞癌发生发展过程中的分子生物学机制。

**方法:** 根据 AF384372 HBVDNA 病毒株序列设计、合成 HBV DNA P-TP 基因序列特异性的引物, 以含有 AF384372HBVDNA P全基因组cDNA的质粒G318A7作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增TP蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的HBV DNA-TP 编码基因片段克隆到 TA 载体中进行核苷酸序列的测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TP. 以脂质体转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 提取 mRNA, 逆转录为 cDNA, 与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行DNA芯片分析。

**结果:** 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定, 证实准确无误。以单链可变区抗体的Western blot杂交技术证实构建的表达载体转染HepG2细胞之后有TP蛋白的表达, 提取高质量的mRNA并进行逆转录成为cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1152个基因表达谱的筛选中, 发现有111个基因表达水平显著上调, 88个基因表达水平显著下调。

**结论:** 应用基因表达谱芯片成功筛选了HBV DNA P-TP转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明TP蛋白致病的分子生物学机制提供依据。

陈国凤, 王琳, 成军, 刘妍, 张健, 邵清, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒DNA聚合酶N末端蛋白基因芯片研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2911-2915  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2911.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒DNA聚合酶(HBV DNA P)N末端蛋白(TP)基因由534个核苷酸组成, 编码178个氨基酸, 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<sup>[1]</sup>. 近年研究表明HBV复制的第一步是HBV聚合酶识别5'-末端的前基因组RNA的核壳包裹信号 $\epsilon$ . 利用 $\epsilon$ 的茎-环(stem-loop)结构域为模板, 聚合酶的TP内第96位酪氨酸残基为引物, 引导DNA的合成, 同时又是RNA衣壳体包裹信号 $\epsilon$ 的结合位点, 使聚合酶与前基因组RNA结合, 在RT作用下, 病毒RNA转化为DNA<sup>[1-6]</sup>.

我们应用基因芯片技术, 筛选HBV DNA P-TP基因转染细胞后差异表达的基因, 检测TP的表达对肝细胞基因表达谱的影响, 为深入了解HBV DNA P-TP蛋白在HBV病毒慢性感染及致肿瘤发生过程作用中的作用机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂** 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞(由本室保存), 含有AF384372 HBVDNA P全基因组cDNA的质粒G318A7有本室合成并保存. 细胞培养相关试剂、总RNA提取试剂Trizol及真核表达载体pcDNA3.1(-)均购自Invitrogen公司. 人类基因组分类I芯片包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、细胞信号转导相关基因等1152个cDNA, 由上海联合基因有限公司提供. mRNA纯化试剂Oligotex mRNA Midi Kit 购自Qiagen公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 真核表达载体构建及细胞转染** 根据HBV DNA AF384372病毒株序列设计、合成HBV DNA P-TP基因序列特异性的引物, 上下游引物序列分别为: 5'-GAA TTC ATG ATG CCC CTA TCT TAT CAA-3', 5'-GGA TCC TTA CTC TTG TTC CCA AGA ATA-3', 下划线部分分别为引物两端内切酶EcoRI和BamHI的酶切位点. 以含有全长AF384372 HBV DNA P基因区的cDNA质粒G318A7作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增HBV DNA P-TP的全长编码基因. 先克隆到TA载体中进行序列测定, 然后再亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TP. 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂Lipofectamine PLUS将2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-TP和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞, 48 h后收获细胞, 每5  $\times$  10<sup>6</sup>个细胞加入1 mL Trizol试剂, 立即于液氮中保存。

**1.2.2 总RNA提取及mRNA纯化** 使用Trizol试剂一步法提取转染pcDNA3.1(-)-TP和空载体pcDNA3.1(-)的细胞HepG2总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行热稳定实验,

于-20℃和70℃保温1h后,经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化.纯化mRNA并行电泳检测.

1.2.3 探针标记及芯片制备 常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg).乙醇沉淀后溶解在20 μL 5 × SSC+2 g/L SDS杂交液中.芯片包含的1 152个cDNA以通用引物进行PCR扩增,PCR产物长度为1 000–3 000 bp.靶基因以0.5 g/L溶解于3 × SSC溶液中,用Cartesian公司的Cartesian 7 500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样.玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min),紫外线UV交联,再分别用2 g/L SDS、水及2 g/L的硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用.

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

1.2.5 检测与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3 000扫描芯片.用预先选定的内参照基因(24条管家基因,每个基因点2个点,共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正.用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度,计算Cy5/Cy3比值.阳性结果判断: Cy5/Cy3>1.9,红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5,为绿色荧光,显示表达减弱.

表1 部分表达显著增强的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_006597	Homo sapiens heat shock 70kD protein 8 (HSPA8), mRNA 热休克 70kD 蛋白 8(HSPA8)	3.029
2	AF070674	Homo sapiens inhibitor of apoptosis protein-1 (MIHC) mRNA, complete cds 凋亡蛋白 1 抑制剂(MIHC)	3.377
3	NM_006644	Homo sapiens heat shock 105kD (HSP105B), mRNA 热休克蛋白 105kD(HSP105B)	3.823
4	NM_002482	Homo sapiens nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) (NASP), mRNA 核自身抗原精蛋白(结合性组蛋白)(NASP)	4.553
5	NM_014887	Homo sapiens hypothetical protein from BCRA2 region (CG005), mRNA	4.602
6	AK055725	Homo sapiens cDNA FLJ31163 fis, clone KIDNE1000050	5.212
7	NM_003276	Homo sapiens thymopoietin (TMPO), mRNA 促胸腺生成素(TMPO)	6.171
8	M11952	Human T-cell receptor rearranged beta chain gene V-region (V-D-J) V-beta-ATL12-2 T 细胞受体重新排列 β 链可变区	10.280

表2 部分表达显著降低的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_005627	Homo sapiens serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK), mRNA 血清 / 糖皮质激素调节激酶(SGK)	0.097
2	NM_001961	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2), mRNA 真核翻译延伸因子 2(EEF2)	0.131
3	NM_001417	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4B (EIF4B), mRNA 真核翻译起始因子 4B(EIF4B)	0.228
4	NM_003641	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 1 (9–27) (IFITM1), mRNA 干扰素诱导的跨膜蛋白 1(9–27)	0.287
5	NM_005954	Homo sapiens metallothionein 3 (growth inhibitory factor (neurotrophic)) (MT3), mRNA 金属硫因 3(生长抑制因子)(MT3)	0.327
6	NM_002415	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) (MIF), mRNA 巨噬细胞移动抑制因子(糖基化抑制因子)(MIF)	0.375
7	NM_001551	Homo sapiens immunoglobulin (CD79A) binding protein 1 (IGBP1), mRNA (IGBP1)免疫球蛋白(CD79A)结合蛋白 1	0.382
8	NM_003789	Homo sapiens TNFRSF1A-associated via death domain (TRADD), mRNA TNFRSF1A 相关的死亡域(TRADD)	0.391

## 2 结果

2.1 HBV DNA P-TP 蛋白真核表达载体的构建 真核表达载体 pcDNA3.1(-)-TP 经过限制性内切酶作图分析和核苷酸序列的测定,证实含有完整的开放读码框架,序列准确无误.以单链可变区抗体的 Western blot 杂交技术证实构建的表达载体转染 HepG2 细胞之后有 TP 蛋白的表达(有关实验方法及结果将另文发表).

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度  $A_{260}/A_{280}>2.0$ ,热稳定实验 70℃保温 1 h 与 -20℃1 h 电泳条带比较,显示 28 S 条带无明显降解,电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9–4.0 kb 的连续条带.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA.为了监控芯片杂交技术体系的整个过程,在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因,共 8 个点),这些点的杂交信号均很低,证实了数据的可靠性.由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色),对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色),红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异,黄色代表表达水平无差异.按阳性标准,从 1 152 个基因中筛选出差异常表达基因共 199 条,占 17.27%,其中 111 条基因表达增强,88 条基因表达降低.

2.4 差异表达基因分析 表达增强的基因主要有信号转导相关基因等(表1).表达降低的基因主要有细胞转录翻译相关蛋白等(表2).

### 3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝DNA病毒的一种, HBV DNA的长度为3.2 kb, 具有4个开放读码框架(ORF), 分别编码HBV的表面抗原蛋白, 核心/e抗原蛋白, X蛋白以及HBV DNA聚合酶(HBV DNA P)<sup>[7]</sup>. HBV DNA P基因在ORF中最长, 并且与C、S、X基因区有重叠, 其编码的P蛋白含有3个功能域和1个无意义的隔离片(spacer), 排列顺序为N-末端蛋白(TP), 隔离片(spacer), 逆转录酶(RT)/DNA聚合酶和RNase H, 各区段分别在nt2307-2840、nt133-1128、nt1129-1621和nt2841-0-132<sup>[1]</sup>. 由于受到不能从病毒体直接纯化和在不同的系统中表达有活性的酶的限制, 目前对聚合酶及其所编码的各个功能区域蛋白质的功能的认识还不是很清楚. 目前研究显示, HBV DNA-TP对于完整的聚合酶功能是必要的, 在HBV聚合酶的TP内第96位酪氨酸残基, 是RNA衣壳体信号序列(称为 $\epsilon$ )的结合位点, 在前基因组RNA内用于负链DNA合成. 同时, TP在病毒复制过程中具有蛋白引导功能, 蛋白引导不仅需要病毒逆转录酶和 $\epsilon$  RNA模板, 也需要特异的宿主细胞因子(细胞蛋白), 包括热休克蛋白HSP90, 多种分子伴侣(cochaperone)蛋白, 还有一些不清楚的成分共同组成的核蛋白复合物. 有功能的复合物催化合成短链DNA引物, 该引物又作为 $\epsilon$ 与TP共价结合的模板<sup>[8-14]</sup>.

我们构建了真核细胞表达载体pcDNA3.1(-)-TP, 应用基因表达谱芯片对pcDNA3.1(-)-TP转染的HepG2细胞和以空载体转染的相同细胞系的mRNA进行检测, 通过分析二者之间基因表达的差异信息, 寻找TP蛋白表达对肝细胞基因表达谱的影响. 从表1列举了部分表达增强的基因及编码的蛋白, 如细胞伴侣蛋白(热休克蛋白)HSPA8, HSP105B; 促胸腺生成素(TMPO), T细胞受体重新排列 $\beta$ 链可变区, 凋亡蛋白1抑制剂(MIHC), 核自身抗原精蛋白(结合性组蛋白), 以及某些编码未知功能的蛋白的基因. 分析这些表达增强的基因及所编码的蛋白, HSPA8由HSP70家族基因编码, HSP70家族含有热的诱导剂和组成成分, 后者称为热休克同源蛋白, 这种蛋白与新合成的多肽结合使其更容易正确折叠. 他也在某些膜的成分通过细胞时起ATP酶的功能. HSP90, HSP70, HSP40, Hop/p60和p23均为细胞因子, HSP90和HSP70是ATP酶, 在ATP结合和水解时易于折叠, HSP40能刺激HSP70的ATP酶活性和调节HSP70的陪伴功能. P60能与HSP90和HSP70结合, p23为小的酸性磷蛋白, 与HSP90结合, 进一步提高重组动力学. RT被分子伴侣蛋白活化后是一个动力学过程, 依赖ATP水解和HSP90 ATP酶活性. HSP90及其相关产物在DHBV感染通过RNA信号 $\epsilon$ 与DHBV聚合酶结合对DHBV复制起重要作用. HSP70是HSP90联合体组成成分, 但HSP70可能直接与HBV聚合酶结合, 不需要HSP90参与<sup>[14-17]</sup>. TMPO含有TMPO  $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ , 广泛存在于核蛋白中, 在核包膜组织和细胞周期的调控中

起重要作用, Yokota *et al*<sup>[18]</sup>用抑制性消减杂交技术(SSH), 用Ptc(+/-)杂交鼠为实验动物, 发现TMPO在成纤维细胞瘤(MBs)中表达明显增高. Weber *et al*<sup>[19]</sup>发现TMPOs $\beta$ 在所有的癌细胞检测中都有高度表达, 在低增生的神经组织中表达非常低, 提示TMPOs beta表达可能与癌症发生相关, 可能作为新的肿瘤标记, 或者作为治疗肿瘤的新的靶目标. Gonser *et al*<sup>[20]</sup>研究发现TMPO的氨基酸残基RKDVY(TP5, 胸腺五肽)具有提高细胞免疫水平, 使不同细胞细胞数量和活性提高, 支持其具有多功能效力的推测, 但是在分子水平上机制不清. HBV DNA TP可能通过上调TMPO表达, 刺激机体的细胞免疫反应, 增强对病毒的清除作用, 但另一方面, 也可能是使HBV慢性感染导致肝癌的诱因之一. T细胞受体重新排列 $\beta$ 链可变区(TCRBV)是多基因家族, 含有I类和II类MHC分子假定的结合位点, BV5, BV6, BV7是多基因TCRBV成员. Meyer-Olson *et al*<sup>[21]</sup>利用黑猩猩的TCRBV图谱与人类相似的特点, 用黑猩猩感染HCV作为动物模型, 研究人类感染HCV的分子免疫机制. HBV DNA TP上调TCRBV, 可能对T细胞免疫反应起调节作用. HBV DNA TP对凋亡蛋白1抑制剂(hIAP-1)具有上调作用, hIAP-1由cDNAs CA2\_1编码. CA2\_1(hIAP-1)是由血管壁的内皮细胞和吞噬细胞发生炎症时表达的, 推测其对血管内皮细胞的凋亡起抑制作用<sup>[22]</sup>. 慢性HBV感染时, HBV通过诱导肝细胞凋亡导致肝细胞损害, 病毒与肝组织整合导致肝硬化、甚至肝癌发生, 但是否同时也有一些凋亡抑制因子存在, 使得肝细胞凋亡处于一种动态平衡的状态, 目前尚无相关资料, 需进一步研究HBV DNA TP对凋亡蛋白1抑制剂(hIAP-1)具有上调作用的意义. 核自身抗原精蛋白(结合性组蛋白)(NASP)是在人的睾丸中发现的核组蛋白结合蛋白, 但NASP功能还不是很清楚. 人的体细胞和睾丸NASP mRNAs在不同转换细胞中的表达和在人类肿瘤中的检测, 进一步证明NASP在细胞分裂周期中对分裂细胞起作用<sup>[23-24]</sup>. 此外HBV DNA TP还对一些未知功能的基因起上调作用.

表2列举了部分表达降低的基因及编码的蛋白, 如真核翻译延伸因子2(EEF2), 真核翻译抑制因子4B(EIF4B); TNFRSF1A相关的死亡域; 如干扰素诱导的跨膜蛋白1(9-27), 金属硫因3(生长抑制因子), 巨噬细胞移动抑制因子(糖基化抑制因子), 免疫球蛋白(CD79A)结合蛋白1; 血清/糖皮质激素调节激酶. 分析下调基因, 血清/糖皮质激素调节激酶在肝细胞基因筛选中有调节细胞水合或水肿的作用. 细胞水合作用是分解代谢的信号. SGK可刺激肝糖元分解和蛋白质分解, 抑制蛋白和糖原合成, 并且在激活某种钾钠氯通道方面也是重要的. TGF- $\beta$ 参与糖尿病的并发症的病理生理改变, 他可以刺激SGK在肝细胞内的表达. 因此, TGF- $\beta$ 和SGK在糖尿病肾病时表达提高, 提示SGK与疾病发展有关. 过氧化物酶增生体激活受体(PPAR $\gamma$ )不仅在脂肪细胞分化

和脂质代谢中起重要作用,而且在肾皮质集合管内通过刺激上皮钠通道(epithelial sodium channel, ENaC)的活性来调节钠的重吸收,使机体保持钠和水的动态平衡.PPAR $\gamma$ 可以调节 SGK1 活性,PPAR $\gamma$ 激动剂刺激肾皮质集合管细胞可以使 SGK1 的活性提高,导致细胞表面 ENaC- $\alpha$  水平增加.电泳淌度移动试验显示这是由于 PPAR $\gamma$ 与 SGK1 促进剂的特异性反应元件相结合的结果.

ENaC 由醛固酮和胰岛素共同调节,主要通过 SGK1 起作用.但 SGK 下调在乙肝病毒感染中的意义目前还不清楚,可能引起对钠和水及糖类、脂类代谢的调节作用下降,导致患者易表现为相应的代谢紊乱<sup>[25-27]</sup>.真核翻译延伸因子 2(EEF-2),编码 GTP 结合翻译延伸因子家族的成员,是真核细胞合成蛋白的必要因子.编码 EEF-2 的基因在人类第 19 号染色体上,推测其基因表达下调使蛋白合成能力下降. EIF4B 是多域蛋白,主要是在翻译开始时具有促进信使 RNA 与 40S 亚单位核糖体结合的一系列活性,具有 RNA 识别序列(RNA recognition motif domain)的关键结构,其基因下调可能使 RNA 的结合和延伸活性下降<sup>[28]</sup>,目前有关研究还较少,其对于慢性乙型肝炎病毒感染者的意义有待进一步研究.干扰素诱导的跨膜蛋白 1(9-27)(IFITM1),是人类  $\alpha$  和  $\gamma$  干扰素诱导的 1-8 基因家族成员,是白细胞表面蛋白,最早发现其对干扰素抑制细胞增生起媒介作用,以后又发现其可提高 RSa 细胞对 X 线的抵抗作用<sup>[29]</sup>,其基因表达下调可能导致白细胞等对干扰素作用不敏感,细胞对有害物质的侵袭抵抗力下降.金属硫因(metallothionein-III, MT-III),是金属结合蛋白,在许多组织中有表达,包括脑组织.金属硫因保护细胞和器官免受毒物和氧化剂损害,主要保护各种神经组织,尤其是脑组织免受缺氧的损害<sup>[30-31]</sup>.目前研究还发现 MT-III 通常在胃癌组织中表达明显减低,其机制不清,可能与 MT-III 基因内区 CpG 岛的过甲基化有关<sup>[32]</sup>.在慢性乙肝感染者体内表达下调,可能导致肝细胞抗病毒、抗氧化能力下降.巨噬细胞移动抑制因子(糖基化抑制因子)(MIF)是与细胞免疫、免疫控制以及炎症有关的淋巴因子.他通过抑制糖皮质激素的抗炎作用来调节宿主巨噬细胞防御功能.这种淋巴因子和 JAB1 蛋白在靠近细胞外膜的胞质内形成复合物,可能在形成完整信号通道方面起到附加作用<sup>[33-34]</sup>.同时, MIF 可以与凋亡相关蛋白 BNIP1 相互作用,具有抗凋亡的作用<sup>[35-36]</sup>.对 MIF 的进一步研究可能对人类的多种疾病提供新的治疗方法.免疫球蛋白结合蛋白 1(IGBP1),也称 B 细胞信号转换分子(alpha 4).这种基因被表达为 1.4 kb mRNA,存在于脾、淋巴结、胸腺、阑尾、外周血白细胞、骨髓、胎肝、心、脑、胎盘、骨骼肌、肾、胰腺中.人类 alpha 4 (IGBP1) 基因位于 X 染色体 q13.1-q13.3 上. TNFRSF1A 相关的死亡域(TRADD),是一个含有改造分子的死亡域蛋白(death domain protein, TRADD),同肿瘤坏死因子受体超家族成员 1A(TNFRSF1A)/TNFR1 相互作用,介导

程序性细胞死亡信号和 NF- $\kappa$ B 的激活.这个蛋白结合改造的蛋白 TRAF2,减少凋亡蛋白抑制剂(IAPs)的补充,抑制 TRAF2 介导的凋亡.这种蛋白也能与 TRAF2 受体和改造的蛋白 FADD/MORT1 相互作用,与 Fas 诱导的细胞死亡程序有关. TRAF 蛋白是 TNF 受体超家族的细胞活化、存活、抗凋亡功能的主要递质.既可以直接与受体相互作用又可以间接通过改造蛋白 TRADD 补充到活化的 TNF 受体中. TRADD 表达下调,可能使某些通过引起肿瘤细胞凋亡来达到抗肿瘤治疗作用的化疗药物效果减弱<sup>[37-39]</sup>.

总之,利用基因表达谱芯片技术研究 HBV DNA-TP 蛋白对肝细胞基因表达谱的影响,分析了 TP 蛋白对 HepG2 细胞中许多不同基因表达的调节作用,证明这些基因与细胞信号转导、细胞增生与分化、细胞凋亡等生物过程密切相关,对阐明 HBV DNA-TP 蛋白在慢性 HBV 感染导致的病理生理变化及致肝细胞肿瘤发生中的作用具有重要意义.

#### 4 参考文献

- 1 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:27-28
- 2 Wang XT, Grammatikakis N, Hu JM. Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002; 277:24361-24367
- 3 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 4 Jasper ZP, Robert EL, Rolf IC, Lena N. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73:4188-4196
- 5 Wang XT, Hu JM. Distinct Requirement for two stages of protein-primed initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 6 Tang H, McLachlan A. A pregenomic RNA sequence adjacent to DR1 and complementary to epsilon influences hepatitis B virus replication efficiency. *Virology* 2002;303:199-210
- 7 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-103
- 8 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶末端蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12:391-393
- 9 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 DNA 多聚酶 P 结构域研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12:393-397
- 10 Li Z, Tyrrell DL. Expression of an enzymatically active polymerase of human hepatitis B virus in a coupled transcription-translation system. *Biochem Cell Biol* 1999;77:119-126
- 11 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47: 301-308
- 12 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 13 Miriam T, Peter LE, Thien T, Marc LM, Ming Q, Christopher JB, Allison RJ. Animal: DNA viruses: Sequence comparison of an Australian duck hepatitis B virus strain with other avian hepadnaviruses. *J Gen Virol* 2001;82:373-378
- 14 Cho G, Park SG, Jung G. Localization of HSP90 binding sites in the human hepatitis B virus polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:191-196
- 15 Cho G, Suh SW, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of Hsp90beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:203-211

- 16 Hu JM, David T, Dana A, Wang XT. *In Vitro* reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol* 2002;76:269-279
- 17 Park SG, Kyung RJ, Jung G. Hsp90 makes the human HBV Pol competent for *in vitro* priming rather than maintaining the human HBV Pol/pregenomic RNA complex. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:99-107
- 18 Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, Kohata T, Loreto M, Ueda S, Dura W, Grajkowska W, Kuo JS, Rutka JT. Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene* 2004;23:3444-3453
- 19 Weber PJ, Eckhard CP, Gonser S, Otto H, Folkers G, Beck-Sickinger AG. On the role of thymopoietins in cell proliferation. Immunochemical evidence for new members of the human thymopoietin family. *Biol Chem* 1999;380:653-660
- 20 Gonser S, Crompton NE, Weber PJ, Beck-Sickinger AG, Folkers G. TP5 triggers signal transduction involving mitogen activated protein kinases in monocytes. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19:155-166
- 21 Meyer-Olson D, Brady KW, Blackard JT, Allen TM, Islam S, Shoukry NH, Hartman K, Walker CM, Kalams SA. Analysis of the TCR beta variable gene repertoire in chimpanzees: identification of functional homologs to human pseudogenes. *J Immunol* 2003;170:4161-4169
- 22 Horrevoets AJ, Fontijn RD, van Zonneveld AJ, de Vries CJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* 1999;93:3418-3431
- 23 Richardson RT, Bencic DC, O'Rand MG. Comparison of mouse and human NASP genes and expression in human transformed and tumor cell lines. *Gene* 2001;274:67-75
- 24 Richardson RT, Batova IN, Widgren EE, Zheng LX, Whitfield M, Marzluff WF, O'Rand MG. Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. *J Biol Chem* 2000;275:30378-30386
- 25 Hong G, Lockhart A, Davis B, Rahmoune H, Baker S, Ye L, Thompson P, Shou Y, O'Shaughnessy K, Ronco P, Brown J. PPARgamma activation enhances cell surface ENaCalpha via up-regulation of SGK1 in human collecting duct cells. *FASEB J* 2003;17:1966-1968
- 26 Farman N, Boulkroun S, Courtois-Coutry N. Sgk: an old enzyme revisited. *J Clin Invest* 2002;110:1233-1234
- 27 Lang F, Cohen P. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001;108:17
- 28 Fleming K, Ghuman J, Yuan X, Simpson P, Szendroi A, Matthews S, Curry S. Solution structure and RNA interactions of the RNA recognition motif from eukaryotic translation initiation factor 4B. *Biochemistry* 2003;42:8966-8975
- 29 Kita K, Sugaya S, Zhai L, Wu YP, Wano C, Chigira S, Nomura J, Takahashi S, Ichinose M, Suzuki N. Involvement of LEU13 in interferon-induced refractoriness of human RSa cells to cell killing by X rays. *Radiat Res* 2003;160:302-308
- 30 Tanji K, Irie Y, Uchida Y, Mori F, Satoh K, Mizushima Y, Wakabayashi K. Expression of metallothionein-III induced by hypoxia attenuates hypoxia-induced cell death in vitro. *Brain Res* 2003;976:125-129
- 31 You HJ, Oh DH, Choi CY, Lee DG, Hahm KS, Moon AR, Jeong HG. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2002;1573:33-38
- 32 Deng D, El-Rifai W, Ji J, Zhu B, Trampont P, Li J, Smith MF, Powel SM. Hypermethylation of metallothionein-3 CpG island in gastric carcinoma. *Carcinogenesis* 2003;24:25-29
- 33 Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:791-800
- 34 Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003;197:1467-1476
- 35 Shen L, Hu J, Lu H, Wu M, Qin W, Wan D, Li YY, Gu J. The apoptosis-associated protein BNIP1 interacts with two cell proliferation-related proteins, MIF and GFER. *FEBS Lett* 2003;540:86-90
- 36 Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, Wagner E, Braun A, Bernhagen J. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol* 2003;170:3337-3347
- 37 Thorburn J, Frankel AE, Thorburn A. Apoptosis by leukemia cell-targeted diphtheria toxin occurs via receptor-independent activation of Fas-associated death domain protein. *Clin Cancer Res* 2003;9:861-865
- 38 Rokudai S, Fujita N, Kitahara O, Nakamura Y, Tsuruo T. Involvement of FKHR-dependent TRADD expression in chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:8695-8708
- 39 Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, Myszkowski DG, Wu H. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 2000;101:777-787

# 血管内皮生长因子反义核酸治疗裸鼠皮下种植胰腺癌

邵成浩, 胡先贵, 刘 瑞, 张怡杰, 唐 岩, 曹贵松

邵成浩, 胡先贵, 刘瑞, 张怡杰, 唐岩, 曹贵松, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院普外科 上海市 200433  
国家自然科学基金资助项目, No. 30200275  
项目负责人: 邵成浩, 200433, 上海市第二军医大学附属长海医院普外科.  
schhao@133sh.com  
电话: 021-25072074  
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-09-19

## 摘要

**目的:** 探讨抗血管生成基因转染治疗胰腺癌的可行性。

**方法:** 构建反向插入VEGF<sub>165</sub>cDNA的复制缺陷型腺病毒载体, 体外转染SW1990细胞, MTT法检测重组腺病毒转染对细胞生长的影响。Northern blot和ELISA检测转染前后SW1990细胞VEGF的mRNA水平和蛋白表达。裸鼠皮下种植瘤体内注射重组腺病毒, CD31染色观察反义VEGF重组腺病毒转染对裸鼠种植瘤微血管密度和肿瘤生长速度的影响。

**结果:** 重组腺病毒体外转染并不影响SW1990细胞的生长速度。Northern blot和ELISA检测在mRNA水平和蛋白水平证实反义VEGF重组腺病毒转染对体外培养的SW1990细胞内源性VEGF表达有明显的下调作用。体内实验表明反义VEGF重组腺病毒转染可减少肿瘤内微血管数量, 肿瘤生长受到抑制。

**结论:** 反义VEGF<sub>165</sub>重组腺病毒可以抑制胰腺癌的血管生成和肿瘤的生长, 为抗血管生成的基因治疗奠定了基础。

邵成浩, 胡先贵, 刘瑞, 张怡杰, 唐岩, 曹贵松. 血管内皮生长因子反义核酸治疗裸鼠皮下种植胰腺癌. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2916-2918  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2916.asp>

## 0 引言

胰腺癌细胞能过度表达并分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), VEGF表达与胰腺癌的微血管数量、肿瘤的局部进展和肝脏转移密切相关, 高VEGF表达的患者预后不良<sup>[1-3]</sup>。我们构建反向携带VEGF<sub>165</sub>cDNA的重组腺病毒载体, 观察VEGF<sub>165</sub>反义核酸对胰腺癌裸鼠皮下种植瘤的生长及血管生成的影响, 为抗胰腺癌血管生成的基因治疗提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 含有513 bp的人全长VEGF<sub>165</sub>cDNA基因片断的质粒由长海医院心脏外科研究所黄盛东博士惠赠; 腺病毒表达载体试剂盒购自日本Takara公司; 限制性内切酶等各种工具酶购自BioLabs公司; 质粒纯化试剂盒和

RNA抽提试剂盒购自Qiagen公司; 胎牛血清购自Gibco公司; PCR引物由上海生工公司合成; VEGF ELISA试剂盒购自美国R&D公司; 免疫组化一抗购自福建迈新公司; EnVision 二步法免疫组化试剂盒购自Daco公司; 报告基因大肠杆菌Lac-Z重组腺病毒(Ad-LacZ)由长海医院心脏外科研究所董书强博士惠赠; 人胚肾细胞株293(ATCC CRL-1573)购自美国ATCC; 人胰腺癌细胞标准株SW1990为本院消化内科实验室保存并提供; 健康纯种SPF级BALB/C 6周龄♀裸鼠18只, 购自上海药物研究所实验中心。

**1.2 方法** 反义VEGF重组腺病毒(Ad- $\alpha$ VEGF)的制备方法见文献<sup>[4]</sup>。对数生长期拟传代的SW1990细胞, 消化重悬后用培养液调整细胞浓度为 $10^3$ /孔, 接种于96孔板。细胞分3组, 每组设3排平行复孔。用 $10^7$ PFU的Ad- $\alpha$ VEGF, Ad-LacZ各10  $\mu$ L (MOI = 100)加入各组的每孔细胞转染1 h, PBS作对照组。再分别加入培养液, 终体积为200  $\mu$ L。3, 5 d更换培养液。以转染当天为0 d, 以后各组每天取3孔, 吸除培养液, 加入MTT液15  $\mu$ L, 放入培养箱中孵化4 h。吸除MTT液, 加入DMSO 150  $\mu$ L, 振荡10 min后, 在96孔酶标仪570 nm处读取OA值。结果取均值。扩增VEGF<sub>165</sub>pBV220质粒, 碱裂解法抽提质粒, EcoRI/BamHI双酶切质粒DNA, 酶切产物10 g/L琼脂糖凝胶电泳后获得长度为513 bp的cDNA探针, 割胶回收, 最后电泳判断所得VEGFcDNA探针浓度为约10 mg/L, -20  $^{\circ}$ C保存备用。探针标记: 按随机引物标记盒说明书进行, 即1.5 mL离心管中加TE40  $\mu$ L, 探针5  $\mu$ L(约50 ng), 引物P1, P2各2  $\mu$ L, 离心混匀, 100  $^{\circ}$ C水浴变性5 min, 冰浴2 min, 转移到标记试管中, 混匀, 加入 $[\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP 5  $\mu$ L, 混匀, 37  $^{\circ}$ C水浴20 min, 加入0.2 mol/L的EDTA 5  $\mu$ L终止反应, 备用。

**1.2.1 反义VEGF对SW1990 VEGFmRNA表达的影响** 对数生长期拟传代的SW1990细胞, 消化重悬后按密度为 $2 \times 10^6$ 接种于15 cm的培养平皿中, 细胞过夜培养。用MOI = 100即 $10^9$ PFU的Ad- $\alpha$ VEGF 200  $\mu$ L转染细胞1 h后加入10 mL培养液。分别于1, 2, 3, 4, 5, 6 d消化、离心收集细胞沉淀液氮冷冻备RNA抽提。按Qiagen公司试剂盒说明行细胞总RNA抽提。制备含甲醛的10 g/L琼脂胶, 加入20 mg的样本总RNA, 电泳后转到尼龙膜, 55  $^{\circ}$ C预杂交6 h, 弃预杂交液, 加入杂交液, 将标记好的VEGF探针, 95  $^{\circ}$ C变性5 min, 加入杂交管中, 杂交18 h。洗膜后用X光片放射自显影, 经显影、定影、水洗后, 室温凉干, 计算机图像分析仪扫

描分析,测定各点杂交信号的面积和灰度,用同一样品的GAPDH杂交信号值作对照。

1.2.2 反义VEGF转染后SW1990细胞VEGF蛋白的表达 对数生长期拟传代的SW1990细胞,消化重悬后用培养液调整细胞浓度为 $1 \times 10^5$ /孔.接种于4块6孔板,加入培养液2 mL.细胞过夜培养,分3组,每组3孔.吸尽培养液,用100 MOI,即 $10^8$ PFU的Ad- $\alpha$ VEGF、Ad-LacZ各10  $\mu$ L转染细胞1 h后加入2 mL培养液,用100 mL/L的小牛血清RPMI1640培养液作对照组(mock infection).分别于3, 5, 7, 9 d收集培养上清.收集上清前36 h,吸除培养液,用2 mL无血清培养液洗3次,加入无血清培养液2 mL孵育6 h.吸除培养液,用2 mL无血清培养液洗1次.加入1 mL含20 mL/L小牛血清RPMI1640培养液孵育24 h.吸取上清液,放入Eppendorf管中-70  $^{\circ}$ C冻存.采用人VEGF ELISA检测试剂盒.严格按照试剂盒操作说明书进行,最后用Bio-Rad3550-UV型酶标仪在波长450 nm校正波长570 nm条件下读取OA值.样品VEGF浓度从VEGF标准曲线查得.结果取均值。

1.2.3 裸鼠皮下种植瘤模型实验 SW1990细胞数 $1 \times 10^{10}$ /L, 0.2 mL ( $5 \times 10^6$ )注射于18只6周龄裸鼠颈部皮下.种植瘤生长1 wk后,按裸鼠荷瘤体积的大小分为3部分,各部分间随机编号,用系统抽样法分为3组,每组各6只.分别为:PBS对照组、Ad-LacZ对照组和Ad- $\alpha$ VEGF治疗组.抽取经调整滴度为 $10^9$ PFU的重组腺病毒100  $\mu$ L,在肿瘤长径注射点处多方向瘤内注射,对照组注射等量的Ad-LacZ和PBS.隔日1次,共4次.转染1 mo后颈椎脱臼法处死裸鼠,切取肿瘤,常规病理切片,行CD31染色检测肿瘤的微血管密度。

**统计学处理** 实验数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,组内显著性检验采用 $t$ 检验,采用SPSS10.0软件实施统计。

## 2 结果

2.1 反义VEGF重组腺病毒对SW1990细胞表达VEGF的影响 按公式计算VEGFmRNA表达的相对量,即 $VEGFmRNA = (VEGFmRNA \text{ 杂交信号面积} \times \text{杂交信号灰度}) / (GAPDH \text{ 杂交信号面积} \times \text{杂交信号灰度})$ ,图像分析仪扫描杂交信号的密度(图1 A, B).结果表明,反义VEGF后转染3 d,肿瘤细胞内源性VEGFmRNA表达下降,4 d达高峰,5 d开始回升.使用美国R&D公司VEGF ELISA检测试剂盒定量检测肿瘤细胞分泌到培养上清中VEGF蛋白,(表1)。

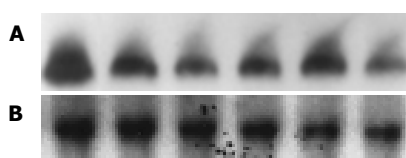


图1 Northern blot结果. A: VEGFmRNA; B: GAPDHmRNA.

表1 SW1990细胞上清的VEGF (ng/L for  $10^5$  cell/d,  $n = 3$ )

分组	第3d	第5d	第7d	第9d
Ad- $\alpha$ VEGF	633.3 $\pm$ 90.9	913.6 $\pm$ 65.4	652.0 $\pm$ 42.1	683.6 $\pm$ 33.6
Ad-LacZ	860.7 $\pm$ 72.2	1 515.7 $\pm$ 329.6	2 020.7 $\pm$ 126.5	2 346.7 $\pm$ 126.5
未转染组	813.0 $\pm$ 68.2	1 479.7 $\pm$ 92.1	1 903.7 $\pm$ 117.6	2 202.7 $\pm$ 37.6

2.2 反义VEGF对肿瘤体积增长速度的影响 瘤体内直接注射重组腺病毒,隔日用游标卡尺测量肿瘤的长、短径,按公式肿瘤体积=长径 $\times$ 短径 $^2 \times 0.4$ 计算肿瘤的体积.结果,治疗组和对照组的肿瘤体积均有增加,反义VEGF组比LacZ组、PBS对照组肿瘤增幅明显减少( $P < 0.01$ ,图2).LacZ组与PBS对照组之间无明显差异( $P > 0.05$ ).提示治疗组裸鼠肿瘤生长受到抑制。

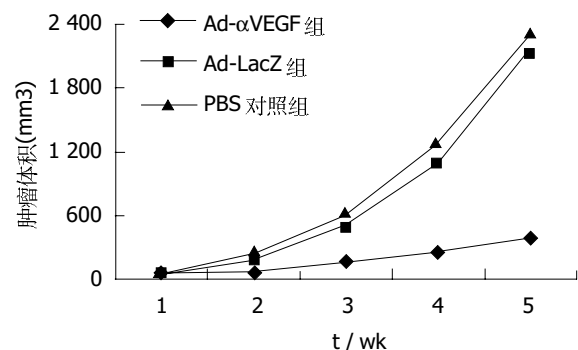


图2 肿瘤细胞裸鼠体内生长曲线。

2.3 反义VEGF对裸鼠肿瘤微血管生成的影响 CD31染色定位于血管内皮细胞,经免疫组化染色的微血管呈棕黄色,微血管计数参照Weidner *et al* [15]报道的方法. Ad- $\alpha$ VEGF组、LacZ组、PBS对照组肿瘤MVD分别为 $12 \pm 3$ ,  $26 \pm 5$ ,  $25 \pm 4$ ,反义VEGF组肿瘤微血管密度明显少于LacZ组和对照组( $P < 0.01$ ),LacZ组与对照组之间无明显差别( $P > 0.05$ ).

## 3 讨论

我们的前期研究已证实VEGF表达水平能反映胰腺癌细胞的恶性程度,可作为胰腺癌分化、转移与预后分析的指标[3].以VEGF及其受体为靶点的抗血管治疗是目前研究的一个热点,多项研究表明,阻断VEGF信号传导能抑制胰腺癌的发展、浸润和转移[6-8].反义RNA系将某种特异基因cDNA反向连接到质粒或病毒等表达载体上,导入肿瘤细胞后转录出反义RNA,他与相应信使RNA(mRNA)形成双链后阻止其翻译和表达,在mRNA水平阻断靶基因的表达[9-11].我们采用复制缺陷性腺病毒介导的反义核酸技术,探讨阻断VEGF的表达对胰腺癌的血管生成和肿瘤生长的影响。

MTT检测结果表明,转染Ad- $\alpha$ VEGF、Ad-LacZ和对照组细胞增生速度无明显差别,没有发现反义VEGF转染、LacZ转染对肿瘤细胞生长有抑制或促进作用,提示腺病毒转染反义VEGF和LacZ基因对SW1990



细胞的体外生长没有影响. 反义 VEGF 转染能否下调 SW1990 细胞表达 VEGF 是实验的关键. Northern blot 是定量检测 mRNA 的最常用方法. 实验结果表明反义 VEGF 能明显下调肿瘤细胞内源性 VEGF 的表达, 转染后 3、4 d 抑制作用达高峰. ELISA 结果在蛋白分泌水平上证实反义 VEGF 转染可以下调 SW1990 细胞分泌 VEGF 蛋白, 反义 VEGF 转染后, 肿瘤细胞培养上清中分泌型 VEGF 蛋白含量下降, 5-7 d 达最高点.

体内实验结果表明, 反义 VEGF 治疗组肿瘤的生长速度比 Ad-LacZ 对照组和 PBS 对照组明显减慢, 用 CD31 染色标记肿瘤内微血管, 发现反义 VEGF 治疗组瘤体内微血管密度明显少于对照组. 上述结果提示反义 VEGF 能通过抑制肿瘤细胞 VEGF mRNA 的表达, 肿瘤细胞内 VEGF 的蛋白表达和分泌减少, 其特异性促进血管内皮细胞有丝分裂的作用下降, 导肿瘤内血管生成受抑制, 肿瘤的生长减慢. 我们使用腺病毒介导的反义 VEGF 可以抑制胰腺癌种植瘤的血管生成和生长; 同时也说明, VEGF 可能是胰腺癌血管生成的主要调节因子, 缺少 VEGF 不能被其他血管生成因子, 如表皮生长因子或碱性成纤维细胞生长因子等所完全补偿. 本实验结果为今后继续开展胰腺癌的抗血管生成基因治疗奠定了基础.

#### 4 参考文献

- 1 Niedergethmann M, Hildenbrand R, Wostbrock B, Hartel M, Sturm JW, Richter A, Post S. High expression of vascular endothelial growth factor predicts early recurrence and poor prognosis after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas* 2002;25:122-129
- 2 Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y, Murakami M, Yamasaki S, Chayama K. Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas* 2003;26:344-349
- 3 邵成浩, 胡先贵, 刘延玲, 刘瑞, 张怡杰, 胡志浩, 唐岩, 曹贵松. 血管内皮生长因子在胰腺癌中表达及其临床意义. *中华肝胆外科杂志* 2001;7:546-548
- 4 邵成浩, 胡先贵, 刘瑞, 唐岩, 曹贵松, 黄盛东, 李白翎, 仲剑平. 腺病毒介导的反义血管内皮生长因子基因转染治疗胰腺癌的实验研究. *第二军医大学学报* 2002;23:995-998
- 5 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-1887
- 6 Baker CH, Solorzano CC, Fidler IJ. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2002;62:1996-2003
- 7 Buchler P, Reber HA, Ullrich A, Shiroiki M, Roth M, Buchler MW, Lavey RS, Friess H, Hines OJ. Pancreatic cancer growth is inhibited by blockade of VEGF-R11. *Surgery* 2003;134:772-782
- 8 Wei D, Wang L, He Y, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Res* 2004;64:2030-2038
- 9 Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:44-48
- 10 Gu S, Liu CJ, Qiao T, Sun XM, Chen LL, Zhang L. Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor 165 eukaryotic expression vector on proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:535-539
- 11 Forster Y, Meye A, Krause S, Schwenzer B. Antisense-mediated VEGF suppression in bladder and breast cancer cells. *Cancer Lett* 2004;212:95-103

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

• 消息 •

### *World Journal of Gastroenterology* 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求. WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用. WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切. 北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订. WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美.

### *World Journal of Gastroenterology* 电子版

《World Journal of Gastroenterology, WJG》网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于 2003-04-15 开通, 截止 2003-10-26 点击率已达 452392 人次. WJG 电子版由以下 7 个栏目组成. (1) 期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子. (2) 出版: 出版, 版权, 征订. (3) 投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式. (4) 新闻: IM 收录期刊、JCR 报道的影响因子. (5) 投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计 28 项. (6) 电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引. WJG 电子期刊功能包括 HTM、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等. (7) 参考文献链接: WJG 对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID 等内容正确性, 并与 PubMed 和 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp> 中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要.

# 安中饮治疗幽门螺杆菌相关性胃炎 30 例

姜国平, 盛建文, 方艳滨, 刘爱余, 徐友妹

姜国平, 江西中医学院附属医院消化内科 江西省南昌市 330006  
盛建文, 江西省宜春市人民医院消化内科 江西省宜春市 336000  
方艳滨, 刘爱余, 江西师范大学医院内科 江西省南昌市 330027  
徐友妹, 江西中医学院附属医院检验科 江西省南昌市 330006  
江西省卫生厅基金资助项目, No. 2002-A46  
项目负责人: 姜国平, 330006, 江西省南昌市八一大道 445 号, 江西中医学院附属医院消化内科, jgp0712@sina.com  
电话: 0791-6363357 传真: 0791-6363357  
收稿日期: 2004-09-24 接受日期: 2004-10-11

## 摘要

**目的:** 观察安中饮治疗幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)相关性胃炎的临床疗效以及对*H pylori*的根除率. 探讨安中饮对*H pylori*相关性胃炎血清胃泌素(Gas)、血浆生长抑素(SS)的影响.

**方法:** 选择确诊为*H pylori*感染非萎缩性胃炎患者 50 例随机分为 2 组, 中药治疗组 30 例, 西药对照组 20 例, 并设正常对照组 15 例. 中药治疗组口服安中饮, 疗程 4 wk 西药对照组口服丽珠得乐 4 wk 同时配服阿莫西林+呋喃唑酮 2 wk 停药 4 wk 分别观察两组临床疗效, *H pylori*根除率及血清 Gas、血浆 SS 水平.

**结果:** 中药治疗组临床症状有效率为 86.67%, 西药对照组为 75.00%, 两组对比差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 两组*H pylori*根除率分别为 63.33%、70.00%, 两组比较无显著性差异( $P > 0.05$ ). 中药治疗组、西药对照组患者治疗前血清 Gas 水平明显高于正常对照组( $P < 0.01$ ), 血浆 SS 明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ). 治疗后两组*H pylori*转阴者血清 Gas 水平降低( $P < 0.01$ )血浆 SS 水平升高( $P < 0.01$ ), 在*H pylori*未转阴的病例中, 中药治疗组对 Gas, SS 的影响较西药对照组明显( $P < 0.05$ ).

**结论:** 安中饮对*H pylori*相关性胃炎有较高的根除率, 对血 Gas、SS 的水平有较好的调节作用, 对*H pylori*相关性胃炎有良好的临床疗效.

姜国平, 盛建文, 方艳滨, 刘爱余, 徐友妹. 安中饮治疗幽门螺杆菌相关性胃炎 30 例. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2919-2921  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2919.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)相关性胃炎是临床常见病. 有大量研究表明, *H pylori*感染患者都具有血清胃泌素(Gas)上升和血浆生长抑素(SS)水平下降. 但目前西医对本病治疗仍以根除*H pylori*为主要手段, 采用二联、三联、四联疗法, 虽已取得良好的根除*H pylori*效果, 但不良反应较大, 耐药性普遍升高,

且费用昂贵. 为此, 探讨运用中医药治疗*H pylori*相关性胃炎无疑是有价值的. 我们旨在对安中饮进行疗效观察, 探讨其对血清胃泌素(Gas)、血浆生长抑素(SS)的影响, 以及对*H pylori*的根除率. 同时揭示安中饮治疗*H pylori*相关性胃炎的作用机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 入选病例 50 例来源于江西中医学院附属医院消化科门诊及住院患者. 所有病例均符合 1990 年悉尼世界胃肠病学大会确立的标准和 1995 年卫生部《中药新药临床研究指导(第二辑)》中慢性浅表性胃炎(非萎缩性胃炎)的诊断标准, 其中男性 31 例, 女性 19 例, 平均年龄 32.6 岁. 将 50 例患者随机分成中药治疗组 30 例、西药对照组 20 例, 并设正常对照组 15 名(自愿参加者、身体健康、体检正常、 $^{14}\text{C}$ -UBT 阴性, 仅空腹抽血查 Gas、SS). 中药治疗组、西药对照组之间, 患者的性别、年龄、病程长短、病情轻重比较, 经统计学处理, 无显著性差异  $P > 0.05$ ; 正常对照组与中药治疗组、西药对照组之间, 性别、年龄比较, 也无显著性差异  $P > 0.05$ ; 中药治疗组与西药对照组之间, 患者主要症状表现比较, 经统计学处理, 无显著性差异  $P > 0.05$ .

### 1.2 方法

**1.2.1 治疗方法** 中药治疗组口服安中饮, 基本药物有: 半夏 9 g、干姜 3 g、黄连 3 g、黄芩 9 g、香附 9 g、紫苏梗 6 g、党参 12 g、白芍 15 g、炙甘草 6 g、红枣 4 枚. 热象明显者加蒲公英 30 g, 湿邪偏重者加苍术 9 g、厚朴 9 g, 挟有食滞者加神曲 9 g、山楂 9 g, 炒麦芽 9 g, 每日 1 剂, 常规水煎, 分 2 次服, 共服 4 wk; 西药对照组口服丽珠得乐胶囊(珠海丽珠药业集团生产, No: 0106214)220 mg、2 次/d, 阿莫西林(珠海联邦药业公司生产, No: 0105526)0.5 g, 2 次/d, 呋喃唑酮 0.1 g, 2 次/d, 各服 2 wk.

**1.2.2 检测方法** 临床疗效观察: 中药治疗组治疗 4 wk, 西药对照组治疗 2 wk, 停药 4 wk 后分别观察其临床痊愈, 显效、有效、无效的患者数及总有效率, 疗效判定标准参照 1995 年卫生部《中药新药临床研究指导原则》(第二辑)制定的标准. *H pylori*根除率: 中药治疗组、西药对照组分别于停药 4 wk 后复查  $^{14}\text{C}$ -尿素呼气试验( $^{14}\text{C}$ -UBT),  $^{14}\text{C}$ -UBT 试验药盒购于深圳海得威生物科技有限公司, 检测仪器由深圳海得威生物有限公司和西安海拓科技总公司生产, 试验严格按照试验药盒上规定的步骤方法进行. 血清 Gas、血浆 SS 含量变化: 于治疗前和停药 4 wk 后分别空腹抽取静脉血 4 mL 检测

Gas、SS。Gas、SS 放免检测试剂盒购自北京海科锐生物技术中心,检测严格按照药盒规定方法进行。

1.2.3 诊断标准 参照1990年悉尼世界胃肠病学大会确立的标准与1995年卫生部《中药新药临床研究指导(第二辑)》的慢性浅表性胃炎(非萎缩性胃炎)的西医诊断标准。病程长,有与进食有关的上腹部疼痛以及其他上消化道症状;符合慢性浅表性胃炎(非萎缩性胃炎)的内镜诊断与活体组织检查; $H pylori$ 感染标准: $^{14}C$ -UBT 阳性。

临床症状分级:参照1995年卫生部《中药新药临床研究指导(第二辑)》,根据慢性胃炎的五大主症:胃脘疼痛、上腹胀、暖气、泛酸、纳呆食少,将症状分为0、1、2、3四级。0级:临床无任何症状。1级(轻度):胃脘疼痛较轻,持续时间短,不需服药;上腹胀在短时间内较甚;暖气时有发作,偶有吐酸;食欲稍差,饭量减少1/2以内。2级(中度):胃脘疼痛时间较长,每日超过4h,但尚能忍受;腹胀较甚,在较长时间内不缓解;暖气经常发作,引起两肋不适;饮食不慎既吐酸,食欲差,饭量减少1/2-2/3。3级(重度):胃脘疼痛较重,持续,需服药才能减轻;整日腹胀;频繁暖气,引起两肋疼痛,泛酸发作较频,难以忍受;无食欲,饭量减少2/3以上。

1.2.4 临床疗效标准 痊愈:主要症状进步2级以上或达到0级,其他上消化道症状消失;显效:主要症状进步2级,其他上消化道症状部分消失;有效:主要症状进步1级,其他上消化道症状仍有;无效:所有症状无进步或反而加重。停药4wk后 $^{14}C$ -UBT 阴性,表示 $H pylori$ 根除。

统计学处理 测定值以均数 $\pm$ 标准差mean $\pm$ SD表示,等级资料用Ridit分析,计数资料用 $\chi^2$ 检验,分组资料计量指标及治疗前后配对资料用 $t$ 检验或方差分析。统计资料采用SPSS 10.0统计软件处理。 $P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 临床疗效比较 治疗后中药治疗组明显优于西药对照组,差异有显著性意义( $P<0.05$ )(表1)。

表1 治疗后两组疗效比较

组别	<i>n</i>	治愈	显效	有效	无效	总有效率(%)
中药治疗组	30	12	8	6	4	86.67
西药对照组	20	7	4	4	5	75.00

Ridit 检验,  $P<0.05$ 。

表4 停药4wk后两组 Gas、SS的变化(ng/L, mean $\pm$ SD)

组别	<i>n</i>	Gas		SS	
		$H pylori$ 阳性( <i>n</i> )	$H pylori$ 阴性( <i>n</i> )	$H pylori$ 阳性( <i>n</i> )	$H pylori$ 阴性( <i>n</i> )
中药治疗组	30	88.72 $\pm$ 8.23 (11) <sup>a</sup>	61.25 $\pm$ 7.27 (19)	17.42 $\pm$ 2.16 (11) <sup>a</sup>	23.46 $\pm$ 2.32 (19)
西药对照组	20	109.78 $\pm$ 12.56 (6)	69.75 $\pm$ 7.68 (14)	10.35 $\pm$ 1.27 (6)	21.64 $\pm$ 2.39 (14)

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 西药对照组。

2.2  $H pylori$ 根除率比较 中药治疗组与西药对照组的 $H pylori$ 根除率无明显差异( $P>0.05$ )(表2)。

表2 两组 $H pylori$ 根除率比较

组别	治疗前 $H pylori$ 阳性 <i>n</i>	停药4wk后 $H pylori$ 阳性 <i>n</i>	$H pylori$ 转阴 <i>n</i>	根除率(%)
中药治疗组	30	11	19	63.33
西药对照组	20	6	14	70.00

$\chi^2$  检验,  $P>0.05$

2.3 Gas、SS 的变化 治疗前中药治疗组、西药对照组的血 Gas 均高于正常对照组,SS 均低于正常对照组,差异有极显著性意义( $P<0.01$ ),中、西药组之间无显著性差异( $P>0.05$ )。以上结果(表3)。

表3 治疗前各组 Gas、SS 的变化(ng/L, mean $\pm$ SD)

组别	Gas	SS
中药治疗组	121.32 $\pm$ 15.45	10.12 $\pm$ 1.65
西药对照组	117.52 $\pm$ 13.26 <sup>a</sup>	9.84 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>
正常对照组	62.50 $\pm$ 7.38 <sup>b</sup>	22.47 $\pm$ 2.25 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P>0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 中药治疗组。

2.4 停药4wk后,中药治疗组、西药对照组, $H pylori$ 阴性者血 Gas 较治疗前均显著下降,SS 均显著上升( $P<0.01$ ),在 $H pylori$ 维持阳性的患者中,中药治疗组血 Gas 也较明显下降,SS 较明显上升( $P<0.05$ )。而西药对照组则与治疗前相比,无明显变化( $P>0.05$ )。以上结果(表4)。

2.5 临床主要症状变化 与西药对照组比较,中药治疗组对上腹胀、暖气、纳呆食少等症状改善均优于对照组,差异有显著性意义( $P<0.05$ )。以上结果(表5)。

表5 两组主要症状变化比较(% 例)

症状	中药治疗组	西药对照组
胃脘痛	82.61 (19/23)	81.25 (13/16)
上腹胀	81.25 (13/16) <sup>a</sup>	60.00 (6/10)
泛酸	83.33 (10/12)	88.89 (8/9)
暖气	84.62 (11/13) <sup>a</sup>	63.64 (7/11)
纳呆食少	80.77 (21/26) <sup>a</sup>	58.82 (10/17)

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 西药对照组。

### 3 讨论

*H pylori*相关性胃炎归属于中医“胃痛”、“痞满”，其发病机制不出本虚标实两端，脾胃虚弱、正气不足为其本，气滞、血瘀、热郁，湿阻为其标<sup>[1]</sup>。姜惟<sup>[2]</sup>认为外感六淫(以湿热为主)，内伤情志及饮食失宜，诸因素相互作用，导致脾胃升降失职。冀爱英<sup>[3]</sup>认为本病辨证虽有寒、热、虚、实之分，但总的病理机制是脾胃升降失调，且虚实夹杂、寒热互见者最为多见。总之，中医认为 *H pylori*相关性胃炎的发病与脾虚、湿热、瘀毒(*H pylori*感染)有关。有大量研究资料表明 *H pylori*感染能影响一些胃肠激素的合成、分泌和释放，导致胃酸分泌增多，黏膜的防御能力减弱，破坏损伤因子与防御因子之间的平衡。在众多的胃肠激素中，多数学者认为 *H pylori*感染与胃泌素和生长抑素的关系最为密切。徐军全<sup>et al</sup><sup>[4]</sup>通过研究认为血及胃窦黏膜 Gas、SS 变化可能在胃病发病中起重要作用。*H pylori*感染可扰乱 Gas、SS 和胃酸之间的平衡。有学者<sup>[5]</sup>提出 *H pylori*感染损伤了胃泌素释放蛋白(GRP)介导的对胃酸分泌的抑制性调节机制，使对 GRP 刺激的反应增强或生长抑素对G细胞的抑制减弱。刘举珍<sup>et al</sup><sup>[6]</sup>检测168例门诊行胃镜检查患者的胃泌素浓度，发现 *H pylori*感染阳性患者血清胃泌素水平明显高于未感染者，提示 *H pylori*引起血清胃泌素增高进而造成胃酸分泌增多，可能为 *H pylori*感染致病机制之一。聂昭华<sup>et al</sup><sup>[7]</sup>通过实验研究证实 *H pylori*感染患者血清 Gas 释放增强的同时还伴有血浆及胃液 SS 含量下降，而随着 *H pylori*的根除，血清 Gas 含量下降，血浆和胃液 SS 含量上升。

目前西药治疗 *H pylori*相关性胃炎的重点仍在 *H pylori*的根除上。2000-05 的《全国慢性胃炎研讨会共识意见》对 *H pylori*相关性胃炎患者行 *H pylori*根除疗法的指征作了明确的规定：(1)有明显异常(指胃黏膜糜烂、中-重度肠组织转化、不典型增生)的慢性胃炎；(2)有胃癌家族史者；(3)伴有糜烂性十二指肠炎者；(4)消化不良症状经常规治疗疗效差者<sup>[8]</sup>。根除 *H pylori*的方案

很多，但药物不外乎铋剂、抑酸剂(质子泵抑制剂 PPI 和 H<sub>2</sub>受体拮抗剂 H<sub>2</sub>RA)及抗菌药。张大真<sup>et al</sup><sup>[9]</sup>对 5 a 根除 *H pylori*治疗方案进行集成分析，发现抑酸药(PPI, H<sub>2</sub>RA)与两种抗菌药联用，其根除率接近或超过 90%。还有许多其他组合对 *H pylori*均有较高的根除率。但牛华珍<sup>et al</sup><sup>[10]</sup>认为西药治疗的缺陷也是不容忽视的，突出表现在：不良反应相对较大，作用时间短，停药可复发及症状改善不如中药。因此，探索运用中医药治疗 *H pylori*相关性胃炎的新途径无疑是有价值的。

安中饮方，由半夏泻心汤、香苏散和芍药甘草汤加减化裁而成。方中半夏、干姜辛温燥湿；黄连、黄芩苦寒清热；党参、甘草、大枣益气和缓；紫苏梗、香附理气和胃；芍药、甘草柔肝缓急止痛。诸药配伍寒热并用、升降同施、动静结合、润燥相济、补泻共进，从而使脾胃和，寒热调，升降顺，其功效正好切中本病脾胃不和，升降失调，虚实并见，寒热夹杂之病机，故用之自然奏效。其作用机制，可能与本方能有效地抑杀 *H pylori*，直接调节血 Cas、SS 水平有关。

### 4 参考文献

- 1 单兆伟. 医苑摘英话仓廩. 江苏中医 1997;18:3-4
- 2 姜惟. 论辛开苦降是治疗 *Hp* 相关性胃炎的重要法则. 辽宁中医杂志 2001;28:5-6
- 3 冀爱英. 半夏泻心胶囊治疗幽门螺杆菌相关性胃炎疗效观察. 河南中医 1998;18:209
- 4 徐军全, 李秋萍, 高立志, 安景禄. 联合测定胃病患者血浆及胃窦黏膜胃泌素生长抑素的意义研究. 山西医药杂志 1998;27:17-19
- 5 Odum L, Petersen HD, Andersen IB, Hansen BF, Rehfeld JF. Gastrin and somatostatin in *Helicobacter pylori* infected antral mucosa. Gut 1994;35:615-618
- 6 刘举珍, 赵新民, 薛世平. 幽门螺杆菌感染时血清胃泌素水平变化观察. 内蒙古医学杂志 2001;33:307
- 7 聂昭华, 郑文尧, 郭荣斌. 根除幽门螺杆菌前后消化性溃疡患者胃窦黏膜组织学及胃泌素、生长抑素、表皮生长因子等相关变化的初探. 中华消化杂志 1996;16:294-295
- 8 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
- 9 张大真, 李增烈. 中国幽门螺杆菌感染治疗的集成分析. 临床消化病杂志 2000;12:99-101
- 10 牛华珍, 王汝新, 兰少敏, 许文莉. 慢性胃炎中西医结合诊治的思路与方法. 山东中医杂志 2001;20:70-72

# 手助腹腔镜结直肠癌根治术

范应方, 黄宗海, 方驰华

范应方, 黄宗海, 方驰华, 南方医科大学附属珠江医院普通外科 广东省广州市 510282

项目负责人: 范应方, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学附属珠江医院普通外科.

电话: 020-61643213

收稿日期: 2004-10-15 接受日期: 2004-10-22

## 摘要

**目的:** 探讨手助腹腔镜结直肠癌根治术的临床效果.

**方法:** 应用手助腹腔镜技术(HALS)对27例结直肠癌患者行结直肠癌根治术.

**结果:** 手术全部成功, 无并发症及中转开腹手术. 手术时间 90-260 min, 平均 140 min, 术中出血 50-200 mL, 平均 110 mL. 术后患者疼痛轻, 病理检查淋巴结清扫及切除范围满意. 肠道功能恢复时间 24-60 h, 平均 28 h, 住院时间 3-10 d, 平均住院时间 6.5 d, 无近期复发及穿刺孔或切口种植.

**结论:** 手助腹腔镜结直肠癌根治具有微创、安全、术后恢复快、肿瘤根治彻底等优点, 值得临床推广应用.

范应方, 黄宗海, 方驰华. 手助腹腔镜结直肠癌根治术. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2922-2923

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2922.asp>

## 0 引言

腹腔镜技术应用于结直肠癌根治经过十余年的发展, 已经能完成腹腔镜下结直肠癌根治术, 达到微创、美观及术后恢复快的良好效果. 但因为标准腹腔镜下结直肠手术难度高、危险性大、耗时长、并且要求术者有较高的腹腔镜操作技巧, 因而发展缓慢. 手助腹腔镜手术(Hand-Assisted Laparoscopic Surgery, HALS)是 90 年代中期发展起来的新技术, 随着经验技术的不断积累和专用器械的更新应用, HALS 在腹部外科的应用日益广泛. 我院 2003-01/2004-05 采用美国强生公司的蓝碟(Lapdisc)手助系统, 通过 HALS 完成结直肠切除术 27 例, 效果满意, 报告如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 结直肠癌患者 27 例, 男 16 例, 女 11 例, 年龄 48-82 岁, 平均年龄 64 岁. 入院前分别存在腹胀、腹痛、黏液血便、排便不尽感等症状, 经纤维结肠镜检查并活检病理切片确诊. 其中升结肠癌 4 例, 横结肠癌 2 例, 降结肠癌 4 例, 乙状结肠癌 4 例, 直肠癌 13 例. 肿瘤直径 1.0-3.6 cm, 高分化腺癌 8 例, 中分化 7 例, 低分化 12 例. 肿瘤属 Dukes B<sub>1</sub> 期 7 例, B<sub>2</sub> 期 14 例, C 期 6 例. 行右半结肠根治切除 4 例, 左半结肠根治切除 4 例, 横结肠根治切除 2 例, Dixon 术 10 例, Miles 术

9 例. 急诊手术 7 例, 择期手术 20 例.

### 1.2 方法

**1.2.1 手助切口的选择及 Lapdisc 的安置** 左、右半结肠癌根治术手助切口选择左、右中上腹部经腹直肌切口, 也可选择上腹正中切口, 横结肠切除选上腹正中切口, Dixon 和 Miles 术选择左下腹经腹直肌切口、旁正中切口或“反麦氏切口”, 切口长 6.0-7.0 cm. 手助切口位置确定后, 在相应的左或右侧选择合适的 Trocar 孔, 置入腹腔镜、超声刀及抓钳. 顺时针方向上提旋开 Lapdisc 的聚硅酮瓣膜环, 直视下将环的腹腔内部分(内套)经切口置入腹腔, 确保紧贴壁层腹膜而没有卡压腹腔内脏器. 术者非优势手戴吸光的贝朗手套或普通手套、涂抹液体石蜡, 经环口伸入腹腔, 顺时针下压旋紧瓣膜环, 即可建立手臂进出腹腔的密闭通道.

**1.2.2 手术操作** 根据病变部位, 调整手术台的倾斜度, 选择相应的体位. 重新建立气腹, 腹腔镜下结合手的牵拉、触摸确定肿瘤的大小、位置、与周围脏器的粘连程度. 对于小的肿瘤, 术中配合纤维结肠镜定位, 上钛夹标记. 手助下用布带结扎肿瘤上、下方肠管, 按先外围、后中间的原则进行分离. 辅助手牵拉肠管, 显露要剥离的系膜组织, 超声刀或电凝钩先沿侧腹膜分离, 游离完一侧后转向对侧, 游离过程中注意勿损伤后腹膜输尿管、肾血管, 卵巢血管等结构. 对于直径 3 mm 以下的血管均可经超声刀切割凝固, 大的血管在手指钝性分离、触摸引导下上钛夹夹闭后离断, 也可在手辅助腹腔内丝线打结后离断. 对于系膜根部血管, 还可以暂时退出 Lapdisc, 消除气腹, 经手助切口直视下上血管钳离断, 丝线打结. 病变肠管游离足够长度后, 肠管折叠套入无菌手套经 Lapdisc 环口拉出腹腔外, 纱布垫保护切口, 完成肠切除及肠吻合, 吻合后送回腹腔, 直视下或腹腔镜下关闭系膜裂孔. Dixon 术先用 End-Gia 切割封闭病变远端直肠, 将乙状结肠和病变直肠经切口拖出腹腔, 在腹腔外切除部分乙状结肠, 近端置入吻合器钉座, 荷包缝合后还纳腹腔, 经肛门伸入吻合器激发完成肠吻合, 含 5 氟尿嘧啶(5-FU)温蒸馏水冲洗创面, 腹腔镜下缝合系膜裂孔. Miles 术则在体外切断病变近端乙状结肠, 远端肠管结扎后置无菌手套或避孕套, 直视下经会阴切口拖出, 含 5-FU 温蒸馏水冲洗创面, 腹腔镜下缝合系膜裂孔, 近端乙状结肠在手助切口旁造口固定.

## 2 结果

所有手术均顺利完成, 无 1 例中转开腹, 手术时间 90-

260 min, 平均 140 min, 术中出血 50–200 mL, 平均 110 mL. 术后病理检查显示无切源肿瘤残留, 切除淋巴结包括肿瘤旁、肠管纵轴及系膜内, 清扫淋巴结 6–15 颗. 全组无死亡及吻合口漏等术后并发症. 术后切口疼痛较传统手术明显减轻, 肠道功能恢复时间 24–60 h, 平均 28 h, 次日即可下床活动, 平均住院时间 6.5 d. 全部患者术后随访至今, 未见切口种植复发.

### 3 讨论

**3.1 腹腔镜结直肠切除术的现状** 腹腔镜手术以创伤小、恢复快等优点在腹部外科得到广泛的应用, 但自 1990 年 Fowler 和 Jacobs 率先完成腹腔镜乙状结肠切除术以来, 腹腔镜结直肠癌根治术在国内外均进展缓慢, 难以如腹腔镜胆囊切除术(LC)一样临床普及应用. 其原因主要有以下几个方面: (1)失去手的触觉反馈, 在二维图象下手术, 操作更困难, 技巧更复杂, 对医生的要求高; (2)专用器械昂贵, 手术时间与费用增加; (3)标本需粉碎取出体外, 不利于肿瘤病理分期和切缘情况的判断; (4)由于缺乏大宗的前瞻性随机研究及回顾性分析, 对腹腔镜下能否达到根治切除、淋巴结清扫的彻底程度、术中无瘤操作技术、切口的肿瘤种植和术后复发等存在疑虑和争议, 病例的选择也限于直肠外的大肠良性病变或早期大肠癌的切除. 但随着手术技巧的提高、腹腔镜新器械的发展, 尤其是超声刀的应用, 腹腔镜结直肠切除已逐渐成为继 LC 术后临床推广的复杂手术之一, 适应证也逐渐扩大.

肿瘤的根治取决于肿瘤分化程度、病理分期、手术切除范围、术中无瘤操作技术、术后综合治疗等因素, 就腹腔镜手术而言, 对于深部组织的良好照射、放大效应及准确操作, 甚至优于传统手术, 可确保病灶的彻底切除和淋巴结的清扫. 已有研究表明腹腔镜手术切除标本长度、切除范围、淋巴结清扫数量与常规手术无显著差异<sup>[1]</sup>. Hartley *et al* 随访研究表明, 与传统手术相比, 两者在术后复发率、切口或 Trocar 种植转移及生存率方面无显著差异<sup>[2]</sup>. 目前欧美国家正在进行多中心前瞻性随机腹腔镜与开腹手术对比的临床研究<sup>[3]</sup>, 对于腹腔镜技术在结直肠切除术中的地位不久将有结论, 国内这方面的工作也正在开展<sup>[4]</sup>.

**3.2 HALS 的优点** 90 年代中期, HALS 的出现, 保留微创优势的同时, 大大降低了一些标准腹腔镜手术的难度, 使得先前腹腔镜下难以完成的复杂手术得以完成. 而且提高了手术安全性、减少了手术时间、节约了费用, 缩短了外科医生的学习过程, 迅速推动了腹腔镜技术在腹部外科的发展<sup>[5–6]</sup>. 美国 FDA 初步研究结果显示: HALS 结直肠切除术与标准腹腔镜结直肠切除一样安全, 术后恢复时间相同, 中转开腹率无差异, 但所需器械更少, 时间更短, 认为 HALS 保留微创的优势, 利于医生完成更复杂的手术.

HALS 术恢复了手的触觉, 使外科医生重新回到熟悉的三维空间下操作. 手的灵巧运用, 可快速牵拉脏

器, 协助暴露; 可以钝性分离, 也可引导超声刀或剪刀定位准确地锐性分离; 可根据血管搏动确定血管根部位置; 通过对淋巴结的触摸可协助淋巴结的清扫; 对未突破浆膜层的小的肿瘤术中可通过触摸定位, 准确切除病变肠管; 可方便的控制术中出血, 避免盲目钳夹损伤其他脏器, 减少了中转开腹, 提高了手术安全性.

我科在引进手助系统之前, 也进行了标准腹腔镜结肠肿瘤切除, 但由于缺乏专用器械和操作技巧的限制, 例数有限. 2003 年始先后引进了 Hand-port 和 Lapdisc 两种手助系统, 已经顺利开展了胃癌根治、肝癌部分切除及肝血管瘤切除、结直肠癌根治、胰十二指肠肠切除等复杂手术. Hand-port 系统需带专用长袖手套及卡压环, 底座需充气, 占用操作空间, 而且可能被操作器械损伤, 而 Lapdisc 系统仅旋转聚硅酮瓣膜环即可建立密闭通道, 辅助手进出方便, 腹腔内操作空间大. 本组 27 例患者经 Lapdisc 系统行结直肠切除, 手术时间较开腹手术无明显延长, 术后肠道功能恢复早, 早期活动时间短, 切口疼痛轻, 仅 3 例 Miles 术患者术后使用了止痛药, 无吻合口漏和心肺功能不全等并发症, 充分体现了微创的优越性. HALS 结直肠根治术在常规器械下操作即可完成, 本组仅 5 例 Dixon 术使用了 End-Gia 切割缝合器, 其余均在体外完成肠切除及肠吻合, 对于系膜根部血管, 甚至可以通过手助切口直视下常规丝线结扎离断, 无须使用钛夹, 节约了费用, 与单纯腹腔镜手术相比具有更好的成本-效益比. 手术时间的缩短也给术前伴有心肺功能不全、高血压、糖尿病等不能耐受长时间手术的高龄患者创造了手术机会, 本组患者 70 岁以上 7 例, 术后均恢复理想, 无一例并发症发生.

肿瘤的根治程度、切口或 Trocar 孔种植转移及腹腔内癌细胞脱落种植转移一直限制着腹腔镜结直肠根治术的发展. 我们认为, 术中遵循无瘤操作原则, 切除长度足够、清扫彻底、保护切口、减少器械与腹腔内其他脏器接触、术后冲洗彻底等, 上述问题将不再成为限制 HALS 结直肠根治术发展的瓶颈. 在严格掌握适应证的基础上, 随着术者经验的积累和手术技巧的提高, HALS 结直肠根治术会更加成熟, 将有广阔的应用前景.

### 4 参考文献

- 1 Meijer DW, Bannenberg JJ, Jakimowicz JJ. Hand-assisted laparoscopic surgery: an overview. *Surg Endosc* 2000;14:891-895
- 2 Hartley JE, Mehigan BJ, MacDonald AW, Lee PW, Monson JR. Patterns of recurrence and survival after laparoscopic and conventional resections for colorectal carcinoma. *Ann Surg* 2000;232:181-186
- 3 HALS Study Group. Hand-assisted laparoscopic surgery vs standard laparoscopic surgery for colorectal disease: a prospective randomized trial. *Surg Endosc* 2000;14:896-901
- 4 田文, 李荣, 陈凇, 肖西平, 杨莉, 纪文斌, 江朝光. 手助腹腔镜的结直肠癌根治术. *中华外科杂志* 2003;41:70-71
- 5 Hanna GB, Elamass M, Cuschieri A. Ergonomics of hand-assisted laparoscopic surgery. *Semin Laparosc Surg* 2001;8:92-95
- 6 Nakajima K, Milsom JW, Margolin DA, Szilagyi EJ. Use of the surgical towel in colorectal hand-assisted laparoscopic surgery (HALS). *Surg Endosc* 2004;18:552-553

# 内镜热极治疗胃肠道息肉 68 例

夏燕妮, 陈仙琼, 赖敏, 黄长炎, 梁宝泉

夏燕妮, 陈仙琼, 赖敏, 黄长炎, 梁宝泉, 恩施市中心医院消化内科  
湖北省恩施市 445000  
项目负责人: 夏燕妮, 445000, 湖北省恩施市航空路 88 号, 恩施市中心医院  
消化内科.  
电话: 0718-8221011 传真: 0718-8224304  
收稿日期: 2004-07-23 接受日期: 2004-08-21

## 摘要

**目的:** 了解内镜热极治疗胃肠道息肉的临床效果。

**方法:** 常规术前准备, 行胃镜及结肠镜检查。热极仪温度根据息肉大小可调至 200–250 °C, 治疗时充分暴露病灶, 热极头通过内镜活检孔, 对准靶目标通电, 通过热极头对病灶“顶、贴、滑、扫”等方法, 借助内镜同步进退和转动热极头等措施进行治疗。

**结果:** 68 例 126 颗息肉热极治疗均从局部消失, 其中无蒂息肉、直径 < 1.5 cm 中小型息肉效果好, 均经一次治疗, 1–13 s (平均 8 s) 消失, 直径 2.0 cm 左右的息肉需经 2–3 次治疗, 息肉才完全消失, 全部病例无一例穿孔、出血等并发症发生。

**结论:** 热极治疗息肉效果肯定, 安全可靠; 热极头不粘连组织, 不损伤内镜, 经济适用。

夏燕妮, 陈仙琼, 赖敏, 黄长炎, 梁宝泉. 内镜热极治疗胃肠道息肉 68 例. 世界华人消化杂志 2004; 12(12): 2924–2925  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2924.asp>

## 0 引言

我院 1998–06/2003–12 用 HP – A 型内镜热极治疗仪 (又名热探头), 在胃、结肠镜下行热凝治疗食管、胃、十二指肠、大肠息肉共 68 例 126 颗, 现报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 5 a 多来我院门诊及住院患者 68 例, 均以腹痛和/或腹胀和/或便血就诊接受胃肠镜检查, 发现并经病理证实为息肉者。男 46 例, 女 22 例, 年龄 18–76 (平均 41) 岁。息肉在食管 4 例, 占 5.8%, 4 颗, 胃 18 例, 占 26.5%, 26 颗; 十二指肠 5 例, 占 7.5%, 11 颗, 大肠 41 例, 占 60.2%, 85 颗。单发 45 例, 多发 23 例。息肉直径 0.5 cm 以下 38 颗, 0.6–1.0 cm 46 颗, 1.1–1.5 cm 22 颗, 1.6–2.0 cm 11 颗, 2.1–3 cm 9 颗 (其中 3 cm 2 颗)。息肉无蒂 73 颗, 亚蒂 30 颗, 有蒂 23 颗。腺瘤性息肉 89 颗, 化生性息肉 5 颗, 炎症性息肉 22 颗, 血吸虫卵性息肉 6 颗, 良性淋巴样息肉 4 颗。HP-A 型

热极治疗仪由中国人民解放军第二军医大学数理教研室医学工程研究室提供, 其热极头直径 2.4 mm, 由 24V 电压供电, 功率 10 W 左右, 热极头温度在室温 – 250 °C 内任意选择。内镜: Olympus GIF-Q20 纤维胃镜, Pentax FC-38LH 纤维结肠镜。显像仪: FF-99 型光电子内窥镜显像仪, 配有录像机。

**1.2 方法** 按常规术前准备, 行胃镜及结肠镜检查。治疗前, 先将热极头预热数秒钟, 在体外测试正常。治疗时充分暴露病灶, 将热极头经内镜活检孔插入, 直至热极头露出物镜 1 cm 以上, 对准靶目标通电, 通过热极头对病灶“顶、贴、滑、扫”等方法和借助内镜同步进退和转动热极头等措施进行治疗。治疗息肉, 将热极仪温控调至 200 °C, 通电后见黏膜烧灼成白色及白烟雾产生即可, 对较大的息肉, 温度可调至 250 °C, 反复烧灼直至息肉消失或变成苍白色, 若一次治疗不能彻底消除, 可在每次治疗后间隔 7 d 再行第二次、第三次治疗, 直到息肉完全消失, 对有蒂息肉, 可在蒂基底部烧灼, 直至息肉蒂变成苍白色或息肉由红色变成暗红色, 无需息肉体当即脱落。

## 2 结果

68 例 126 颗息肉经热极治疗均从局部消失, 尤其无蒂息肉、直径在 1.5 cm 以下的中小型息肉, 疗效理想, 均经一次治疗, 1–13 s (平均 8 s) 消失, 直径在 2.0 cm 左右的息肉需 2–3 次治疗, 息肉才完全消失。术后病变组织发白、趋于平坦或病变组织被黑褐色炭化组织附着。62 例 108 颗息肉接受复查, 其中 1 mo 后复查者见局部平坦, 色泽稍红, 病变部位可辨, 2 mo 后复查者黏膜基本正常, 病变部位难以辨认, 较大的息肉病变部位仍然可见, 黏膜表面欠光滑。所有病例术中未述不适, 5 例术后腹部疼痛有所加重, 经治疗迅速缓解, 无一例穿孔、出血等并发症发生。

## 3 讨论

国外热极治疗价格昂贵, 难为我国消化内镜界接受。HP-A 型热极治疗仪是由中国人民解放军第二军医大学研制, 主机把 220V 交流电预先变压成 24V 交流电, 然后以此低电压作为发热电源使热极头温度从室温迅速上升, 最高达 250 °C, 然后利用相对恒温发热的热极头的热传导、热辐射和接触性压迫作用来对息肉实施热凝、烧灼、气化、炭化而达到有效的治疗目的。组织凝固、炭化的程度与每次治疗持续的时间呈正比。总结 5 a 多来热极治疗息肉效果肯

定. 我们治疗息肉 68 例, 5 例术后腹部疼痛加重, 经治疗迅速缓解, 无一例出现穿孔. 有两例息肉直径为 3 cm 的患者, 均经过三次治疗, 虽然治疗面积大, 除在术后感腹部疼痛有所加剧外, 未述其他不适, 三次治疗结束后, 半月内镜复查见 1.5 cm × 2.0 cm 左右浅表溃疡, 经口服洛赛克、思密达、阿莫西林 2 wk, 2 mo 后再次复查溃疡面消失, 仅见黏膜欠光滑. 另外 1 例 76 岁的老年患者, 因冠心病安有心脏起搏器, 在热极治疗的术中、术后未述不适, ECG 检查无异常. 由于热极头涂有防粘连剂(四氟乙

烯), 没有发生因热极头粘连组织、牵拉、焦痂脱离所致继发性出血、穿孔, 而激光、微波易与病变组织产生粘连出现并发症. 热极线缆无热辐射, 不会引起内镜老化, 热极头光滑、圆钝不会损伤内镜内检管道. 该机使用方便, 无需象高频电需外接电极板, 体积小, 重量轻(≤ 4.5 kg)搬运方便, 而且价格低, 明显低于 Nd:YAG 激光治疗仪、微波治疗仪、高频电治疗仪. 不足之处是对于较大息肉处理相对较困难, 需经多次治疗, 无高频电及 Nd:YAG 激光的切割功能. 由于病例不是很多, 还有待进一步观察及总结.

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

• 临床经验 •

## 结肠镜常规检查回肠 1340 例

唐井钢, 高 飞, 李 娟

唐井钢, 李娟, 广州南方医院中医科 广东省广州市 510515  
高飞, 中国人民解放军 260 医院 河北省石家庄市 050041  
项目负责人: 唐井钢, 510515, 广东省广州市广州大道北, 南方医院中医科.  
wjg@wjgnet.com  
电话: 020-61365870 传真: 020-61365870  
收稿日期: 2004-07-05 接受日期: 2004-09-09

### 摘要

**目的:** 评价经结肠镜常规检查回肠的临床价值, 提高对回肠疾病的诊断与治疗水平.

**方法:** 结肠镜到达回盲部后采用直接进入法、钩拉进入法、导丝引导进入法插镜至回肠 20-70 cm, 观察回肠黏膜病变.

**结果:** 1340 例患者 1240 例成功插入回肠, 成功率为 92.5%, 244 例发现了病变, 总阳性率为 19.7%.

**结论:** 在小肠镜还未推广使用的情况下, 结肠镜常规深插对发现回肠末端疾病很有意义.

唐井钢, 高飞, 李娟. 结肠镜常规检查回肠 1340 例. 世界华人消化杂志 2004; 12(12):2925-2926

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2925.asp>

### 0 引言

回肠末段是小肠疾病的好发部位, 随着电子内窥镜广泛应用和检查技术不断提高, 采用中长型结肠镜经回盲瓣插入回肠末段检查, 近年来已成为部分医院的结肠镜常规检查部位. 我科近年用 Olympus XQ240 型结肠镜在检查全结肠的基础上常规深插检查回肠末段, 对

回肠末段疾病有了新的直观的认识, 现总结报告如下.

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 病例为解放军 260 医院 2003-01/12 门诊及住院患者, 男性 742 例, 女性 498 例, 年龄 14-86 岁, 平均年龄为 46.1 岁, 临床症状表现为腹痛、腹泻、血便、黏液便、腹部包块、便秘等.

**1.2 方法** 常规方法插入结肠镜, 整个插入过程少注气、多吸气, 根据情况变换体位, 助手协助腹壁加压, 熟练运用钩拉和旋转手法, 一般距肛门 50-80 cm 可达回盲部. 达回盲找到回盲瓣位于阑尾口视野左上方. 根据回盲瓣形态, 选择如下进镜法: (1) 直接进镜法: 取直镜身后在回盲瓣开放与半开放情况下, 镜头对准开口中心直接插入. (2) 回拉滑入进镜法: 看清回盲瓣后将镜头送至回盲瓣前方, 调整旋钮使镜头向下弯曲看清开口为止, 回拉镜身使结肠镜滑入回肠. (3) 支撑引导进镜法在回盲瓣挛缩时可采用此法, 利用活检钳或胆道导丝先插入回肠, 引导镜身插入.

### 2 结果

**2.1 正常回肠黏膜镜下表现** 肠腔变狭窄呈圆锥型, 黏膜橘红表面呈绒毛状, 继续进镜可见稀疏、细浅的环形皱襞, 颜色变淡, 可见散在大小不等颗粒或结节状淋巴滤泡, 少数密集呈簇. 1240 例成功插入回肠, 100 例插入失败, 失败原因见表 1.

**2.2 回肠疾病诊断结果 (表 2).**



定. 我们治疗息肉 68 例, 5 例术后腹部疼痛加重, 经治疗迅速缓解, 无一例出现穿孔. 有两例息肉直径为 3 cm 的患者, 均经过三次治疗, 虽然治疗面积大, 除在术后感腹部疼痛有所加剧外, 未述其他不适, 三次治疗结束后, 半月内镜复查见 1.5 cm × 2.0 cm 左右浅表溃疡, 经口服洛赛克、思密达、阿莫西林 2 wk, 2 mo 后再次复查溃疡面消失, 仅见黏膜欠光滑. 另外 1 例 76 岁的老年患者, 因冠心病安有心脏起搏器, 在热极治疗的术中、术后未述不适, ECG 检查无异常. 由于热极头涂有防粘连剂(四氟乙

烯), 没有发生因热极头粘连组织、牵拉、焦痂脱离所致继发性出血、穿孔, 而激光、微波易与病变组织产生粘连出现并发症. 热极线缆无热辐射, 不会引起内镜老化, 热极头光滑、圆钝不会损伤内镜内检管道. 该机使用方便, 无需象高频电需外接电极板, 体积小, 重量轻(≤ 4.5 kg)搬运方便, 而且价格低, 明显低于 Nd:YAG 激光治疗仪、微波治疗仪、高频电治疗仪. 不足之处是对于较大息肉处理相对较困难, 需经多次治疗, 无高频电及 Nd:YAG 激光的切割功能. 由于病例不是很多, 还有待进一步观察及总结.

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

• 临床经验 •

## 结肠镜常规检查回肠 1340 例

唐井钢, 高飞, 李娟

唐井钢, 李娟, 广州南方医院中医科 广东省广州市 510515  
高飞, 中国人民解放军 260 医院 河北省石家庄市 050041  
项目负责人: 唐井钢, 510515, 广东省广州市广州大道北, 南方医院中医科.  
wjg@wjgnet.com  
电话: 020-61365870 传真: 020-61365870  
收稿日期: 2004-07-05 接受日期: 2004-09-09

### 摘要

**目的:** 评价经结肠镜常规检查回肠的临床价值, 提高对回肠疾病的诊断与治疗水平.

**方法:** 结肠镜到达回盲部后采用直接进入法、钩拉进入法、导丝引导进入法插镜至回肠 20-70 cm, 观察回肠黏膜病变.

**结果:** 1340 例患者 1240 例成功插入回肠, 成功率为 92.5%, 244 例发现了病变, 总阳性率为 19.7%.

**结论:** 在小肠镜还未推广使用的情况下, 结肠镜常规深插对发现回肠末端疾病很有意义.

唐井钢, 高飞, 李娟. 结肠镜常规检查回肠 1340 例. 世界华人消化杂志 2004; 12(12):2925-2926

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2925.asp>

### 0 引言

回肠末段是小肠疾病的好发部位, 随着电子内窥镜广泛应用和检查技术不断提高, 采用中长型结肠镜经回盲瓣插入回肠末段检查, 近年来已成为部分医院的结肠镜常规检查部位. 我科近年用 Olympus XQ240 型结肠镜在检查全结肠的基础上常规深插检查回肠末段, 对

回肠末段疾病有了新的直观的认识, 现总结报告如下.

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 病例为解放军 260 医院 2003-01/12 门诊及住院患者, 男性 742 例, 女性 498 例, 年龄 14-86 岁, 平均年龄为 46.1 岁, 临床症状表现为腹痛、腹泻、血便、黏液便、腹部包块、便秘等.

**1.2 方法** 常规方法插入结肠镜, 整个插入过程少注气、多吸气, 根据情况变换体位, 助手协助腹壁加压, 熟练运用钩拉和旋转手法, 一般距肛门 50-80 cm 可达回盲部. 达回盲找到回盲瓣位于阑尾口视野左上方. 根据回盲瓣形态, 选择如下进镜法: (1) 直接进镜法: 取直镜身后在回盲瓣开放与半开放情况下, 镜头对准开口中心直接插入. (2) 回拉滑入进镜法: 看清回盲瓣后将镜头送至回盲瓣前方, 调整旋钮使镜头向下弯曲看清开口为止, 回拉镜身使结肠镜滑入回肠. (3) 支撑引导进镜法在回盲瓣挛缩时可采用此法, 利用活检钳或胆道导丝先插入回肠, 引导镜身插入.

### 2 结果

**2.1 正常回肠黏膜镜下表现** 肠腔变狭窄呈圆锥型, 黏膜橘红表面呈绒毛状, 继续进镜可见稀疏、细浅的环形皱襞, 颜色变淡, 可见散在大小不等颗粒或结节状淋巴滤泡, 少数密集呈簇. 1240 例成功插入回肠, 100 例插入失败, 失败原因见表 1.

**2.2 回肠疾病诊断结果 (表 2).**

表1 100例失败原因分析

原因	n	%
耐受性差	56	56.0
肠腔狭窄堵塞	14	14.0
相对禁忌	6	6.0
视野不清	5	5.0
其他	19	19.0

表2 内镜诊断结果

疾病	n	%	备注
慢性回肠末端炎	150	12.14	部分病理证实
回肠末端淋巴滤泡增生症	65	5.23	
寄生虫	11	0.89	
溃疡性回肠炎	3	0.24	病理证实
回肠结核	3	0.24	病理证实
回肠克隆病	2	0.16	
血管瘤	1	0.08	
异物	1	0.08	
平滑肌瘤	1	0.08	手术证实
憩室病(Meckel's)	6	0.48	
肿瘤	1	0.08	病理证实
正常	996	80.32	

### 3 讨论

结肠镜顺利插入回肠的关键是镜身在大肠内不能结圈,故在进镜过程中边进边拉直镜身,70 cm左右到达回盲部,如大于该长度,进回肠就比较困难。同时,到达回盲部时将大肠内积气抽吸干净,亦是确保进镜深度的重要技术手段,本组1 340例患者,顺利进入回肠1 240例,成功率达92.5%,与国内部分医院报道接近<sup>[1]</sup>,共检出各种疾病244例,占19.7%,低于国内部分医院报道<sup>[1-2]</sup>。

该组患者进入回肠成功率只有92.5%的主要原因是

患者耐受性差,占总失败率的56%,他们中的绝大多数是在外院已做过结肠镜检查,已发现病灶,来我院检查的目的是进一步确诊或行内镜治疗,故不愿耐受较长时间的检查。肠腔狭窄堵塞是另一个未能成功的主要原因,少数患者因炎症性肠病溃疡较大较深,我们认为是相对禁忌,为避免穿孔不再深插;视野不清亦是插镜失败的原因之一,当日预约的患者数及医务人员的操作熟练程度亦是影响内镜顺利进入回肠的因素。

国内尚未出台回肠疾病的内镜诊断标准,故对回肠疾病的认识有一定分歧,导致各家报道的阳性率差异较大,低者只有15%<sup>[2]</sup>,高者接近43%<sup>[1]</sup>;我们的检出率为19.7%,分析原因主要是对慢性末端回肠炎的诊断标准认识不统一,我们对该病的诊断比较谨慎,认为该病的内镜表现为:黏膜红白相间,花斑状,地毯状绒毛减少或倒伏,病理提示黏膜萎缩或次全萎缩等慢性炎症表现,这与周国华 *et al*<sup>[3]</sup>报道的慢性末端回肠炎的病理表现一致。

随着双气囊小肠镜及胶囊内镜的逐步使用,对小肠疾病的认识越来越清楚,二者的缺点是用时较长,价格贵,并不被广大患者接受,而且胶囊内镜容易在回肠末端滞留<sup>[4]</sup>。结肠镜的深插能观察回肠20-70 cm的距离,这一长度也是回肠疾病高发的部位<sup>[5]</sup>,所以,在国内小肠镜尚未广泛应用的情况下,结肠镜的常规深插对发现该部位的回肠疾病大有裨益。

### 4 参考文献

- 1 任占武,王红丽,李国玲. 中型结肠镜检查回肠末段的体会. 中华消化内镜杂志 2000;17:111-112
- 2 荣珍,徐少勇,毛明芝,屠新华,姜东升. 回盲部病变381例内镜检查结果分析. 邵阳医学院学报 1998;17:226-227
- 3 周国华,薛红仙,左大猛,陈奉条,周红梅. 回肠末端炎164例内镜病理学分析. 中华消化内镜杂志 1996;13:40-41
- 4 Ang TL, Fock KM, Ng TM, Teo EK, Tan YL. Clinical utility, safety and tolerability of capsule endoscopy in urban Southeast Asian population. *World J Gastroenterol* 2003;9:2313-2316
- 5 Bassi A, Loughran C, Foster P. Carcinoid tumour of the terminal ileum simulating Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1004-1006

# 以“发热、腹痛”起病的感染性心内膜炎并脾梗塞

段志军, 刘丽娜

段志军, 刘丽娜, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011  
项目负责人: 段志军, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路 222 号, 大连医科大学附属第一医院消化内科, cathydoctor@hotmail.com  
电话: 0411-83635963-3081 传真: 0411-83632383  
收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-08-25

## 摘要

目的: 认识以“发热、腹痛”起病、易被误诊的病例。

方法: 回顾 1 例以“发热、腹痛”起病的感染性心内膜炎。

结果: 45 岁男性, 不规则热伴持续左上腹隐痛 4 mo, 血沉快, 结核菌素试验(+++), 抗结核 50 d 未愈。心界左大, 心尖部 3/6 级吹风样杂音; 左上腹压痛(±)。计算机断层扫描诊断为脾梗塞; 彩色超声心动图: “二尖瓣多处赘生物”; 血培养: 草绿色链球菌生长。予大剂量青霉素体温恢复, 换瓣后痊愈。

结论: 对不明原因腹痛, 应仔细查体并及时行影像学检查。

段志军, 刘丽娜. 以“发热、腹痛”起病的感染性心内膜炎并脾梗塞. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2927

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2927.asp>

## 0 引言

临床上常见以“发热、腹痛”起病的病例, 而病因为感染性心内膜炎并脾梗塞者实属少见, 易被误诊。本文对这一少见病例做一报告。

## 1 病例报告

患者, 男, 45 岁。以“发热、腹痛 4 mo”入消化科。4 mo 前无诱因发热, 呈不规则热, 最高达 38.5℃, 无寒战, 有乏力、盗汗, 持续左上腹隐痛, 向后腰放散, 稀水便 3 d(自行缓解), 曾 3 次在当地医院短期静脉点滴青霉素体温下降而中止治疗, 后因青霉素无效而查血沉 56 mm/h, 结核菌素试验(+++), 以“肠结核”予异烟肼、利福平、吡嗪酰胺及乙胺丁醇抗结核, 至入我院已 50 d, 发热、腹痛未愈。发病无咳嗽, 无胸闷气短, 无头痛和关节痛, 体重减轻 10 余斤, 食欲欠佳, 小便正常。入院查体: 体温 38.5℃, 呼吸频率 16 次/min, 脉搏 70 次/min, 血压 118/80 mmHg, 神情, 精神状态尚好; 颈静脉无怒张, 双肺呼吸音清, 心界左大, 心率 70 次/min, 律齐, 心尖部 3/6 级吹风样杂音, 无传导; 腹平软, 肝脾未触及, 左上腹压痛(±), 局部摩擦感(-), 未闻及摩擦音, 移动性浊音(-), 肠鸣音正常; 杵状指。化验: 血红蛋白 115 g/L, 白蛋白 34.2 g/L; 尿潜血(++), 红细胞 1-2 个/高倍视野; 胸片正常; 全胃肠钡透“胃炎”; 结肠镜提示“结肠炎”; 计算机断层扫描: “脾内多发低密度影, 楔状, 增强后无强化, 边界清楚, 肝脾胆胰双肾未见异常。诊断为

脾梗塞”(图 1); 经胸彩色超声心动图: “二尖瓣脱垂, 赘生物?”; 经食管彩色超声心动图: “二尖瓣前后叶均可见多处赘生物, 后叶赘生物体积大, 形态不规则, 呈毛糙状, 最大赘生物可达 0.9 cm<sup>2</sup>, 厚度 0.35 cm, 伴后叶脱垂, 瓣口探及偏心性中重度反流”(图 2); 血培养提示草绿色链球菌生长。予大剂量青霉素治疗后, 体温恢复正常, 在我院心脏中心行换瓣术后, 痊愈出院。



图 1 上腹 CT 提示脾梗塞。

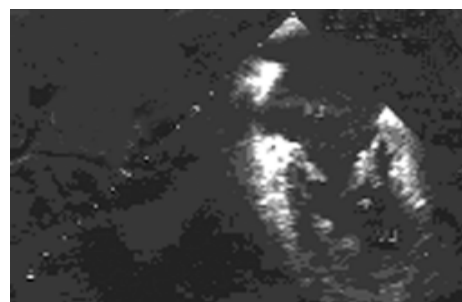


图 2 超声心动图示二尖瓣前后叶均可见赘生物, 后叶明显。

## 2 讨论

感染性心内膜炎患者起病可有发热, 以午后及晚上为主, 伴乏力盗汗, 其并发症中心力衰竭最常见, 动脉栓塞占 15-35% 且常见于病程晚期, 因脾梗塞出现“发热、左上腹痛”症状有个别报告<sup>[1]</sup>, 但作为首发表现, 还属少见。临床上以“发热、腹痛”起病, 多见于胃肠道、腹腔脏器或腹膜感染, 本例以“发热、腹痛”起病, 易被按照常见病因处理; 对于原因不明的发热、乏力、盗汗易被考虑结核中毒症状。本例提示, 对于不明原因腹痛患者, 应仔细查体并及时进行影像学检查, 以避免盲目治疗, 延误病情; 结核菌素试验可能出现假阳性, 应注意鉴别; 若怀疑结核, 应仔细查找结核部位, 确定后再给予系统的抗结核治疗; 若试验性抗结核治疗无效, 应及时查找其他病因。

## 3 参考文献

- 1 Liao WB, Bullard MJ, Liaw SJ. Widespread embolism in a patient with infective endocarditis—a case report. *Changcheng Yixue Zazhi* 1995;18:82-87