

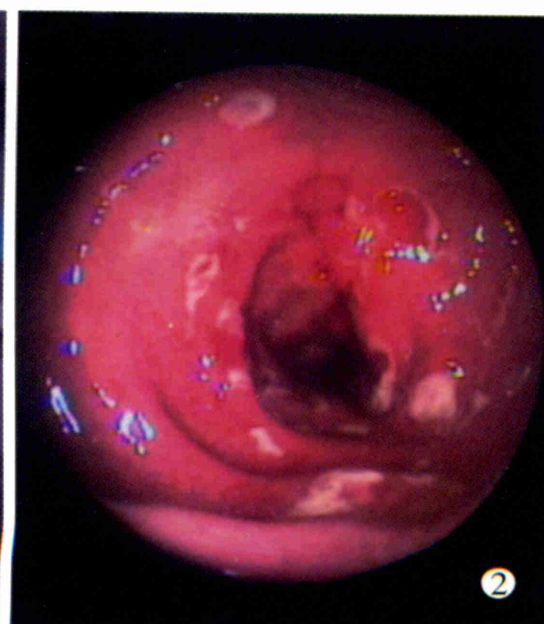
世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年8月15日 第11卷 第8期

(Volume 11 Number 8)



8/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI® -E, Research Alert®, Current Contents® /Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 8 月 15 日 第 11 卷 第 8 期 (总第 112 期)

述 评

- 1073 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识 成军, 董菁
1081 重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗 江学良

病毒性肝炎

- 1083 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳
1091 乙型肝炎病毒基因组中前-S 区编码基因的界定 董菁, 成军
1097 乙型肝炎病毒基因组中前-X 编码基因的界定 董菁, 成军
1102 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克
1107 乙型肝炎病毒 X 蛋白激活基因 1 的克隆化与序列分析 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克
1114 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞
1118 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒 e 抗原结合蛋白 E-19 的研究 陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞
1122 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞
1126 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞
1131 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林
1135 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系 张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽
1139 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性 李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国

基础研究

- 1144 肝外胆管癌组织 BAG-1 与 BAD 表达与凋亡调控的原位定量研究 闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮
1148 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡 李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国
1152 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立
1156 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝窦内皮细胞损伤的影响 仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛
1160 犬肝动脉输注阿霉素联合血液灌流的研究 张志友, 张文怡, 钱绍诚
1164 中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1 基因的克隆与表达 刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄
1168 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华
1172 垂体后叶素和特利加压素降低门胆汁性肝硬化大鼠门静脉高压对肝组织氧分压的影响 祝建波, 邓利群, 王思元
1175 电泳法检测肝和血清中醇脱氢酶同工酶 宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳
1178 肝细胞生成素核受体的确定及特性 王阁, 陈东风, 胡铭, 王军, 樊丽琳, 张晓荣
1182 PD98059 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响 马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政
1185 雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响 许君望, 龚均, 冯新利, 茆新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平
1189 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞
1193 丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞 HCT-8 增生的影响 布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红
1197 大肠癌组织胸苷磷酸化酶 / 血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义 余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲
1200 多粘菌素 B 及其模拟肽体外抗内毒素的实验研究 万志红, 王宇明, 刘国栋
1203 肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用 高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来

临床研究	1207 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1211 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎随机对照研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1214 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1219 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和PCNA的表达意义 伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚 1223 汉防己甲素抑制肝癌细胞增生的作用 荆绪斌, 李涛, 杨绮华, 郭光华, 胡辉, 陈素钻 1227 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕 1230 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变 张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力 1234 肠易激综合征 402 例发病时间分布及症状特征 许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华
焦点论坛	1237 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的研究进展 成军 1238 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式 成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1240 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究 邵清, 成军, 白雪帆 1242 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮 1245 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1248 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活作用的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林 1250 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素 A 的调节研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1255 乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1258 乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1261 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1264 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚
临床经验	1222 一氧化碳中毒伴筋膜间隙综合征的综合治疗 邹淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰 1267 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤 21 例 樊丽琳, 陈东风
病例报告	1143 成人不典型郎格罕组织细胞增生症 1 例 王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生 1147 慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变 1 例 张文瑾, 王晓峰, 赵景民 1192 小肠血管结构不良 2 例 冯瑞娥, 赵大春, 陈杰
消 息	1080 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 1090 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 1130 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1155 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 1226 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
封面故事	1138 溃疡性结肠炎的基础和临床研究

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-08-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 朱丽虹
排版 李少华
校对 李天华

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail:wcjd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话:(010)85381892
传真:(010)85381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(PJ)》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

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

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营 14010040

50

www.wjgnet.com

乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识

成军, 董菁

成军, 董菁, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
成军, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制, 出版专著5部, 发表论文及综述300篇. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫病学分会全国常委、全军医学科学技术委员会传染病与寄生虫病学分会委员.
国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人:成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

摘要

全世界有乙型肝炎病毒(HBV)感染者3.5亿人. 对于HBV多年的研究已经积累了丰富的资料, 但是, 我们对于HBV基因组特性的认识远远没有穷尽, 事实上还有许多方面需要进行探索. 通过对特定慢性HBV感染者血清中不同的HBV病毒基因克隆序列的比较提出了HBV准种特点, 使我们对于HBV基因组结构与功能的复杂性有了更为深入的了解. 野生型病毒之间、野生型病毒与突变型病毒之间、突变型病毒之间的反式调节机制是各种类型的缺陷型HBV存在的重要条件和机制, 也是HBV感染引起肝细胞癌(HCC)的重要的分子生物学机制. 外周血中存在羧基末端截短的表面抗原中蛋白(MHBs)的编码基因, 使我们对于HBV基因编码的反式激活蛋白的类型有了新的认识. 通过对克隆的HBV DNA全长基因序列的比较, 以及与其他地域所流行的HBV DNA序列之间的比较, 发现了新型的开放读码框架(ORF), 如前-X(pre-X)蛋白的编码基因和前-前-S(per-pre-S)蛋白的编码基因. 长距离精确聚合酶链反应(LA-PCR)技术克隆的HBV DNA全长序列, 是我国流行的adr亚型的HBV DNA全基因序列, 代表了真正存在的HBV的基因全长序列, 在HBV基因结构与功能的研究中, 以及在抗HBV治疗疗效应答的研究中具有重要的理论和实际应用价值.

成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1073-1080

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1073.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染不仅引起急性和慢性病毒性肝炎, 而且与肝硬化(LC)、肝细胞癌(HCC)的发生发

展有着十分密切的关系, 全世界大约有3.5亿人受到HBV的感染, 尽管乙肝疫苗的免疫预防已经取得了相当好的成绩, 但是现患HBV感染者的治疗仍因为没有特效药物而步履维艰, 在我国绝大多数终末期肝病患者都是由于感染HBV而引起的^[1-10]. 关于HBV DNA基因组结构与功能的复杂性, 近年来取得了一些新的研究进展, 对于HBV DNA基因组的结构与功能的研究, 使人们对于HBV存在状态及其防治任务的艰巨性有了更深入的了解^[11-18].

1 乙型肝炎病毒的准种特点

中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心近年来对于乙型肝炎病毒的准种特点进行了系统的研究^[19-26]. 关于HBV准种特点的深刻认识也是从一个偶然的开始. 在HBV基因疫苗的研究领域中, 国内外的HBV基因疫苗研究, 大部分都是研究ayw亚型的HBsAg编码基因的基因疫苗, 这是因为ayw是欧美国家的流行株, 也由于大部分研究都是从含有ayw亚型的HBV DNA头尾相连的双基因序列的质粒pCP10开始构建基因疫苗的表达载体, 而我们国家的流行株是adr、adw亚型, ayw只是在某些地区流行^[27-32]. 因此, 我们在研究乙型肝炎病毒基因疫苗时, 一开始就设想从慢性HBV感染的患者血清中扩增在中国大陆流行的adr、adw亚型的HBsAg的编码基因. 我们在多聚酶链反应(PCR)扩增和TA克隆过程中, 从1例患者的血清HBV DNA标本中就得到了30个左右的HBsAg的编码基因克隆. 为了提高工作效率, 我们同时对于数个克隆进行测序研究, 结果是各个序列之间具有遗传学上的高度相关性, 但又不完全相同. 于是我们对于更多的克隆进行序列测定, 结果也是如此. 这些基因序列来源于同一个患者, 同属于一个基因型和血清型, 但是每个克隆之间又存在着差别, 为了描述这种差别, 我们采用了研究RNA病毒基因序列差别的种群概念, 即准种(quasispecies)的概念, 来描述HBV DNA存在的状态^[33-40]. 所谓乙型肝炎病毒的准种就是指由遗传学上高度相关, 个体之间又有微小差别的乙型肝炎病毒组成的种群, 群体的构成处于不断变化之中. 准种的概念强调的是遗传学特点高度相关又有不同, 同时在自身和外界因素的影响下群体的构成又处于不断变化之中. 从HBsAg编码基因序列的分析得出准种的概念, 我们对于HBV DNA其他的结构基因区和调节基因区都进行了系统的分析, 得出了一致的结论. 我们对于一个患者的分析结

果如此,对于更多的患者的HBV基因序列进行系统分析,都有相同的结论.因此,准种特点是HBV存在状态的一个普遍的规律.

乙型肝炎病毒准种特点的发现实属偶然,准种概念的内涵也清楚、简单.但是,关于HBV存在状态的准种特点认识的意义却非同小可.将准种的概念引入到HBV的研究领域中,彻底改变了我们对于HBV存在状态的看法,可以说是对HBV存在状态认识的一场革命.首先,引入准种的概念,我们对于HBV DNA全基因序列的认识就深入一步.在美国生物工程信息学中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库 GenBank 中注册的HBV DNA全基因序列,绝大部分都是应用PCR技术进行分段扩增、克隆,然后再进行人工拼接,形成了所谓的HBV DNA全基因序列.如果从准种特点来说,这些基因序列根本不代表任何真正存在的病毒的基因序列,完全是一种人为拼接序列,是来源于不同的病毒基因组基因片段的嵌合体.因为1例慢性HBV感染者体内的病毒基因序列千差万别,甚至很难找到2株序列完全相同的病毒,因此,各个基因片段来源于同一个株病毒的几率微乎其微,是完全不可能的.这样人工拼接的HBV DNA全基因序列代表不了任何真正存在的HBV基因序列,只代表来源于不同病毒基因序列的嵌合体.第二,引入准种的概念,我们对于抗HBV疗效考核及其对于HBV的影响的研究方法就要做出相应的调整.在进行抗病毒治疗的临床研究中,我们经常见到研究报道在抗病毒治疗前后,仅克隆少数甚至是单一的HBV DNA片段的序列,进行比较发现不同之后就判定抗病毒治疗对于HBV基因序列的影响,这样的结论是完全靠不住的.因为慢性HBV感染者体内的不同的HBV之间序列本来就是不同的,即使不进行抗病毒治疗,2个时间点先后取得的HBV基因序列就是不同的,这种差别与抗病毒治疗的疗效无关.抗病毒治疗前后对于不同病毒序列的测定研究,实际上与病情变化前后的研究是类似的.同样我们不能根据病情变化前后少数的HBV基因序列的改变,就妄下结论,认定这样的基因序列不同或变化就是引起病情变化的病毒基因序列方面的原因. HBV准种特点的认识,使我们从根本上改变了对于HBV存在状态的认识,避免了只见树木,不见森林的片面性.第三,引入准种的概念,使我们对于抗病毒治疗的艰巨性和复杂性有了一个全新的认识.因为慢性乙型肝炎患者血清中的HBV具有多样性,不同的病毒对于不同的抗病毒药物的敏感性完全不同,这样就不奇怪一种抗病毒药物治疗的效果极其有限的事实了.从HBV与人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)的生活周期及致病特点的相似性来看,一种抗病毒药物实难解决HBV的抗病毒治疗的问题.在抗HIV-1治疗过程中形成的鸡尾酒疗法,即目前广泛应用的高活性抗逆转录病毒疗法(HAART)的一些理念和做法是颇值得借鉴的.虽然在抗HBV治疗过程中陆续有人提出应该采取“联合治疗(combined therapy)”

和“序贯治疗(sequential therapy)”的想法,但是目前由于抗HBV可供选择的有效药物种类十分有限,而且没有切实的临床疗效的证据,只是停留在理论上,而没有实际可供操作的具体方案.第四,引入准种的概念,使我们认为有必要对于目前的检测手段进行审慎选择和改进.在特异性检测技术建立之前,在有效的抗病毒治疗药物的应用之前,在进行有效的免疫预防接种之前,HBV的存在与传播方式处于相对自由与宽松的环境,其存在与分布主要由其自身的特点来决定的.但是,随着特异性检测技术的应用和抗病毒药物的应用,以及重组疫苗的广泛应用,HBV的生存和传播的环境条件已经大大改变,因此,我们今天所面临的HBV种群,与特异性检测技术和抗病毒治疗技术出现之前的情况相比较,已经发生了相当大的改变,而且这种改变还在继续进行下去.如果我们总是被动等待,可以设想,在将来的某一天,我们的检测手段所覆盖的病毒种群逐渐萎缩,我们将会面临更多的抗药病毒株.那时,我们目前的检测手段的漏检率就会增加,输血不再是安全的.治疗上我们会面临更为严峻的挑战.因此,我们必须从现在起,以准种的眼光重新审视HBV的存在状态和特点,未雨绸缪,设计新型的检测方法和治疗药物.否则,我们将会陷入十分被动的局面.这决不是危言耸听.第五,引入准种的概念,使我们对于免疫预防的任务艰巨性有了深刻的了解.将来的免疫预防的主要对象不是目前广泛存在的野生型病毒,而是发生了明显的变异的病毒株,这样根据主要的流行野生型病毒的设计的疫苗的免疫预防效果就会显著降低,为了应付将来出现的免疫预防的新局面,必须以准种的观点来看待乙型肝炎免疫预防的课题,才不至于将来有一天措手不及.从目前免疫预防失败的儿童血清中检出的HBV基因序列已经发生了显著变异的事实来看,也非常支持这一观点^[41-50].

2 乙型肝炎病毒的反式调节

病毒基因表达的调节与哺乳动物细胞的基因表达的调节一样,主要是转录水平的调节.转录水平的调节方式和机制包括顺式(cis)调节机制和反式(trans)调节机制,HBV基因表达的反式调节机制对于HBV的生活周期、与病毒性肝炎发病机制之间的相互关系有十分密切的关系^[51-57].乙型肝炎病毒基因组中具有公认的4段启动子的序列(SP-I、SP-II、CP、XP),指导不同的开放读码框架(ORF)的转录过程,这种调节方式是基因结构内部的调节,属于顺式调节机制;乙型肝炎病毒的X蛋白以及肝细胞中某些转录调节因子与HBV DNA的调节基因序列相结合,并对于HBV DNA的复制和表达产生的调节作用,称为反式调节作用^[58-63].乙型肝炎病毒的反式调节包括以下几种不同的类型:第一,HBV基因组编码产物对于其自身的启动子结构的激活,例如X蛋白对其核心启动子(CP)的反式激活,可以刺激前-C和前基因组

启动子的转录表达. 第二, HBV 基因组的编码产物对于异源性基因启动子的反式激活作用, 如丙型肝炎病毒(HCV)的核心蛋白对于 HBV 表面抗原蛋白的编码基因启动子 -I(SP-I)具有反式调节作用. 第三, HBV 基因组编码的蛋白对于肝细胞基因组中启动子的转录活性具有反式调节作用, 例如 HBV 羧基末端截短型表面抗原中蛋白(MHBs^t)对于肝细胞中的原癌基因 c-myc 的启动子具有反式激活作用. 第四, 肝细胞中某些转录因子蛋白对于 HBV 基因组中的启动子序列具有反式激活作用, 例如在肝细胞中存在肝细胞核因子 1(HNF1, hepatocyte nuclear factor 1), 与 HBV 基因组中特异性的启动子序列之间的结合与反式调节作用, 决定了 HBV 生活周期的嗜肝细胞特性. HNF1 只有在肝细胞中表达, 这种转录激活因子的存在, 对于 HBV 基因组中的 SP-I、SP-II 等启动子的活性具有较强的反式激活作用, 决定 HBV 只有在肝源性细胞系中才能有效地进行复制和表达. 第五, 由于存在缺失型 HBV, 能够正常编码反式激活蛋白的 HBV 对于基因缺失突变造成反式激活蛋白合成缺如的 HBV 缺陷型病毒株的反式调节, 是慢性 HBV 感染者外周血中可以维持其准种特点的主要原因^[64-71].

HBV DNA 基因组编码的病毒蛋白中至少包括 2 种不同转录激活因子, 如 X 蛋白和羧基末端截短的表面抗原中蛋白. X 蛋白的反式激活作用, 与 HBV DNA 的有效复制过程密切相关. HBV 基因组编码的 MHBs^t 是 HBV 感染与 HCC 发生发展之间密切相关的反式激活因子. 虽然目前来看这种反式激活蛋白在 HBV DNA 的复制和表达的调节中的作用还不清楚, 但是在反式激活细胞中的原癌基因, 促进细胞的恶性转化方面具有十分重要的意义. 这些方面已经积累了大量丰富的研究资料^[72-78].

关于 HBV 基因准种特点的研究认识到, 慢性 HBV 感染者体内的病毒具有多种多样的突变形式, 包括几乎所有的突变类型, 其中包括终止密码子的提前出现, 这样造成了许多 HBV 蛋白的编码功能受到影响, 或者完全丧失. 如果表面抗原的编码基因出现这样的情况, 那么这株病毒就不能很好地编码病毒的表面抗原, 仅靠自身的编码功能, 这株病毒是不能生存的. 那么为什么这样的病毒还会存在下来, 原因就是表面抗原没有发生突变的病毒所表达的表面抗原蛋白, 仍然可以以反式的方式提供表面抗原蛋白给这种发生突变的病毒, 供其包装使用. 所以这些发生突变的病毒与野生型的病毒可以共存. 同样的道理, 如果 HBV DNA 多聚酶区发生提前终止, 这株病毒就不能编码 HBV DNA 聚合酶, 这样的病毒同样自身难以完成其生活周期, 需要其他病毒的反式调节的补充. 病毒发生变异是持续存在的, 彼此之间通过反式调节机制, 互通有无, 相互借助, 从而造成慢性 HBV 感染者血液中存在大量的缺失突变的病毒, 因此, 反式调节机制是野生型病毒的调节的一般方式, 同时也是突变型病毒的存活所依赖的重要机制. 因此, 慢性 HBV 感染者体内的 HBV 存在状态是多种多

样的, 反式调节机制是其重要的原因^[79-83].

3 外周血中截短型表面抗原中蛋白的发现

在很早之前就注意到 DNA 病毒与人类长期共存的过程中, 其遗传物质相互交换, 始终而广泛存在. 即使是逆转录病毒这一类在生活周期中存在前基因组 DNA (pre-genomic DNA) 阶段的特殊病毒形式, 也存在病毒基因组 DNA 与细胞基因组 DNA 整合的情况. HBV DNA 属于 DNA 病毒, 其复制的生活周期是 DNA-RNA-DNA 的复制过程, 当然也会存在 HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 之间的整合. 当然, 目前发现在肝细胞之外的 HBV DNA 也有与宿主细胞 DNA 整合的情况. 由于从流行病学、临床医学资料上来看, HBV DNA 的整合与肝细胞癌的发生发展又十分密切的关系, 所以多年来一直受到人们的广泛重视^[84-97]. 关于 HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 之间的整合及其生物学和医学意义已经有较多的研究. 目前认为, 虽然在染色体上找到一些 HBV DNA 整合的位点, 但是一般来说, HBV DNA 的整合还是随机的, 不是定点整合的方式. HBV DNA 整合破坏了正常染色体的结构, 有时会引起异常的染色体转位, 这是造成 HCC 发生的重要机制所在. 另外, HBV DNA 整合, 特别是具有反式功能的病毒蛋白编码基因的整合在 HCC 发生发展中具有重要意义. 从目前的资料来看, HBV DNA 中的 X 基因不仅是经常发生整合的基因片段, 也是最受重视的 HBV DNA 编码的反式激活蛋白. 最近几年来, 在 HCC 组织中发现了 HBV DNA 表面抗基因的整合, 由于整合的基因片段不是全长的表面抗基因片段, 只是包括前 -S2 和 S 基因的氨基末端的部分编码基因序列, 因此这种整合的病毒基因片段可以编码一种截短型的表面抗原中蛋白(MHBs^t). 后来的研究证实, 与 X 蛋白一样, MHBs^t 具有显著的反式激活效应. 因此, 作为一种反式激活蛋白, MHBs^t 得到了空前的重视, 同时为 HBV 与 HCC 发生之间的相关性找到了另外一条癌变通路^[98-105].

如前文所述, 最初的具有反式激活作用的 MHBs^t 的编码基因是从 HCC 整合在肝细胞基因组 DNA 中的 HBV DNA 片段中发现的, 之后所发现的 MHBs^t 编码基因也都是从 HCC 组织中克隆的, 人们深信只有在 HCC 中才具备编码反式激活作用的 MHBs^t 的编码基因. 但是, 董菁 et al^[20] 首次报道在慢性 HBV 感染者外周血中克隆到 MHBs^t 编码基因, 并进一步证实这种羧基末端截短的 MHBs^t 具有显著的反式激活作用. 除了应用基因的共转染技术, 证实 MHBs^t 表达载体的共转染可以显著反式激活异源性启动子 SV40 早期即刻启动子的转录活性之外, 而且还利用基因芯片技术、抑制性消减杂交技术 (SSH)、异源性启动子指导的报告基因表达载体的共转染技术等证实从外周血克隆的乙型肝炎病毒 MHBs^t 是具有显著的反式激活作用的. 从 SSH 的筛选过程中, 我们发现 MHBs^t 可以激活原癌基因 c-myc 的表达, 之后

应用 Western blot 杂交技术进一步证实了这种对于原癌基因反式激活和上调的作用, 进一步指出, MHBs^t 在 HCC 发生中具有十分重要的作用^[106-109].

目前研究表明, MHBs^t 的反式激活效应可能与蛋白激酶 C(PKC)依赖的信号转导途径有关, 前 -S2 区域与 PKC α/β 结合发生磷酸化反应, 触发 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2- 激酶信号转导链式反应, 结果激活了转录因子如 AP-1、NF- κ B、AP-2、SRE、Sp1 和 c-myc、c-fos 启动子, 参与病毒感染后的炎症反应和肝细胞癌的发生. MHBs^t 蛋白结构的改变, 缺失了位于 C- 末端的膜定位信号, 使 MHBs^t 在未能进入分泌途径而在内质网(ER)中滞留, 其前 -S2 区指向胞质区与胞质蛋白相互作用, 产生转录激活功能; 而全长的 MHBs 蛋白的前 -S2 区指向 ER 腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说 MHBs^t 的反式激活功能依赖于其 N- 末端前 -S2 区的胞质定位功能. 而缺失突变的范围是决定该截短型分子是否具有反式激活作用的重要影响因素, MHBs^t 至少完全缺失蛋白 C- 末端 S 区的疏水区 III, 才具有反式激活功能; S 区的 N- 末端疏水区 I 是反式激活所必需的, 因为蛋白与膜的结合是转录激活功能所必需的, 这段序列被称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TAO). 进一步研究表明, MHBs^t 的最小反式激活单元定位于 4-53 氨基酸残基, MHBs^{t53} 是最小的转录激活因子, 是一种非膜结合类型的 MHBs^t, 就是说, 仅前 -S2 区(aa 1-55)就足以介导反式效应, 说明作为反式激活剂的 MHBs^t 大小范围是很大的. 我们目前正在构建不同截短范围的表达载体, 进一步研究 MHBs^t 的反式激活功能, 筛选和克隆其反式激活的靶基因^[110,118].

4 乙型肝炎病毒新型开放读码框架的研究

乙型肝炎病毒基因组的紧密结构特点是十分突出的, 表现在调节基因与结构基因序列的重叠、不同结构基因区段之间的重叠. 令人惊奇的是同一段基因序列, 可以同属于不同的功能区段, 而又不相互影响, 最大效率地充分利用了 3 200 bp 的全基因组结构, 完成其复制和表达的严密调节. HBV DNA 病毒这一结构特点是十分突出的. 相互重叠的结构特点, 造成的一种局面就是某一位点或者是某些位点的改变, 不仅仅具有单一的影响, 而是影响深远. 传统的观点认为我们对于 HBV DNA 的结构特点已经有了深刻的认识, 其实我们对于 HBV DNA 结构与功能、表达与调控的特点还有许多问题没有认识清楚. 关于 HBV DNA 基因序列之中是否还具有新型的编码基因序列, 以及这些新型的编码基因序列存在的生物学意义、医学意义如何, 始终是我们应该关注的一个重要问题.

董菁 et al^[119,120] 应用长距离精确的多聚酶链反应技术(LA-PCR)从慢性 HBV 感染者血清中扩增克隆了全长的 HBV DNA 全基因序列, 从而建立了中国流行株的 HBV DNA 全基因序列. 通过对中国流行株 HBV DNA 序

列与其他已经克隆的 HBV DNA 基因序列进行系统的比较发现, 在 HBV DNA 基因组序列中可能还存在新型的编码基因区. 对于前 -X(pre-X)基因区和前 -前 -S(pre-pre-S)基因区的断定就是对于 HBV DNA 结构与功能的重要的新认识. 通过对不同地域来源的 HBV DNA 基因组序列的比较, 发现 HBV DNA 序列中存在的前 -X 基因位于 X 基因的上游, 与 X 基因的框架结构一致, 但是 X 基因具有其自身的起始密码子. 从中鉴定的 HBV 前 -X 基因序列长度为 168 nt, 编码产物为 55 aa, 分子量为 6.2 kD, 对于其蛋白质一级结构序列进行分析发现, 序列中含有 15 个疏水氨基酸残基, 24 个极性氨基酸残基, 9 个丝氨酸残基, 表明具有潜在的磷酸化位点. 对于 GenBank 中收录的 HBV 基因序列进行分析比较, 发现有 18 个序列含有前 -X 序列, 同源性在 85-94 % 之间. 前 -前 -S 基因序列长度为 135 nt, 编码产物为 43 aa, 分子量为 5.2 kD, 对于其蛋白质一级结构序列进行分析发现, 由 19 个疏水氨基酸残基, 10 个极性氨基酸残基, 5 个强碱性氨基酸残基, 3 个丝氨酸残基. 对于 GenBank 中收录的 HBV 基因序列进行分析比较, 发现有 5 个克隆有前 -前 -S 序列, 序列的同源性在 66-95 % 之间. 这 2 个新型开放读码框架的确定, 使我们对于 HBV 基因组中的编码基因序列有了新的认识, 为进一步研究 HBV 的生活周期、致病机制, 以及新型诊断技术等开辟了新的研究方向.

5 乙型肝炎病毒全基因序列的认识

关于 HBV 全基因序列的克隆化, 早在 1979 年就已经完成. 这在分子生物学技术还不是特别完善的年代显得多么的难能可贵. 随着 1985 年聚合酶链反应技术的出现和不断发展, 使得 HBV DNA 基因序列的扩增和克隆化变得十分容易. 而且据此还建立了 HBV DNA 的定性和定量的 PCR 扩增技术, 在慢性 HBV 感染患者的病毒载量测定中发挥着十分重要的作用^[121-127]. 与此同时, 世界上各个国家对于 HBV DNA 的全基因序列也进行了研究, 在美国生物信息学中心建立的核苷酸序列数据库 GenBank 中注册的 HBV DNA 全基因序列已经达到 200 条以上. 如前文所述, 对于这些 HBV DNA 全基因序列克隆的方法学进行推敲, 不难发现这些基因序列存在严重的问题, 因为是从 1 例 HBV 患者的血清中同时获得多个 HBV DNA 片段, 相互重叠的基因片段之间进行拼接, 从而完成 HBV DNA 全基因序列的确定. 如果从准种的观点来看, 慢性 HBV 感染者体内存在千差万别的 HBV, 随机地选择含有 HBV DNA 片段的克隆进行测序, 尽管重叠部分的序列可能是同源, 但是要保证全部的基因片段都是来源于同一株病毒, 从理论上讲几乎是不可能的. 换一句话说, 在 GenBank 中注册的绝大部分的 HBV DNA 基因全序列都是从不同的 HBV 病毒株来源的基因序列, 实际上是一个嵌合体, 并不能代表真正存在的 HBV DNA 的全基因序列. 符合

这种基因序列的HBV是根本不存在的. 因此, 我们对于HBV DNA基因序列的认识, 一定要从准种的特点去认识, 才能更加全面和正确^[128-134].

既然HBV慢性感染者体内的HBV DNA基因序列千差万别, 不能应用分段克隆的技术对于HBV DNA全基因序列进行分析, 那么就必须设计扩增全长的HBV DNA的PCR技术. 随着具有特殊功能的DNA多聚酶的发现和应用, 使一次扩增HBV DNA全长的基因组成为可能. 董菁 et al^[119]应用LA-PCR从2例慢性HBV感染者的血清中获得了5个克隆的全长HBV DNA基因序列. 5个克隆的全长HBV DNA序列都属于adr亚型, 长度也都是在3 200 bp左右, 但是其基因序列却有显著的差别, 即使是来源于同一个患者的HBV DNA全基因序列之间也有显著的不同. 不仅仅是个别核苷酸或氨基酸残基序列的差别, 而且还有大段的缺失、插入、终止密码子的提前出现等几乎所有的基因突变形式. 可以说, 在1例慢性HBV感染者血清中很难找到完全一样的HBV DNA全长基因序列. 即使是HBV基因序列小的编码基因或调节基因片段序列完全一样的几率都很低, 何况长度达到3 200 bp的全长HBV DNA. 慢性HBV感染者体内的HBV DNA全长基因序列不是一成不变的, 而且是随着HBV DNA的不断复制和机体免疫力的不断变化, 甚至是抗HBV药物的应用, 改变了环境对于HBV生存的压力, HBV DNA基因序列始终处于不断的变化之中^[135-140]. 如果认识到这一点, 有很多问题就可以进行解释了. 例如, 关于HBV DNA全长基因序列参考的问题, 在我们看来, 目前还没有什么所谓的HBV DNA参考株 (reference strain) 或者是标准株 (standard strain), 因为HBV DNA序列的多样性, 而且又始终处于不断的变化之中, 实际上这种标准株或称为参考株是不存在的, 认为规定哪一株HBV DNA病毒基因序列作为中国人流行标准株或者参考株都是没有多大意义的. 认识了HBV DNA全长基因序列的存在特点, 我们对于HBV本身的结构与功能、表达与调控, HBV感染的结局与其与抗病毒治疗疗效判定有关的HBV DNA基因序列的改变, 都会有一个全新的认识^[141-150].

6 参考文献

- 1 成军, 陈菊梅, 李春海, 谭子兴. 乙型病毒性肝炎患儿血清中谷胱甘肽S-转移酶的研究. 临床肝胆病杂志 1991;7:83-84
- 2 Cheng J, Chen J. Value of plasma glutathione S-transferase measurement in the patients with hepatocellular carcinoma. In: Tang ZY, eds. Advances in liver cancer and hepatitis research. Shanghai. Shanghai Medical University Press, 1991: 81-82
- 3 Cheng J, Chen J. Plasma glutathione S-transferase measurement in the patients with chronic hepatitis and hepatic cirrhosis. In: Tang ZY, eds. Advances in liver cancer and hepatitis research. Shanghai. Shanghai Medical University Press, 1991:251
- 4 Cheng J, Chen J. Plasma superoxide dismutase measurement in children with viral hepatitis. Free Rad Res Commun 1991;12:13: 669-673
- 5 成军, 斯崇文. HBV DNA转染细胞系的建立及应用研究进展. 国外医学流行·病学传染病学分册 1994;21:60-64

- 6 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. Nucleic Acids Res 1990;18:4940
- 7 Mathet VL, Feld M, Espinola L, Sanchez DO, Ruiz V, Mando O, Carballal G, Quarleri JF, D' Mello F, Howard CR, Oubina JR. Hepatitis B virus S gene mutants in a patient with chronic active hepatitis with circulating Anti-HBs antibodies. J Med Virol 2003;69:18-26
- 8 Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. J Clin Virol 2002;25:97-106
- 9 Huangfu J, Dong J, Deng H, Cheng J, Shi S, Hong Y, Ren X, Li L. A preliminary study on the heterogeneity of preS2 region in hepatitis B virus. Zhonghua Neike Zazhi 2002;41:233-236
- 10 Geller SA. Hepatitis B and hepatitis C. Clin Liver Dis 2002;6: 317-334
- 11 成军, 斯崇文, 王勤环. 人IL-2基因的转移表达及抗HBV和诱导LAK细胞的研究. 传染病信息 1994;7:93
- 12 成军. 病毒基因组的反式调控及其在抗病毒基因治疗方案设计中的应用. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:241-244
- 13 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素-2基因表达载体的构建及抗乙型肝炎病毒作用. 中华肝脏病杂志 1995;3:67-70
- 14 成军. 决定乙肝病毒嗜肝特性的分子机制. 国外医学病毒学分册 1995;2:78-81
- 15 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素-2基因转移表达及抗乙型肝炎病毒和诱导LAK细胞活性的研究. 中华医学杂志 1995;75:388-391
- 16 Xia GL, Nainan OV, Jia ZY, Wang JJ, Liu HB, Li RC, Cao HL, Liu CB, Margolis HS. Prevalence of mutants in the determinant region of hepatitis B surface antigen among Chinese carriers after receiving only active postexposure immunoprophylaxis. Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi 2001;15:212-215
- 17 Dong J, Cheng J, Wang Q, Huangfu J, Shi S, Zhang G, Hong Y, Li L, Si C. The study on heterogeneity of hepatitis B virus DNA. Zhonghua Yixue Zazhi 2002;82:81-85
- 18 Li W, Ikematsu H, Yamaji TK, Chong Y, Hayashi J, Kashiwagi S. Hepatitis B virus genomes of chronic hepatitis patients do not contain specific mutations related to acute exacerbation. Dig Dis Sci 2001;46:2104-2112
- 19 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 中华内科杂志 2000;39:838-839
- 20 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 21 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶基因序列准种与变异特点的研究. 病毒学报 2001;17:270-272
- 22 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 23 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 24 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前C/C基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 25 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 李莉, 张国庆, 斯崇文. 乙型肝炎病毒C基因启动子区准种与变异特点的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:264-266
- 26 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒X基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 27 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中国公共卫生 2002;18:153-154
- 28 成军. 乙型肝炎病毒基因异质性及准种特点研究的临床意义. 解放军医学杂志 2002;27:112-115
- 29 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 30 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 31 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒X

- 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002; 27:125-127
- 32 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 33 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 34 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 35 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 临床肝胆病杂志 2002;18:17-19
- 36 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 37 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 38 董菁, 成军, 王勤环, 刘妍, 王刚, 施双双, 夏小兵, 李克, 邵得志, 斯崇文. 乙型肝炎病毒囊膜中蛋白与白介素 -18 联合基因免疫的实验研究. 中华传染病杂志 2002;20:148-151
- 39 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原 / 抗体同时阳性患者体内 S 基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 40 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:130-135
- 41 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 郎振为, 皇甫竞坤, 李莉, 斯崇文. HBsAg 中蛋白与 IL-18 联合核酸免疫 HBsAg 转基因小鼠的实验研究. 中华微生物与免疫学杂志 2002;22:518-519
- 42 Deng H, Dong J, Cheng J, Huangfu JK, Shi SS, Hong Y, Ren XM, Li L. Quasispecies groups in the core promoter region of hepatitis B virus. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396
- 43 Sookoian S, Flichman D, Castano G, Frider B, Campos R. Relationship between diversity of hepatitis C quasispecies and histological severity of liver disease. *Medicina (B Aires)* 2000;60:587-590
- 44 Netter HJ, Macnaughton TB, Woo WP, Tindler R, Gowans EJ. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *J Virol* 2001;75:2130-2341
- 45 Amarapurkar D. Natural history of hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):E105-E110
- 46 Mutimer D. Hepatitis B virus antiviral drug resistance: from the laboratory to the patient. *Antivir Ther* 1998;3:243-246
- 47 Cane PA, Mutimer D, Ratcliffe D, Cook P, Beards G, Elias E, Pillay D. Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation. *Antivir Ther* 1999;4:7-14
- 48 Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-707
- 49 Tsai SL. Immunopathogenesis of viral hepatitis B and C. *Changcheng Yixue Zazhi* 1999;22:159-170
- 50 Ngui SL, Hallet R, Teo CG. Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Rev Med Virol* 1999;9:183-209
- 51 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs^s 的反式激活作用. 国外医学病毒学分册 2000;7:190-193
- 52 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 53 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙型肝炎病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 54 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 55 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 56 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 57 刘妍, 成军, 董菁, 王琳, 王刚, 夏小兵. HBV X 蛋白与 HCV 核心蛋白协同反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:39-41
- 58 成军, 陈菊梅. 白介素 -12 在抗病毒治疗中的应用. 国外医学·流行病学传染病学分册 1999;26:1-4
- 59 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙肝病毒 S 基因单独与白介素 -12 基因联合免疫小鼠诱生的体液免疫应答. 传染病信息 1999;12:69-71
- 60 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原抗原源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130-132
- 61 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹, 田秀兰. 表面抗原 DNA 疫苗诱导小鼠体液免疫及抑制转基因鼠表面抗原的产生. 中华内科杂志 2000;39:319-322
- 62 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 S 基因单独和联合白介素 -12 免疫小鼠诱生的特异性体液和细胞免疫应答. 中华传染病杂志 2000;18:190-191
- 63 成军, 朱传琳. 肝炎病毒对双链 RNA 激酶 PKR 的调节作用. 国外医学微生物学分册 2000;23:1-3
- 64 成军, 李莉. 长效干扰素在慢性乙型肝炎治疗中的应用. 国外医学流行病学传染病学分册 2001;28:60-63
- 65 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹. HBsAg 及其与小鼠白介素 -18 融合蛋白表达质粒的构建和 DNA 免疫. 中华传染病杂志 2001;19:77-80
- 66 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19:5-6
- 67 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 68 成军, 李莉. 阿地福韦在慢性乙型肝炎治疗中的应用. 国外医学病毒学分册 2001;8:85-91
- 69 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001;17(增刊):31-35
- 70 洪源, 成军. 乙型肝炎病毒 mRNA 转录后剪接的研究进展. 国外医学病毒学分册 2001;8:115-119
- 71 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16(Suppl):A185
- 72 成军. 病毒性肝炎预防和治疗有关进展. 传染病信息 2001;14:215-217
- 73 成军. 病毒性肝炎研究的新进展 - 第三届国际肝炎及肝病学术研讨会巡礼之一. 国外医学·流行病学传染病学分册 2001;28:273-277
- 74 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 75 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的结构与调节机制. 中华医学研究杂志 2001;1:122-125
- 76 Zhao H, Cheng J, Si CW. Effects of IL-12 on the immune response in mice inoculated with nucleic acid vaccine expressing S protein of hepatitis B virus. *Chin Med J* 2001;114:47-52
- 77 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
- 78 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 79 夏小兵, 成军, 杨继珍, 钟彦伟, 王刚, 方洪清, 刘妍, 李克, 董菁. 抗 HBsAg 单链抗体靶向干扰素的构建及原核表达. 中华肝病病杂志 2002;10:28-30
- 80 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的调节机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:15-18
- 81 钟彦伟, 成军, 王刚, 陈新华, 李克, 李莉, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒核心蛋白人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 免疫学杂志 2002;18:85-88
- 82 洪源, 成军. 肝炎病毒 DNA 疫苗的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:221-223
- 83 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 84 钟彦伟, 成军, 王刚, 洪源, 陈菊梅. 肝炎病毒基因工程抗体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:219-221
- 85 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213

- 86 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒接种研究的临床意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:209-211
- 87 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
- 88 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2^b 小鼠免疫应答的实验研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:137-140
- 89 成军, 李莉. 拉米夫定在肝脏移植患者乙肝病毒再感染预防与治疗中的应用 - 第 36 届欧洲肝病年会巡礼. *国外医学病毒学分册* 2001;8:185-189
- 90 Mutimer D, Pillay D, Dragon E, Tang H, Ahmed M, O' Donnell K, Shaw J, Burroughs N, Rand D, Cane P, Martin B, Buchan S, Boxall E, Barmat S, Gutekunst K, McMaster P, Elias E. High pre-treatment serum hepatitis B virus titre predicts failure of lamivudine prophylaxis and graft re-infection after liver transplantation. *J Hepatol* 1999;30:715-721
- 91 Kojima N, Horiike N, Michitaka K, Onji M. In situ detection of mutated hepatitis B virus in microdissected, formalin-fixed liver tissues from patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1999;30:359-365
- 92 Tsai SL, Huang SN. T cell mechanisms in the immunopathogenesis of viral hepatitis B and C. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:S227-S235
- 93 Ngui SL, Teo CG. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents. *J Viral Hepat* 1997;4:309-315
- 94 Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* 1996;24:1-5
- 95 Dusheiko GM. Treatment and prevention of chronic viral hepatitis. *Pharmacol Ther* 1995;65:47-73
- 96 Hilleman MR. Comparative biology and pathogenesis of AIDS and hepatitis B viruses: related but different. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1409-1419
- 97 Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993;35:40-50
- 98 成军, 斯崇文. 我国感染病学研究现状. *中华医学信息导报* 2002;17:6-7
- 99 成军, 李莉. 恩替卡韦及其抗 HBV 效果. *国外医学·流行病学传染病学分册* 2002;29:12-14
- 100 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. *解放军医学杂志* 2002;27:321-322
- 101 成军, 李莉. 新型抗乙肝病毒药物氟胞苷的作用及机制. *世界感染杂志* 2002;2:1-4
- 102 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前 -S1 基因酵母表达载体的构建及表达. *解放军医学杂志* 2002;27:341-342
- 103 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 104 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. *国外医学病毒学分册* 2002;9:33-36
- 105 王琳, 陆荫英, 成军, 于敏, 李克, 刘妍. 白介素 - 18 逆转录病毒载体的构建及抗乙型肝炎病毒的研究. *解放军医学杂志* 2002;27:699-701
- 106 陆荫英, 成军, 张玲霞. 分子伴侣及其与乙型肝炎病毒的关系. *胃肠病学和肝病杂志* 2002;11:177-180
- 107 成军, 李莉. 抗肝炎病毒序贯治疗方案的研究进展. *国外医学病毒学分册* 2002;9:75-79
- 108 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
- 109 钟彦伟, 成军, 施双双, 赵景民, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞. HBsAg 人源噬菌体单链抗体的筛选及其在临床治疗和诊断中的应用. *中华实验和临床病毒学杂志* 2002;16:223-225
- 110 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前 -S2 基因酵母表达载体的构建及表达. *胃肠病学和肝病杂志* 2002;11:222-224
- 111 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 张玲霞, 王业东, 成军. 乙肝病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. *军医进修学院学报* 2003;24:49-51
- 112 吴欣, 黄祖瑚, 成军, 吴兴柳, 董菁, 陆北川. 白介素 - 12 和白介素 - 18 质粒对 HBcAg DNA 疫苗诱导小鼠(H-2d)体液免疫应答的影响. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2002;22:284-287
- 113 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239
- 114 Hildt E, Urban S, Eckerskorn C, Hofschneider PH. Isolation of highly purified, functional carboxy-terminally truncated hepatitis B virus middle surface protein activators from eucaryotic expression systems. *Hepatology* 1996;24:502-507
- 115 Hildt E, Urban S, Hofschneider PH. Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene* 1995;11:2055-2066
- 116 Caselmann WH. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 1):34-37
- 117 Hildt E, Urban S, Lauer U, Hofschneider PH, Kekule AS. ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene* 1993;8:3359-3367
- 118 Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 1992;66:5284-5289
- 119 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒前 - 前 -S 基因的界定. *世界华人消化杂志* 2003;11:000-000
- 120 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒前 -X 基因的初步研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:000-000
- 121 Meyer M, Caselmann WH, Schluter V, Schreck R, Hofschneider PH, Baeuerle PA. Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. *EMBO J* 1992;11:2991-3001
- 122 Zhang Y, Peng Z, Qiu G, Wang Z, Gu W. Overexpression of cyclin A in hepatocellular carcinoma and its relationship with HBx gene integration. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002;24:353-355
- 123 Tsuei DJ, Chang MH, Chen PJ, Hsu TY, Ni YH. Characterization of integration patterns and flanking cellular sequences of hepatitis B virus in childhood hepatocellular carcinomas. *J Med Virol* 2002;68:513-521
- 124 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Qiu JW. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl* 2002;4:209-212
- 125 Wang Y, Wu MC, Sham JS, Tai LS, Fang Y, Wu WQ, Xie D, Guan XY. Different expression of hepatitis B surface antigen between hepatocellular carcinoma and its surrounding liver tissue, studied using a tissue microarray. *J Pathol* 2002;197:610-616
- 126 Cheung ST, Chen X, Guan XY, Wong SY, Tai LS, Ng IO, So S, Fan ST. Identify metastasis-associated genes in hepatocellular carcinoma through clonality delineation for multinodular tumor. *Cancer Res* 2002;62:4711-4721
- 127 Li Y, Tang Z, Ye S, Liu Y, Chen J, Xue Q, Huang X, Chen J, Bao W, Yang J, Gao D. Establishment of human hepatocellular carcinoma cell line with spontaneous pulmonary metastasis through in vivo selection. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:601-605
- 128 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:395-403
- 129 Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002;9:243-257
- 130 Kiss A, Lotz G, Kaposi NP, Schaff Z. Hepatitis viruses and hepatocarcinogenesis. *Orv Hetil* 2002;143:83-86
- 131 Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Chen J, Gao DM, Bao WH. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001;7:630-636
- 132 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114

- 133 Gao FG, Sun WS, Cao YL, Zhang LN, Song J, Li HF, Yan SK. HBx-DNA probe preparation and its application in study of hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1998;4:320-322
- 134 Dandri M, Burda MR, Burkle A, Zuckerman DM, Will H, Rogler CE, Greden H, Petersen J. Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation. *Hepatology* 2002;35:217-223
- 135 Yokosuka O, Chiba T. Mechanisms of hepatocarcinogenesis by hepatitis B virus(HBV) infection. *Nippon Rinsho* 2001;59 (Suppl 6):50-54
- 136 Matsumoto Y, Fujii H, Matsuda M, Kono H. Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma: diagnosis and clinical significance. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2001;8:435-440
- 137 Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1162-1168
- 138 Kajino K, Yamamoto T, Hayashi J, Umeda T, Takahara T, Hino O. Recombination hot spot of hepatitis B virus genome binds to members of the HMG domain protein family and the Y box binding protein family; implication of these proteins in genomic instability. *Intervirology* 2001;44:311-316
- 139 Lotz G, Kiss A, Novak PK, Sobel G, Schaff Z. Hepatitis viruses and hepatocarcinogenesis. *J Physiol Paris* 2001;95:417-422
- 140 Kim MY, Park E, Park JH, Park DH, Moon WS, Cho BH, Shin HS, Kim DG. Expression profile of nine novel genes differentially expressed in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2001;20:4568-4575
- 141 Kawai S, Yokosuka O, Imazeki F, Maru Y, Saisho H. State of HBV DNA in HBsAg-negative, anti-HCV-positive hepatocellular carcinoma: existence of HBV DNA possibly as nonintegrated form with analysis by Alu-HBV DNA PCR and conventional HBV PCR. *J Med Virol* 2001;64:410-418
- 142 Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2001;82:77-100
- 143 Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- 144 Sarin SK, Thakur V, Guptan RC, Saigal S, Malhotra V, Thyagarajan SP, Das BC. Profile of hepatocellular carcinoma in India: an insight into the possible etiologic associations. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:666-673
- 145 Xiong Y, Jia Y, Wang H, Liu G, Ren H, Zhuo Z, Zhang D. Hepatitis B virus transgenic mice for the model of anti-hepatitis B virus drug study. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:19-21
- 146 Wang PC, Hui EK, Chiu JH, Lo SJ. Analysis of integrated hepatitis B virus DNA and flanking cellular sequence by inverse polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001;92:83-90
- 147 Hwang LY, Ross MW, Zack C, Bull L, Rickman K, Holleman M. Prevalence of sexually transmitted infections and associated risk factors among populations of drug abusers. *Clin Infect Dis* 2000;31:920-926
- 148 Chen WN, Oon CJ, Leong AL, Koh S, Teng SW. Expression of integrated hepatitis B virus X variants in human hepatocellular carcinomas and its significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:885-892
- 149 Livezey KW, Negorev D, Simon D. Hepatitis B virus-transfected Hep G2 cells demonstrate genetic alterations and de novo viral integration in cells replicating HBV. *Mutat Res* 2000;452:163-178
- 150 Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Paterlini-Brechot P. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol* 2000;10:211-231

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

• 消 息 •

欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica,EM)》和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal)收录。国内被以下检索系统收录,分别为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊之一),中国学术期刊文摘,中国生物医学文献光盘数据库,中文科技资料目录医药卫生,解放军医学图书馆CMCC系统,中国医学文摘外科学分册(英文版),中国医学文摘内科学分册(英文版),国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。世界华人消化杂志®(原名新消化病学杂志)1995年度,1998年度,1999年度,2000年度2001年度,分别被评为山西省一级期刊。中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2001年度世界华人消化杂志®总被引频次6468,影响因子3.733,即年指标0.747,他引总引比0.2,海外作者论文比0.012,地区分布数29,基金和资助论文比例0.176,指标综合加权评分76.96。世界华人消化杂志®大16开,200页,月刊,定价24.00元/期,邮发代号82-262。E-mail: wejd@wjgnet.com <http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗

江学良

江学良, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 山东省济南市 250031
江学良, 男, 1967-08-26 生, 山东省安丘市人, 汉族, 医学博士, 科技部科技期刊评审专家, 中英国际炎症性肠病研究中心及济南军区总医院消化内镜中心负责人, 世界华人消化大会共同秘书长, 《Inflammatory Bowel Disease》, 《世界华人消化杂志》, 《中华腹部疾病杂志》等 8 家杂志常务编委和编委, 编著《溃疡性结肠炎的现代诊疗与进展》等专著 2 部, 在《World Journal of Gastroenterology》等杂志发表论文 50 篇, 5 篇被美国 SCI 收录, 主要研究方向为溃疡性结肠炎, 获军队及省部级科技成果奖 6 项, 应邀在世界消化大会、世界华人消化大会等作《中国溃疡性结肠炎研究》的大会报告, 山东省卫生厅青年基金项目, No.2001CA2EFB2
项目负责人: 江学良, 250031, 山东省济南市师范路 25 号, 中国人民解放军济南军区总医院消化科, chfjxl@jn-public.sd.cninfo.net
电话: 0531-8381896
收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2003-07-01

摘要

溃疡性结肠炎的诊断和治疗对于临床医生仍然是一个挑战。诊断方面, 因为该病缺乏特异的诊断指标, 必须强调排除性和综合性的原则, 要做到这些有时是非常困难的。治疗方面, 由于该病病因和发病机制目前还不完全清楚, 因此治疗缺乏特异性, 对如何减少复发以及提高难治性患者的疗效仍然是一个难题。而在我国, 没有一个适合我国国情的规范化治疗方案则是最突出的问题。本文结合我们自己的工作, 提出了在分型基础上进行个体化规范化治疗的建议, 以期引起对这个问题的重视和探讨, 形成具有中国特色的创新性治疗方案。

江学良. 重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1081-1082
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1081.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)在欧美等国家相当常见, 诊断和治疗已经非常规范。但在我国, UC 的诊断和治疗对于临床医生仍然是一个挑战^[1-5]。

1 诊断

因为缺乏特异的诊断指标, 必须强调排除性和综合性的原则, 而要排除所有原因明确的结肠疾病, 仅仅是排除感染性疾病这一类, 即使对综合性大医院的消化病专科医生来说, 有时也是非常困难的。过去认为该病在我国少见, 对其重视不够, 尽管我国在 1956 年就有了关于 UC 的病例报道, 但直到 1978 年才参照国外标准制定了第一个《特发性溃疡性结肠炎诊断及治疗标准(草案)》, 该标准在当时对规范 UC 的诊断起到了一定的作用, 但对于鉴别诊断的要求欠明确, 组织学改变描述不够具体, 1993 年又对该标准作了新的修

订, 国内还在 1987 年和 1992 年分别制定了该病的中医标准和中西医结合标准, 这些标准对规范诊断起了一定的积极作用^[3]。但从国内文献报道的 2 万多例临床资料来看, 仍有相当一部分未能严格按此标准执行。当然, 该标准在黏膜活检诊断标准、疗效标准等方面还存在不足, 特别在治疗方面缺少一个规范化建议, 使本病的治疗没有一个共同的尺度。为此, 中华医学会 2000 年在成都开会提出了《对炎症性肠病诊断治疗规范的建议》^[6], 与 1993 年标准相比, 主要修订内容为: 增加了黏膜病理学检查缓解期的表现, 使病理诊断指标更明确, 纠正了因标准模糊、掌握过宽而致溃疡性结肠炎诊断过松的现象。将疗效标准中的“近期治愈”改为“完全缓解”, 更准确反映该病的病程和实质。增加了对“治疗建议”部分, 有利于规范 UC 的治疗方案。希望该建议能得到认真贯彻执行并能广泛应用, 只有这样才既有利于患者诊治, 又有利于学术交流, 并且在应用中使标准更加完善实用, 而准确完整的诊断是个体化、规范化治疗的前提。

2 治疗

由于该病病因和发病机制目前还不完全清楚, 因此治疗缺乏特异性, 存在的一些问题包括: 对于复发和维持缓解的内科治疗; 对少数严重威胁生命的复发性或慢性无缓解病例的治疗; 外科治疗; 对具有广泛病变且合并长期并发症, 如结肠癌的治疗等。在我国, 最突出的问题是没有形成具有中国特色、符合中国国情的规范化治疗方案。例如, 根据我们的统计^[7], 国内单纯采用西药(氨基水杨酸类或/和皮质激素)治疗的仅占 18.6%, 单纯采用中医治疗的占 20.1%, 采用中西医结合治疗的占 59.1%, 手术 1.3%, 其他治疗占 0.9%。也就是说, 我国大部分患者(79.2%)广泛采用中医或中西医结合治疗, 而且所有文献都报道这些不同的治疗方案可以提高疗效, 减轻氨基水杨酸类药物和皮质类固醇类药物副作用, 但因分型不统一, 用方杂乱, 资料之间缺乏可比性, 可重复验证性差, 加之许多药物药理不清, 用药缺乏针对性, 导致疗效并无根本改善, 也没有哪个治疗方案是我国提出并得到国际公认。当然, 造成这些现象的原因是复杂的和多方面的, 比如: 由于缺乏该病的流行病学资料, 我们对该病在国内的发病特点和规律还不完全清楚; 我国的整体科学水平较低, 经济还不够发达, 很难开展多中心随机前瞻性对照研究来统一评价治疗方案, 基本上是各单位及个人各自为政; 诊疗

标准不统一、不严格。为此,我们根据中国 UC 发病特点,提出在分型基础上,进行个体化规范化治疗的建议,本期刊发的3篇相关文章,就是希望引起对这个问题的重视和探讨。

2.1 分型治疗 即根据不同类型的UC采取不同的治疗策略和方案。(1)初发型:我国初发型患者高达34.8%^[7],而且绝大多数为轻中度患者,病变主要局限在直肠,乙状结肠,对这些病例,诊断要慎重,要注意随访,治疗上可采用中药(如鱼腥草^[8]、锡类散)灌肠,或用西药(SASP或5-ASA)栓剂,慎用皮质类固醇类药物,经治疗达到临床完全缓解后,可停药观察,暂不维持治疗;(2)慢性反复发作型:我国UC主要以慢性反复发作型为主(占52.6%)^[7],对该型病变则强调维持治疗的重要性,但由于患者依从性差、经济条件无法承受、医师对此认识不足、药物副反应多等多种原因,维持治疗在国内没有很好落实,特别是长期(>1 a)维持治疗没有引起重视,导致病情反复。我国溃疡性结肠炎92.7%病变在左半结肠(直肠乙状结肠炎或直肠炎占70.20%,降结肠炎占22.50%),而且大部分患者(75.5%)病程<5 a^[7],若能坚持维持治疗,有望降低复发,只要条件许可,尽量采用5氨基水杨酸类药物,我们的研究显示,与SASP相比,国产奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型UC具有疗效高,副反应少,复发低等优点^[9];(3)慢性持续型:该型虽然只占UC的10.7%,却是治疗的难点,因为这些患者要么是氨基水杨酸类药物或皮质类固醇类药物依赖性,要么是药物抵抗性,前者无法停药,而长期用药毒副反应多,后者则药物没有明显疗效。对该型患者如果伴血小板活化及高凝状态,须进行抗凝治疗而不要因患者有便血症状应用传统的促凝药物止血^[4,5]。我们对抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性UC进行了研究^[10],并且根据中国国情,在抗凝治疗的药物选择、剂量应用及给药途径等方面都有所创新^[11,12],但还需进一步增加治疗病例,完善治疗方案。对伴有多药抗性表达的激素抵抗型重度UC则适宜尽早手术。(4)急性暴发型:该型虽然比例最少,只占1.9%,病情却是最危重的。该型患者,静脉激素治疗列为首选,同时加强营养支持等综合治疗,若足量激素(如氢化考地松300 mg/d)治疗7-10 d无效,不要再增加激素剂量,在有监测条件的医院,可采用免疫调节剂环孢素2-4 mg/(kg·d)治疗,也可及时请外科会诊考虑手术治疗,但目前国内一些外

科同道对重症UC的手术较为保守,只作左半或右半结肠切除,结果引起复发需再次手术。

2.2 个体化治疗 即强调分级、分期、分段治疗的原则。分级指疾病的严重程度,分为轻、中、重度,采用不同药物和不同治疗方法;分期指疾病的活动期、缓解期,活动期以控制炎症及缓解症状为主要目标,而缓解期应继续控制发作,预防复发;分段治疗指确定病变范围,以选择不同给药方法。远段结肠炎可用局部治疗,广泛性及全结肠炎或有肠外症状者则以系统性治疗为主。

2.3 规范化治疗 即在分型和个体化治疗的基础上,根据中国人发病特点和规律,制定出相应的治疗方案和标准。在目前阶段,根据我国实际,通过个体化治疗总结经验,发现问题,找出线索,再通过前瞻性研究(采用病例对照研究,队列研究,随机双盲对照研究,交叉设计研究等方法)升华至理论,成为标准的规范化诊治策略,由经验医学上升到循证医学,拿出具有中国特色的举世公认的UC创新治疗方案,这需要我们加强协作,开展多中心研究,真正提高我国在消化化学术研究方面的国际地位^[13]。

3 参考文献

- 1 江学良,王志奎,秦成勇.中国溃疡性结肠炎的研究现状与对策.世界华人消化杂志 2000;8:610-613
- 2 江学良.溃疡性结肠炎的诊断和治疗.世界华人消化杂志 2000;8:332-342
- 3 江学良,权启镇,王志奎.溃疡性结肠炎的诊断、分型及疗效标准.世界华人消化杂志 2000;8:332-334
- 4 江学良.溃疡性结肠炎的治疗.消化病诊断和治疗 2000;1:41-42
- 5 江学良,秦成勇,李国庆.溃疡性结肠炎的其他治疗.世界华人消化杂志 2000;8:341-342
- 6 中华医学会消化病学分会.对炎症性肠病诊断治疗规范的建议.中华内科杂志 2001;40:138-141
- 7 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- 8 江学良,权启镇,孙自勤,王要军,尚瑞莲,齐凤.鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究.世界华人消化杂志 2003;11:1207-1210
- 9 江学良,权启镇,孙自勤,王要军,尚瑞莲,齐凤.奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎的随机对照研究.世界华人消化杂志 2003;11:1211-1213
- 10 江学良,权启镇,孙自勤,王要军,尚瑞莲,齐凤.抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎.世界华人消化杂志 2003;11:1214-1218
- 11 Cui HF, Jiang XL. Treatment of corticosteroid resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heparin. *World J Gastroenterol* 1999;5:448-450
- 12 江学良,刘涛.肝素治疗顽固性溃疡性结肠炎1例.世界华人消化杂志 1999;7:694
- 13 江学良.重视消化系统疾病大样本资料的分析研究总结.世界华人消化杂志 2001;9:864-868

乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析

成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳

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

成军, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制, 出版专著5部, 发表论文及综述300篇. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学学会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫病学学会全国常委、全军医学科学技术委员会传染病与寄生虫病学学会委员.

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

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Cloning and sequence analysis of complete genome of hepatitis B virus from Chinese patients with chronic hepatitis B

Jun Cheng, Jing Dong, Yuan Hong, Yan-Wei Zhong, Yan Liu, Gang Wang, Lin Wang

Jun Cheng, Jing Dong, Yuan Hong, Yan-Wei Zhong, Yan Liu, Gang Wang, Lin Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

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

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

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: To clone and analyze complete genome sequence of hepatitis B virus (HBV) from the serum of Chinese patients with chronic hepatitis B and establish a reference HBV sequence for the study of HBV in China.

METHODS: Long-distant polymerase chain reaction (L-PCR) technique was used to amplify the complete genome of HBV from 2 Chinese patients with chronic hepatitis B. After cloning into the TA vector and sequencing, 5 complete sequences were compared pairwise.

RESULTS: The 5 complete HBV DNA sequences for G376-A6, G376-A7, G683-A1, G683-A2, G683-A3 were composed of 3 125, 3 215, 3 213, 3 182, 3 215 base pairs (bp) and deposited into GenBank by the accession numbers of AF384 372, AF384 371, AF363 963, AF363 962, AF363 961,

respectively. Deletion mutation was observed in the pre-S1 region of the 2 sequences. G683-A2 genome encodes a truncated form of surface protein of HBV that could harbor trans-activation effects. The e/HBcAg coding sequences were well conserved from different strains of HBV. The defected HBV strain in polymerase coding region was observed indicating the co-existence of wild and mutated type of HBV in the serum of the patients with chronic hepatitis B. The X region was well conserved, but there was a variable region in the carboxyl termini.

CONCLUSION: Five complete HBV DNA sequences have been successfully cloned, and could be used as the reference HBV DNA sequence for the study of HBV in Chinese patients with chronic hepatitis B.

Cheng J, Dong J, Hong Y, Zhong YW, Liu Y, Wang G, Wang L. Cloning and sequence analysis of complete genome of hepatitis B virus from Chinese patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1083-1090

摘要

目的: 从中国慢性乙型肝炎患者的血清中, 应用长距离多聚酶链反应技术(L-PCR)技术扩增、克隆乙型肝炎病毒(HBV)的全基因组序列, 建立中国HBV流行株的参考标准序列.

方法: 从2例慢性乙型肝炎患者血清提取DNA, 以L-PCR技术对于3 200 bp的HBV DNA进行扩增, 纯化后克隆到TA载体中进行序列分析. 对于HBV DNA的各个编码基因区进行分析.

结果: 克隆获得的5个HBV DNA全基因序列分别为G376-A6、G376-A7、G683-A1、G683-A2和G683-A3, 全基因序列长度分别为3 125、3 215、3 213、3 182和3 215碱基对(bp), 在GenBank中的注册号分别为AF384372、AF384371、AF363963、AF363962和AF363961. 其中G376-A6、G376-A7来源于同一个患者, G683-A1、G683-A2、G683-A3来源于另一个患者. G376-A6、G683-A2两株病毒在前-S1区存在缺失突变区. 其中G683-A2的羧基末端区存在缺失突变. 来源于不同患者的e/核心抗原蛋白质一级结构序列没有显著的差别, 但来源于同一个患者的HBV基因序列有着明显的同源性. G376-A6、G683-A2两株病毒存在多聚酶蛋白区的缺失突变, 但不在多聚酶蛋白的活性结构区, 因此考虑这种形式的突变尚不会影响到多聚酶的活性. G683-A3株病毒的多聚酶在其羧基末端存在较长的缺失突变区, 使其多聚酶区结构被破坏. 5株病

毒的X蛋白的一级结构序列比较的结果说明其高度保守.但是相对来讲,X蛋白的氨基末端更为保守,羧基末端序列有一定程度的变异.

结论:克隆了HBV DNA中国株的全基因序列,可以作为研究中HBV流行株的参考序列.

成军,董菁,洪源,钟彦伟,刘妍,王刚,王琳.乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析.世界华人消化杂志 2003;11(8):1083-1090

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1083.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)DNA的全基因克隆化早在1979年就已完成^[1].此后,随着1985年多聚酶链反应(PCR)技术的逐步建立和推广,使得从慢性乙型肝炎患者血清中扩增、克隆HBV DNA的基因片段变得非常方便,并逐步成为慢性乙型肝炎患者诊断以及抗病毒疗效判定不可或缺的检测和实验诊断手段^[2-4].同时,对于HBV DNA全长基因序列的研究,使在美国国立生物工程信息学中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)中注册的HBV DNA全基因序列达到200条以上^[5-8].这些数据对于阐明HBV的分子生物学和分子流行病学都产生了积极的影响.随着HBV DNA基因扩增技术的不断进步,获得了大量关于HBV DNA基因序列片段的信息.使得我们认识到乙型肝炎病毒其实是不完全相同的,因此,根据HBV表面抗原决定簇的序列和性质的不同,可以分成不同的血清型(serotype),根据全基因序列的分析又可以分成不同的基因型(genotype).所以,不同慢性乙型肝炎患者血清中的HBV DNA基因序列是不同的,这早已经达成共识^[9-12].对于同一个慢性乙型肝炎患者血清中的HBV DNA序列进行分析的结果却完全出乎意料.同一个慢性乙型肝炎患者血清中的HBV DNA序列不仅不完全相同,而且根本上难以找到序列完全相同的HBV.因此,对于这些序列进行仔细比较,发现来源于同一个患者的HBV DNA序列虽然不同,但是具有很高的同源性,核苷酸序列的差别不超过总核苷酸长度的5%,彼此之间有着显著的遗传相关性.因此,可以将这些基因序列显著相关,而稍有不同的HBV可以看作是一个病毒的种群,这一种群的个体之间序列差别较小,又相互联系,将这种现象称为准种(quasispecies)^[13-16].这种序列不同,有显著相关的HBV组成的种群,其组成和比例又始终处于不断的变动状态,其平衡的结果,除了受到HBV复制的本身的一些因素之外,还要受到HBV感染个体的免疫系统的状态、抗HBV药物的使用等因素的影响^[17-20].准种概念的提出,使我们对于HBV存在的状态的认识有了一个革命性的变革,从个体的认识上升到对于准群的认识,从静态的认识上升到了种群的漂变(shift).这一认知水平的提高具有十分重要的意义,使我们认识到GenBank中收录的大部分HBV DNA基因序列都是分段

克隆的,代表的不是真正存在的HBV DNA的序列,而是由来源于各种HBV DNA片段的一个嵌合体(chimera),而真正这种序列的HBV是不存在的.我们在研究抗病毒疗效与病毒基因变异之间的相互关系的研究中,也不能仅仅从治疗前后单一的或少数几个克隆的序列的分析结果,就判断治疗前后HBV DNA序列的变异,或者与抗病毒疗效之间的关系.无论是HBV DNA全基因序列的分析,还是抗病毒治疗前后HBV DNA序列变化的分析,我们必须有一个对照的标准序列,或者说是参考序列,为了建立HBV DNA中国流行株的全基因序列,我们采取长距离PCR技术从2例慢性乙型肝炎患者的血清中进行了扩增和克隆,得到5个全基因序列,这些序列对于我们了解和研究HBV DNA中国流行株具有十分重要的参考意义.

1 材料和方法

1.1 材料 诊断为病毒性肝炎,乙型,慢性患者2例,诊断均符合2000年《病毒性肝炎防治方案》(西安).临床检测HBsAg、抗-HBc、HBV DNA阳性,其他肝炎病毒标志检测阴性.采集静脉血,蛋白酶消化,饱和酚氯仿(1:1)抽提法提取血清中的HBV DNA, -20℃保存备用^[21-24].

1.2 方法

1.2.1 多聚酶链反应(PCR)扩增目的片段 以甘人宝 et al发表的序列为依据,设计引物序列.其上游引物为:5'-GCC ATG CAG TGG AAT TCC ACA AC -3'(上游引物5'-端位于前S2的第一个鸟嘌呤上游3 nt处),下游引物为:5'-TCT CCA TGT TCG GTG CAG GGT CC -3',目的片段长度约3200 bp. PCR参数如下:94℃预变性1 min, 94℃变性30 s, 68℃退火30 s, 72℃延长30 s, 共35个循环, 72℃再延长10 min^[25-28].

1.2.2 克隆目的片段 将PCR产物在10.0 g/L琼脂糖凝胶中电泳,切取目的片段,玻璃奶法(博大公司)回收PCR产物,与Promega公司所产生pGEM Teasy载体连接过夜.将连接好的重组质粒转入细菌JM109,筛选阳性菌落,提质粒PCR(循环参数同前)、酶切鉴定^[29-36].

1.2.3 DNA测序 根据PCR电泳结果,每例患者选择2、3个扩增产物克隆株测序,由北京赛百盛公司完成.测序结果存入美国生物信息学中心的核苷酸序列数据库GenBank中^[37,38].

2 结果

2.1 乙型肝炎病毒全基因序列 我们在本项研究中,从2例慢性乙型肝炎病毒感染者体内一共获得5株HBV DNA全基因组,基因序列均在GenBank中注册.5个克隆的名称、GenBank注册号,以及全基因组的核苷酸序列长度见表1.虽然各个病毒株全基因序列有一些差别,但总长度在3200 bp左右.G376-A6、G376-A7病毒来源于同一个患者,G683-A1、G683-A2、G683-A3来源于同一个患者.

表 1 5 个乙型肝炎病毒全基因克隆的序列

克隆	GenBank 注册号	大小(bp)
G376-A6	AF384372	3 125
G376-A7	AF384371	3 215
G683-A3	AF363963	3 213
G683-A2	AF363962	3 182
G683-A1	AF363961	3 215

2.2 乙型肝炎病毒表面抗原蛋白质一级结构序列比较 5 株 HBV DNA 编码的表面抗原的蛋白质一级结构序列见图 1. 这些序列包括表面抗原的前 -S1、前 -S2 和 S 区. G376-A6、G376-A7、G683-A3、G683-A2、G683-A1 5 种 HBV 基因所编码的表面抗原蛋白分别为 370 aa、402 aa、402 aa、219 aa、402 aa. 从图 1 的序列中可以看出, G376-A6、G683-A2 两株病毒在前 -S1 区存在缺失突变区. 5 株病毒前 -S2 区序列相当保守, 仅见到前 -S2 区 55 个氨基酸残基的第 16 位上的氨基酸残基有变化, 来源于 G683 患者的 G683-A3 和 G683-A1 克隆为 K, 而不是 R. 5 种 HBV 基因序列, 其中 G683-A2 的羧基末端区存在缺失突变, 根据 HBV 表面抗原的缺失突变与其反式激活结构的特点^[39,40], 可以判定 G683-A2 基因编码的缺失羧基末端 168 个氨基酸残基的截短型(truncated)表面抗原蛋白具有反式激活(trans activation)功能. 来源于同一个患者的 HBV 基因序列有着明显的同源性.

```
G376-A6 MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLG-----
G376-A7 MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWD
G683-A3 MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWD
G683-A2 M-----GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWD
G683-A1 MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWD

G376-A6 -----NQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTV
G376-A7 FNPKNKDHWEANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTV
G683-A3 FNPKNKDHWEAHQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTV
G683-A2 FNPKNKD-----QVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWNPQAQGILTTV
G683-A1 FNPKNKDHWEAHQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTV

G376-A6 PAAPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALL
G376-A7 PAAPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALL
G683-A3 PVAPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALL
G683-A2 PVAPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALI
G683-A1 PVAPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALL

G376-A6 DPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPNME
G376-A7 DPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPNME
G683-A3 DPKVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPNME
G683-A2 DPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPNME
G683-A1 DPKVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPNME
G376-A6 NTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAP
```

```
G376-A7 NTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAP
G683-A3 NTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAP
G683-A2 NTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAP
G683-A1 NTTSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAP

G376-A6 TCPGQNSQSPTSNSHPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFILLLC
G376-A7 TCPGQNSQSPTSNSHPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFILLLC
G683-A3 TCPGQNSQSPTSNSHPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFILLLC
G683-A2 TCPGQNSQSPTSNSH
G683-A1 TCPGQNSQSPTSNSHPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFILLLC

G376-A6 LIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPSTTTTTGPKCTCTIPAQGTGTS
G376-A7 LIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPSTTTTT--GPKCTCTIPAQGTGTS
G683-A3 LIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPSTTTST--GPKCTCTIPAQGTGTS
G683-A2
G683-A1 LIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPSTTTST--GPKCTCTIPAQGTGTS

G376-A6 MFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFWSLSLL
G376-A7 MFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFWSLSLL
G683-A3 MFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWASARFLWELASVRFWSLSLL
G683-A2
G683-A1 MFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWASARFLWELASVRFWSLSLL

G376-A6 VPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPLYNLSPLPLPIFF
G376-A7 VPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPLYNLSPLPLPIFF
G683-A3 VPFVQWFVGLSPLFGFQLYG
G683-A2
G683-A1 VPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPLYNLSPLPLPIFF

G376-A6 CLWVYI
G376-A7 CLWVYI
G683-A3
G683-A2
G683-A1 CLWVYI
```

图 1 5 株病毒编码的表面抗原蛋白质一级结构序列比较.

2.3 乙型肝炎病毒e/核心抗原蛋白质一级结构序列比较 来源于不同患者的 e/ 核心抗原蛋白质一级结构序列没有显著的差别, 但来源于同一个患者的 HBV 基因序列有着明显的同源性. G376-A6、G376-A7 在前 -C 区 A83 位点发生替换突变, 导致 HBeAg 无法表达.

```
G376-A6 -----MDIDPYKEFGASVEL
G376-A7 -----MDIDPYKEFGASVEL
G683-A3 MQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWGMDIDPYKEFGASVEL
G683-A2 MQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWGMDIDPYKEFGASVEL
G683-A1 MQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWGMDIDPYKEFGASVEL

G376-A6 LSFLPSDFFPSVRDLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAI
G376-A7 LSFLPSDFFPSVRDLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAI
G683-A3 LSFLPSDFFPSVRDLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAV
G683-A2 LSFLPSDFFPSVRDLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAI
G683-A1 LSFLPSDFFPSVRDLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAI
```

G376-A6 LCWVELMNLATWVGSNLEDPASRELVSYSVNVNMGLKIRQLLWF
G376-A7 LCWVELMNLATWVGSNLEDPASRELVSYSVNVNMGLKIRQLLWF
G683-A3 LCWVELMNLATWVGSNLEDPASRELVSYSVNVNMGLKIRQLLWF
G683-A2 LCWVELMNLATWVGSNLEDPASRELVSYSVNVNMGLKIRQLLWF
G683-A1 LCWVELMNLATWVGSNLEDPASRELVSYSVNVNMGLKIRQLLWF

G376-A6 HISCLTFGRETVEYLVSFGVWIRTPPAYRPQNAPILSTLPETT
G376-A7 HISCLTFGRETVEYLVSFGVWIRTPPAYRPQNAPILSTLPETT
G683-A3 HISCLTFGRETVEYLVSFGVWIRTPPAYRPQNAPILSTLPETT
G683-A2 HISCLTFGRETVEYLVSFGVWIRTPPAYRPQNAPILSTLPETT
G683-A1 HISCLTFGRETVEYLVSFGVWIRTPPAYRPPYAPILSTLPETT

G376-A6 VVRRRCRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC
G376-A7 VVRRRCRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC
G683-A3 VVRRRCRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRES
G683-A2 VVRRRCRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRES
G683-A1 VVRRRCRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC

图2 5株病毒编码的e/核心抗原蛋白质一级结构序列比较。

2.4 乙型肝炎病毒多聚酶蛋白序列比较 5株HBV的多聚酶蛋白质一级结构序列具有很高的同源性。G376-A6、G683-A2 2株病毒存在缺失突变，但不在多聚酶蛋白的活性结构区，因此考虑这种形式的突变尚不会影响到多聚酶的活性。G683-A3株病毒的多聚酶在其羧基末端存在较长的缺失突变区，使其多聚酶区结构被破坏，这株病毒的多聚酶基因编码产物不具备多聚酶的活性。这样的病毒之所以能够存在，其自身不能编码有效的多聚酶蛋白，尚需要其他病毒株编码的完整的多聚酶的反式辅助。这是HBV多种突变体共存，野生型HBV以反式方式提供缺陷型HBV所需要的条件，辅助缺失突变HBV存在的重要机制，也是HBV存在异质性(heterogeneity)的重要的分子生物学基础^[41-44]。

G376-A6 MPLSYQHFRKLLLLDDAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDNLG
G376-A7 MPLSYQHFRKLLLLDDAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDNLG
G683-A3 MPLSYQHFRKLLLLDDEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDNLG
G683-A2 MPLSYQHFRKLLLLDDAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDNLG
G683-A1 MPLSYQHFRKLLLLDDEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDNLG

G376-A6 NLNVSIPTWTHKVGNTGLYSSTVPVFNPEWQTPSPFHIHLQEDI
G376-A7 NLNVSIPTWTHKVGNTGLYSSTVPVFNPEWQTPSPFHIHLQEDI
G683-A3 NLNVSIPTWTHKVGNTGLYSSTVPVFNPEWQTPSPFHIHLQEDI
G683-A2 NLNVSIPTWTHKVGNTGLYSSTVPVFNPEWQTPSPFHIHLQEDI
G683-A1 NLNVSIPTWTHKVGNTGLYSSTVPVFNPEWQTPSPFHIHLQEDI

G376-A6 INRCQQYVGPLTVNEKRRKLIMPARFYPNITKYLPDKGIKPY
G376-A7 INRCQQYVGPLTVNERRKLIMPARFYPNITKYLPDKGIKPY
G683-A3 INRCQQYVGPLTVNEKRRKLIMPARFYPNITKYLPDKGIKPY
G683-A2 INRCQQYMGPLTVNEKRRKLIMPARFYPNITKYLPDKGIKPY
G683-A1 INRCQQYVGPLTVNEKRRKLIMPARFYPNITKYLPDKGIKPY

G376-A6 YPEHAVNHYFQTRHYLHTLWKAGILYKRETTASFCGSPYSWE
G376-A7 YPEHAVNHYFQTRHYLHTLWKAGILYKRETTASFCGSPYSWE
G683-A3 YPEHAVNHYFKTRHYLHTLWKAGILYKRETTASFCGSPYSWE
G683-A2 YPEHAVNHYFKTRHYLHTLWKAGILYKRETTASFCGSPYSWE
G683-A1 YPEHAVNHYFKTRHYLHTLWKAGILYKRETTASFCGSPYSWE

G376-A6 QELQHGRLVFQTSTRHGDKSFCQSSG-----
G376-A7 QELQHGRLVFQTSTRHGDKSFCQSSGILSRSPVGPCVRSQKQ
G683-A3 QELQHGRLVFQTSTRHGDKSFCQSSGILSRSPVGPCVRSQKQ
G683-A2 QELQ-----QTSTRHGDESFCQSSGILSRSPVGPCVRSQKQ
G683-A1 QELQHGRLVFQTSTRHGDKSFCQSSGILSRSPVGPCVRSQKQ

G376-A6 -----KSGRSGSIRARVHPTTRRSFGVEPSGSGH
G376-A7 SRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTTRRSFGVEPSGSGH
G683-A3 SSGTSSC
G683-A2 SRLGLQPQQGS-----SGRSGSIRARVHPTTRRSFGVEPSGSGH
G683-A1 SRLGLQPQQGSLARGTSGRSGSIRARVHPTTRRSFGVEPSGSGH

G376-A6 IDNGASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSKRQSSSGHVELHHIP
G376-A7 IDNGASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSKRQSSSGHVELHHIP
G683-A3
G683-A2 IDNSA-----LHQSAVRKTAYSHLSTSERQSSSGHVELHNIP
G683-A1 IDNSASGTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSKRQSSSGHVELHNIP

G376-A6 PSSARPQSEGPIILSCWWLQFRNSKPCSDYCLTHIVNLLEDWGPC
G376-A7 PSSARPQSEGPIILSCWWLQFRNSKPCSDYCLTHIVNLLEDWGPC
G683-A3
G683-A2 PSSDRPQSEGPIILSCWWLQFRNSKPCSDYCLSHIVNLLEDWGPC
G683-A1 PSSARPQSEGPIILSCWWLQFRNSKPCSDYCLSHIVNLLEDWGPC

G376-A6 TEHGEHNIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTTESRLVVDQSFS
G376-A7 TEHGEHNIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTTESRLVVDQSFS
G683-A3
G683-A2 TEHGEHNIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTTESRLVVDQSFS
G683-A1 TEHGEHNIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTTESRLVVDQSFS

G376-A6 RGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLWLSLDVSAIFYHIPLH
G376-A7 RGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLWLSLDVSAIFYHIPLH
G683-A3
G683-A2 RGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLWLSLDVSAIFYHIPLH
G683-A1 RGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLWLSLDVSAIFYHIPLH

G376-A6 PAAMPHLLVGSSGLPRYVARLSSTSRNINYNHGTMQDLHDSC
G376-A7 PAAMPHLLVGSSGLPRYVARLSSTSRNINYNHGTMQDLHDSC
G683-A3
G683-A2 PAAMPHLLVGSSGLPRYVARLSSTSRNINYNHGTMQDLHDSC
G683-A1 PAAMPHLLVGSSGLPRYVARLSSTSRNINYNHGTMQDLHDSC

G376-A6 SRNLVSLLLLYKTFRGKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLL
G376-A7 SRNLVSLLLLYKTFRGKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLL
G683-A3
G683-A2 SRNLVSLLLLYKTFRGKLHLYSHPIISGFRKIPMGVGLSPFLL
G683-A1 SRNLVSLLLLYKTFRGKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLL

G376-A6 AQFTSAICSVVRRAPFHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESIFTSI
 G376-A7 AQFTSAICSVVRRAPFHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESIFTSI
 G683-A3
 G683-A2 AQFTSAICSVVRRAPFHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESIFTSI
 G683-A1 AQFTSAICSVVRRAPFHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESIFTSI

G376-A6 TNFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGYVIGSWGTL PQDHIVLK
 G376-A7 TNFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGYVIGSWGTL PQDHIVLK
 G683-A3
 G683-A2 TNFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGYVIGSWGTL PQEHIVQK
 G683-A1 TNFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNFMGYVIGSWGTL PQEHIVLK

G376-A6 IKQCFRKL PVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLY
 G376-A7 IKQCFRKL PVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLY
 G683-A3
 G683-A2 HKQCFRKL PVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLY
 G683-A1 IKQCFRKL PVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLY

G376-A6 ACIQSKQAFTFSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGVCQVFADAT
 G376-A7 ACIQSKQAFTFSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGVCQVFADAT
 G683-A3
 G683-A2 ACIQSKQAFTFSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADAT
 G683-A1 ACIQSKQAFTFSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADAT

G376-A6 PTGWGLAIGHRRMRGT FVAPLPIHTAELLAACFARSRS GAKLIG
 G376-A7 PTGWGLAIGHRRMRGT FVAPLPIHTAELLAACFARSRS GAKLIG
 G683-A3
 G683-A2 PTGWGLAIGHRRMRGT FVAPLPIHTAELLAACFARSRS GAKLIG
 G683-A1 PTGWGLAIGHRRMRGT FVAPLPIHTAELLAACFARSRS GAKLIG

G376-A6 TDNSVVL SRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADDP
 G376-A7 TDNSVVL SRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADDP
 G683-A3
 G683-A2 TDNSVVL SRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADDP
 G683-A1 TDNSVVL SRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADDP

G376-A6 SRGRLGLYRPLLLPFRPTTGRTSLYAVSPSPSHLPARVHFAS
 G376-A7 SRGRLGLYRPLLLPFRPTTGRTSLYAVSPSPSHLPARVHFAS
 G683-A3
 G683-A2 SRGRLGLYRPLLRPLFRPTAGRTSLYAVSPSPSHLPVRVHFAS
 G683-A1 SRGRLGLYRPLLRPLFRPTTGRTSLYAVSPSPSHLPVRVHFAS

G376-A6 PLHVAWRPP
 G376-A7 PLHVAWRPP
 G683-A3
 G683-A2 PLHVAWRPP
 G683-A1 PLHVAWRPP

图 3 5 株病毒编码的多聚酶蛋白质一级结构序列比较。

2.5 乙型肝炎病毒 X 蛋白一级结构序列比较 一般认为 HBV X 蛋白的序列是比较保守的, 从我们的 5 株病毒

的 X 蛋白的一级结构序列比较的结果来看的确如此. 但是, 相对来讲, X 蛋白的氨基末端更为保守, 羧基末端序列有一定程度的变异. 这种变异形式包括多种类型, 如插入突变、缺失突变、点突变等^[45-48]. G683-A3 株病毒的多聚酶区在羧基末端的第 32 个密码子位点发生突变, 导致羧基末端的延长, 与野生型的 X 蛋白序列相比较, 多了 24 个氨基酸残基, 成为最长的 HBV X 蛋白. 其余都是点突变. 来源于同一个患者的 HBV 基因序列有着明显的同源性.

G376-A6 MAARVCCQLDPARDVLCLRPVGAESRRRPVSGPFGTLPS PSSSA
 G376-A7 MAARVCCQLDPARDVLCLRPVGAESRRRPVSGPFGTLPS PSSSA
 G683-A3 MAARVCCQLDPARDVLCLRPVGAESRRRPVSGPFGTLPS PSSSA
 G683-A2 MAARVCCQLDPARDVLCLRPVGAESRRRPVSGPFGTLPS PSSSA
 G683-A1 MAARVCCQLDPARDVLCLRPVGAESRRRPVSGPFGTLPS PSSSA

G376-A6 VPADHGAHLSRLGPLVCAFSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQV
 G376-A7 VPADHGAHLSRLGPLVCAFSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQV
 G683-A3 VPADHGAHLSRLGPLVCAFSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQV
 G683-A2 VPADHGAHLSRLGPLVCAFSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQV
 G683-A1 VPADHGAHLSRLGPLVCAFSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQV

G376-A6 LPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGGEIRLKV F
 G376-A7 LPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGGEIRLKV F
 G683-A3 LPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGGEIRLKV F
 G683-A2 LPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGGEIRLKV F
 G683-A1 LPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGGEIRLKV F

G376-A6 VLGGRHKLVCSPAPCNFF TSA
 G376-A7 VLGGRHKLVCSPAPCNFF TSA
 G683-A3 VLGGRHKLVCSPAHTFSP LPHLMFMSYCSSLQAVPWVALGHGH
 G683-A2 VLGGRHKLVCSPAPCNFF TSA
 G683-A1 VLGGRHKLVCSPAPCNFF TSA

图 4 5 株病毒编码的 X 抗原蛋白质一级结构序列比较。

3 讨论

准种概念是于 1978 年在研究 RNA 噬菌体时提出的, 其概念是物种的基因组 DNA 或 RNA 的碱基序列在统计学上高度一致, 但个体之间又存有差异的一组群体. 其产生的原理是由于 RNA 多聚酶或逆转录酶不具有 3' - 5' 外切酶活性, 校对功能缺如, 从而产生一群存在不同位点点变异的基因组 DNA 或 RNA. 在宿主免疫压力的作用下, 或在药物的干预下, 准种群经过筛选, 遗留优势种群耐受宿主内环境, 并继续变异. 1993 年有学者分别独立的提出 HBV 存有准种的假说, 这是因为虽然 HBV 为 DNA 病毒, 但其生活史中必须经过逆转录阶段, HBV P 区编码的多聚酶具有逆转录酶功能, 而无 3' - 5' 外切酶校对活性, 经宿主免疫筛选, 并去除致死性突变, 遗留的准种群长期在体内存活并

持续变异以适应宿主状况,从而导致感染的慢性化.近年来有少数研究证实了该学说^[49-52].本项研究中,我们克隆了5株HBV的全基因序列,均属于adr血清型,序列同源性分析结果也进一步证实了准种特点的存在.

在我们的另一项研究中发现HBV X区的25个替换突变表现为散在分布,但相对集中于核苷酸序列的35-145 nt (8/25)和315-415 nt (10/25)两个区域,因此导致氨基酸序列的35-36 aa和127-133 aa两区域发生多个点突变^[53-58].X区的缺失突变是相当常见的现象,我们发现15个克隆中有5例(33.3%)发生缺失突变,其集中于核苷酸序列的369-404 nt区,导致123位氨基酸之后的X蛋白羧基端发生缺失,甚至提前终止.既往的研究表明X蛋白具有3个高度保守区,分别处于1-20、58-84和98-140位氨基酸,其反式激活作用可能与这3个区有关;X蛋白的二级结构含有4个 α 螺旋/卷曲,4个 β 片层,有一亮氨酸锌指结构(98-135位氨基酸残基),该结构是X蛋白反式激活作用的基础结构.人为的X蛋白缺失实验研究结果提示羧基端的移框突变或替换突变,可导致反式激活作用消失,尤其以132-145位氨基酸区重要,但也有认为大的缺失突变不影响反式激活作用的报道.我们的研究发现在5个缺失突变的克隆株的突变均影响了X蛋白羧基端的完整性,破坏了亮氨酸锌指结构,均发生在X蛋白基本结构区之内.上述替换突变和缺失突变可能影响X蛋白的反式激活功能.关于突变对反式激活作用的影响的研究正在进行中^[59-64].

早在1990年前后,有学者提出缺陷型HBV概念,他们观察到在慢性HBV感染者体内存在有功能编码域发生变异,导致HBV结构或非结构蛋白失去其功能,从而影响HBV的感染能力和复制能力.我们的初步研究中也观察到P区因突变而使得编码氨基酸序列被提前终止,形成缺陷型HBV.

乙型肝炎病毒基因组编码的蛋白作为反式激活因子,对肝细胞某些基因表达调控的影响,可能是HBV致癌的主要因素.早期研究多集中在整合的病毒DNA编码的HBxAg蛋白的功能上,证实HBxAg蛋白是一种具有广泛活性的反式激活因子,对乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的恶性转化有密切关系;近年研究发现,从肝癌细胞系或肝癌组织中亚克隆出的截短型前-S2/S基因表达产物羧基末端的截短型分子MHBs^t也具有反式激活功能.人们笃信只有整合在肝细胞基因组中的HBV才编码截短型的MHBs^t,在HBV相关性的HCC中具有重要作用.我们第一次在外周血循环中检测到了MHBs^t的存在,对于研究和了解MHBs^t在HCC形成过重的作用具有重要的意义.我们构建了一种含有约500 bp MHBs^{t167}基因的真核表达载体pcDNA3.1(-)-Mt,该基因编码的MHBs 167位氨基酸残基以后的羧基末端截短. pcDNA3.1(-)-Mt瞬时转染COS-7细胞,用前-S2单克隆抗体检测到截短型蛋白MHBs^{t167}的表达,并且

1:32倍稀释还可检测到MHBs^{t167}蛋白阳性.与报告质粒pSV-lacZ共转染COS-7细胞,明显促进 β -gal的表达,证明pcDNA3.1(-)-Mt能增强pSV-lacZ的SV40启动子的功能,编码的MHBs^{t167}是一种反式激活因子,而全长的MHBs无此功能^[65-72].

目前研究表明,MHBs^t的反式激活效应可能与蛋白激酶C(PKC)依赖的信号转导途径有关,前-S2区域与PKC α/β 结合发生磷酸化反应,触发PKC依赖的c-Raf-1/MAP2-激酶信号转导链式反应,结果激活了转录因子如AP-1、NF- κ B、AP-2、SRE、Sp1和c-myc、c-fos启动子,参与病毒感染后的炎症反应和肝细胞癌的发生.MHBs^t蛋白结构的改变,缺失了位于C-末端的膜定位信号,使MHBs^t未能进入分泌途径而在内质网(ER)中滞留,其前-S2区指向胞质区与胞质蛋白相互作用,产生转录激活功能;而全长的MHBs蛋白的前-S2区指向ER腔,进入高尔基复合体而分泌.所以说MHBs^t的反式激活功能依赖于其N-末端前-S2区的胞质定位功能.而缺失突变的范围是决定该截短型分子是否具有反式激活作用的重要影响因素,MHBs^t至少完全缺失蛋白C-末端S区的疏水区Ⅲ,才具有反式激活功能;S区的N-末端疏水区Ⅰ是反式激活所必需的,因为蛋白与膜的结合是转录激活功能所必需的,这段序列被称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TAO)^[73-78].进一步研究表明,MHBs^t的最小反式激活单元定位于4-53氨基酸残基,MHBs^{t53}是最小的转录激活因子,是一种非膜结合类型的MHBs^t,就是说,仅前-S2区(aa 1-55)就足以介导反式效应,说明作为反式激活剂的MHBs^t大小范围是很大的.我们目前正在构建不同截短范围的表达载体,进一步研究MHBs^t的反式激活功能,筛选和克隆其反式激活的靶基因^[79-85].

4 参考文献

- 1 Sninsky JJ, Siddiqui A, Robinson WS, Cohen SN. Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B viral genome. *Nature* 1979;279:346-348
- 2 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, 1997:81-92
- 3 成军, 斯崇文. 转导肝细胞基因治疗研究进展. 中华内科杂志 1993;32:195-197
- 4 成军, 斯崇文. 抗病毒基因治疗研究进展. 中华实验和临床病毒学杂志 1993;7:436-439
- 5 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 中华内科杂志 2000;39:838-839
- 6 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙型肝炎病毒S基因单独和联合白介素-12免疫小鼠诱生的特异性体液和细胞免疫应答. 中华传染病杂志 2000;18:190-191
- 7 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹, 田秀兰. 表面抗原DNA疫苗诱导小鼠体液免疫及抑制转基因鼠表面抗原的产生. 中华内科杂志 2000;39:319-322
- 8 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130-132
- 9 成军, 斯崇文. HBV DNA转染细胞系的建立及应用研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:60-64

- 10 成军. 病毒基因组的反式调控及其在抗病毒基因治疗方案设计中的应用. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:241-244
- 11 成军, 斯崇文. 肝脏疾病基因治疗研究进展. 临床肝胆病杂志 1995;11:1-4
- 12 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素 - 2 基因表达载体的构建及抗乙型肝炎病毒作用. 中华肝脏病杂志 1995;3:67-70
- 13 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 14 成军. 决定乙肝病毒嗜肝特性的分子机制. 国外医学病毒学分册 1995;2:78-81
- 15 成军, 斯崇文, 王勤环, 于敏. 人白介素 - 2 基因转移表达及抗乙型肝炎病毒和诱导 LAK 细胞活性的研究. 中华医学杂志 1995;75:388-391
- 16 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙肝病毒 S 基因单独与白介素 - 12 基因联合免疫小鼠诱生的体液免疫应答. 传染病信息 1999;12:69-71
- 17 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 18 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-A262
- 19 成军. 肝再生增强因子超家族研究进展. 生物学杂志 2000;17:4-6
- 20 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs^s 的反式激活作用. 国外医学病毒学分册 2000;7:190-193
- 21 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 22 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 23 钟彦伟, 成军, 施双双, 董菁, 夏小兵, 刘妍, 李克, 杨继珍. 抗 HBsAg 人源单链抗体的筛选与可溶性抗体的表达. 中国病毒学 2001;16:105-108
- 24 柯亨亨, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹. HBsAg 及其与小鼠白介素 - 18 融合蛋白表达质粒的构建和 DNA 免疫. 中华传染病杂志 2001;19:77-80
- 25 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶基因序列准种与变异特点的研究. 病毒学报 2001;17:270-272
- 26 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 27 成军, 李莉. 胸腺素 $\alpha 1$ 在慢性病毒性肝炎治疗中的应用. 国外医学病毒学分册 2001;8:55-59
- 28 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19:5-6
- 29 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 30 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001;17(增刊):31-35
- 31 成军, 李莉. 阿地福韦在慢性乙型肝炎治疗中的应用. 国外医学病毒学分册 2001;8:85-91
- 32 洪源, 成军. 乙型肝炎病毒 mRNA 转录后剪接的研究进展. 国外医学病毒学分册 2001;8:115-119
- 33 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 34 成军, 朱传琳. 肝炎病毒对双链 RNA 激酶 PKR 的调节作用. 国外医学微生物学分册 2000;23:1-3
- 35 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的结构与调节机制. 中华医学研究杂志 2001;1:122-125
- 36 Zhao H, Cheng J, Si CW. Effects of IL-12 on the immune response in mice inoculated with nucleic acid vaccine expressing S protein of hepatitis B virus. *Chin Med J* 2001;114:47-52
- 37 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 38 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
- 39 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 李莉, 张国庆, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区准种与变异特点的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:264-266
- 40 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 41 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 42 夏小兵, 成军, 杨继珍, 钟彦伟, 王刚, 方洪清, 刘妍, 李克, 董菁. 抗 HBsAg 单链抗体靶向干扰素的构建及原核表达. 中华肝脏病杂志 2002;10:28-30
- 43 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中国公共卫生 2002;18:153-154
- 44 成军. 乙型肝炎病毒基因异质性及准种特点研究的临床意义. 解放军医学杂志 2002;27:112-115
- 45 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 46 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 47 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 48 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的调节机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:15-18
- 49 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 50 钟彦伟, 成军, 王刚, 陈新华, 李克, 李莉, 陈菊梅. 乙肝病毒核心蛋白人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. 免疫学杂志 2002;18:85-88
- 51 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c - myc 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144
- 52 洪源, 成军. 肝炎病毒 DNA 疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:221-223
- 53 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 临床肝胆病杂志 2002;18:17-19
- 54 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 55 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 56 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 57 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
- 58 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H - 2^b 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 59 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 60 成军, 李莉. 拉米夫定在肝脏移植患者乙肝病毒再感染预防与治疗中的应用 - 第 36 届欧洲肝病年会巡礼. 国外医学病毒学分册 2001;8:185-189
- 61 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 62 成军, 李莉. 恩替卡韦及其抗 HBV 效果. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:12-14
- 63 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 64 成军, 李莉. 新型抗乙肝病毒药物氟硫酸苷的作用及机制. 世界感染杂志 2002;2:1-4
- 65 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 66 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242

- 67 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 68 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前C/C基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 69 董菁, 成军, 王勤环, 刘妍, 王刚, 施双双, 夏小兵, 李克, 邵得志, 斯崇文. 乙型肝炎病毒囊膜中蛋白与白介素-18联合基因免疫的实验研究. 中华传染病杂志 2002;20:148-151
- 70 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X蛋白的功能研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:33-36
- 71 王琳, 陆荫英, 成军, 于敏, 李克, 刘妍. 白介素-18逆转录病毒载体的构建及抗乙型肝炎病毒的研究. 解放军医学杂志 2002;27:699-701
- 72 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型HBsAg中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 73 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原/抗体同时阳性患者体内S基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 74 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:130-135
- 75 陆荫英, 成军, 张玲霞. 分子伴侣及其与乙型肝炎病毒的关系. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:177-180
- 76 成军, 李莉. 抗肝炎病毒序贯治疗方案的研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:75-79
- 77 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
- 78 刘妍, 成军, 董菁, 王琳, 王刚, 夏小兵. HBV X蛋白与HCV核心蛋白协同反式激活SV40病毒早期启动子/增强子的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:39-41
- 79 Deng H, Dong J, Cheng J, Huangfu JK, Shi SS, Hong Y, Ren XM, Li L. Quasispecies groups in the core promoter region of hepatitis B virus. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396
- 80 钟彦伟, 成军, 施双双, 赵景民, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞. HBsAg人源噬菌体单链抗体的筛选及其在临床治疗和诊断中的应用. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:223-225
- 81 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 郎振为, 皇甫竞坤, 李莉, 斯崇文. HBsAg中蛋白与IL-18联合核酸免疫HBsAg转基因小鼠的实验研究. 中华微生物与免疫学杂志 2002;22:518-519
- 82 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV核心蛋白与截短型HBV表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 83 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2基因酵母表达载体的构建及表达. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:222-224
- 84 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 张玲霞, 王业东, 成军. 乙肝病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 军医进修学院学报 2003;24:49-51
- 85 吴欣, 黄祖瑚, 成军, 吴兴柳, 董菁, 陆北川. 白介素-12和白介素-18质粒对HBcAg DNA疫苗诱导小鼠(H-2d)体液免疫应答的影响. 南京医科大学学报 2002;22:284-287

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

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®

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

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S区编码基因的界定

董 菁, 成 军

董菁, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
董菁, 男, 1969-02-07生, 河北省徐水县人, 汉族, 博士, 1993年第四军医大学毕业, 主治医师。主要从事乙型肝炎病毒分子生物学与病毒性肝炎治疗的研究。发表论文25篇, 参编专著4部, 获军队科技进步奖1次。
国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人:成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Study on definition of pre-pre-S region in hepatitis B virus genome

Jing Dong, Jun Cheng

Jing Dong, Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070690; and the Key Science and Technology Brainstorm Project of PLA during the 9th five year plan period, No. 98D063; the Start-up Funds for Returned Overseas Students of PLA, No. 98H038; and the Science and Technology Brainstorm Funds for Young Scholars of PLA during 10th five year plan period, No. 01Q138; and the Research and Technology Foundation of PLA during 10th five year plan period, No.01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: To investigate the new open reading frame (ORF) in hepatitis B virus (HBV) genome.

METHODS: The whole HBV genome was amplified by long-distance and accurate polymerase chain reaction (LA-PCR) method from the serum of 2 patients with chronic HBV infection, and then the PCR products were ligated into pGEM Teasy vectors. Five clones of HBV genome were sequenced. Sequences of our finding were compared with other HBV genome sequence deposited in GenBank.

RESULTS: A new ORF was found in HBV genome, just before Pre-S1 region. It was defined as pre-pre-S region. The pre-pre-S ORF was deduced to be translated with Pre-S1, Pre-S2 and S gene in frame. Its amino acids sequence was as the following: MQLIITSKLGIIYILCGRLVFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS. There was a TA-rich region before the ATG of pre-pre-S ORF, indicating a possible promoter for its transcription.

CONCLUSION: There is a new ORF pre-pre-S located upstream to pre-S1 region.

Dong J, Cheng J. Study on definition of pre-pre-S region in hepatitis B virus genome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1091-1096

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)基因组内部结构基因与编码基因之间相互重叠,是基因组序列高度集中利用的一个典型。早期研究中确定了编码病毒蛋白的4个开放读码框架(ORF),本研究通过对于中国HBV感染者的流行病毒株的基因序列进行分析比较,阐明基因组结构的特点,并探索是否存在新型ORF的可能性。

方法: 考虑到HBV基因组序列的准种特点以及多聚酶链反应(PCR)技术的精确度,我们采用的技术是长距离且精确PCR(LA-PCR)技术,根据中国HBV患者的病毒基因序列设计PCR扩增用引物,自慢性HBV感染患者外周血血清中扩增HBV基因组序列,克隆入pGEM Teasy质粒,挑选克隆进行全基因组DNA测序,与其他HBV基因组序列进行比较。

结果: 测序结果5株HBV全基因组核苷酸序列存在一新的ORF,定义为前-前-S区,并发现该区之前存在一TA富集区,提示存在新型启动子的可能性。新界定的前-前-S区ORF编码氨基酸序列为MQLIITSKLGIIYILCGRLVFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS,与前-S1、前-S2和表面抗原主蛋白编码基因框架一致表达。

结论: 在HBV基因组中存在有一新的ORF,命名为前-前-S区。

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(8):1091-1096

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1091.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组全长3200个核苷酸(nt)左右,为部分双链DNA病毒。1979年Gelibert et al发表了HBV基因组的第一个全长核苷酸序列^[1,2],长度为3182 nt,血清型为ayw亚型,并在HBV基因组中界定了4个开放读码框架(ORF),分别命名为S、C、P、X区。之后各种血清型的HBV基因组均被测序成功^[3-6],并储存于GenBank中,我国学者^[7,8]在1984年将中国大陆流行的adr亚型克隆测序成功。4个ORF中表达的氨基酸长度不同,其生物学功能也不相同^[9],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. 我们应用长距离并且精确 PCR 技术(long and accurate PCR, LA-PCR)研究了乙型肝炎患者血清中存在的 HBV 病毒子基因组, 寻找新的 ORF 存在的证据, 并在既往已克隆的 HBV 基因组中得到了证实.

1 材料和方法

1.1 材料 应用的 LA-PCR 试剂成套试剂均购自日本 Takara 公司, pGEM Teasy 载体、玻璃奶试剂、和琼脂糖凝胶为 Promega 公司产品, 细菌 JM109 为本室保存, 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品, 酚、氯仿、氨苄青霉素、X-gal 等均为国产试剂.

1.2 方法

1.2.1 血清来源和 DNA 分离 血清来源: 临床诊断为病毒性肝炎, 乙型患者慢性 2 例, 男女各 1 例, 编号分别为 G683 和 G376, 诊断均符合 2000 年西安会议《病毒性肝炎防治方案》(试行)标准^[10]. 临床检测表面抗原(HBsAg)、e 抗原(HBeAg)、核心蛋白抗体(抗-HBc)阳性. 采集静脉血, 蛋白酶 K 消化 - 饱和酚: 氯仿(1:1)抽提法提取 200 μ L 血清中的 HBV DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.2.2 多聚酶链反应(PCR)扩增目的片段 参考文献[11, 12]中改进的全长 HBV 基因组扩增方法, 设计引物为 P1: 5' - CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3', P2: 5' - CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G-3'. LA-PCR 参数如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延长 5 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延长 10 min.

1.2.3 克隆目的片段 将 PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 切取长度为 3.2 kb 目的片段, 玻璃奶法回收 PCR 产物, 与 pGEM Teasy 载体连接. 将重组质粒转入细菌 JM109, 氨苄青霉素和 X-gal 蓝白斑法筛选阳性菌落, 提取质粒进行限制性内切酶酶切分析鉴定.

1.2.4 DNA 测序 选择经鉴定 pGEM Teasy 内插入 3.2 kb 产物的菌落送检测序, 由上海博亚公司完成. 测序引物为 pGEM Teasy 载体自有的 T7、SP6 测序引物, 同时根据测序结果设计测序引物进行序列测定, 测序引物包括: P1: 5' - AGA TAG GGG CAT TTT GTG GT-3'; P2: 5' - ACG GGA CGT AGA CAA AGG AC-3'; P3: 5' - GGT TTC ACA TTT CCT GTC TT-3'; P4: 5' - CAT ATC CCA TGA AGT TAA GG-3'; P5: 5' - AAC TAC ACG CAG TGC CTC AT-3'. 测序结果存入美国国立卫生院 GenBank 中.

1.2.5 序列分析 应用 DNA SIS 对获得的 5 个克隆进行了 ORF 判读, 并将推断的 ORF 翻译为氨基酸序列, 应用 Vector 6.0 版软件对推定的 ORF 核苷酸序列与氨基酸序列与已经存储在 GenBank 中不同血清型的 HBV 核苷酸

与氨基酸序列进行比较, 血清型包括: adr^[5,8]、ayr^[4]、adw2^[3]、adw4 和 ayw^[1].

2 结果

2.1 HBV 基因组核苷酸序列的测定 以 2 例乙型肝炎患者血清中抽提的 HBV 基因组为模板, 应用 TA 克隆方法, 将患者体内存在的 HBV 基因组克隆到测序载体中. 经验证后, 选择 5 个克隆测序, 分别命名为 G683-A1、G683-A2、G683-A3、G376-A6 和 G376-A7, 获得的 HBV 基因组核苷酸长度分别为 3 215、3 182、3 213、3 215 和 3 125 nt. 测序结果存入美国国立卫生院的 GenBank 中, 序列号为 AF363961、AF363962、AF363963、AF384371 和 AF384372. G683 的 3 株克隆之间的同源性为 97.5%, G376 的 2 株克隆之间的同源性为 96.6%, 5 株之间的同源性为 93.6%.

2.2 核苷酸序列的比较 通过序列分析, 界定了 4 个主要 ORF 的长度, 其中按照 Gelibert 最初定义的 S 区分析 5 株克隆的全 S 区 ORF, 包括前-S1、前-S2 和主蛋白序列. 之后应用 DNA SIS 软件对上述 5 个克隆的 ORF 再分析过程中, 发现在前-S1 区的上游有一未定义的 ORF, 该区长 135 bp, 与前-S1、前-S2 和 S 基因按照同一开放读码顺序(in frame)进行翻译, 我们命名为前-前-S 区. 为了排除选择样本的误差, 在 GenBank 中选择不同血清型的全基因序列进行比较. 选择的 GenBank 序列号为: D12980 (adr^[5]): 3 215 bp; G329616 (adr^[8]): 3 221 bp; X04615 (ayr^[4]): 3 215 bp; X02763 (adw2^[3]): 3 221 bp; Z35717 (adw4): 3 221 bp 和 G329640 (ayw^[1]): 3 182 bp. 结果发现克隆株 G329616、D12980、X04615 存在前-前-S 区 ORF. 前-前-S 基因的起始密码子为 ATG, 而克隆 G329640 为 ATC, 克隆 X02763、Z35717 为 AGG, 由于点替换突变导致表达终止.

对前-前-S 区上游核苷酸序列分析, 发现存在一段 TA 富集区(TA-rich region), 在前-前-S 区起始密码子 ATG 上游有 3 段 TA 富基序列, 无 TATA-box 结构, 为 TATA 样盒(TATA-like box), 分别为: ATG 上游 -8 ~ -13: TATTAT; -17 ~ -22: ATTTAA; -39 ~ -46: AAATATTT.

2.3 氨基酸序列的比较 新的 ORF 长度为 135 bp, 编码 45 个氨基酸残基(aa), 氨基酸残基序列为: MQLIIT SKLGIIYILCGRLV(A)FYIREKLHAVPHFV(A)GHHILGN KSYS, G683 的 3 个克隆在第 20 和第 30 位均编码缬氨酸(V), 而 G376 的 2 株克隆编码为丙氨酸(A). 甘人宝 et al^[8]、Mukaide et al^[5]、Okamoto et al^[4]发表的克隆株的前-前-S 区第 20 和第 30 位均编码 A. 以 G683 的 3 个克隆编码的前-前-S 多肽分析, 该多肽 M_r 5200 左右, 有 19 个疏水 aa, 10 个极性 aa, 5 个强碱性 aa, 1 个半胱氨酸(C); 而 G376 的 2 个克隆编码的前-前-S 多肽有 21 个疏水氨基酸残基. 本研究 5 个克隆的前-前-S- 大蛋白与其他克隆的比较见图 1.

Section 1					
	(1)	10	20	30	49
G683-A1	(1)	MLLIITSKLGIIYILCGRLV	FYIREKLH	AVPHFVGHHILGNKSY	SMGGW
G683-A2	(1)	MLLIITSKLGIIYILCGRLV	FYIREKLH	AVPHFVGHHILGNKSY	----
G683-A3	(1)	MLLIITSKLGIIYILCGRLV	FYIREKLH	AVPHFVGHHILGNKSY	SMGGW
G376-A6	(1)	MLLIITSKLGIIYILCGRLA	FYIREKLH	AAPHFVGHHILGNKSY	SMGGW
G376-A7	(1)	MLLIITSKLGIIYILCGRLA	FYIREKLH	AAPHFVGHHILGNKSY	SMGGW
Gan adr	(1)	MLLIITSKLGIIYILCGRRA	FYIREKLH	AAPHFVGHHILGNKSY	SMGGW
Japan1 adr	(1)	MLLIITSKLGIIYIRCGRLA	FYIREKLH	AALHFVGHHILGNKSY	SMGGW
adw2	(1)	-----	-----	-----	-----MGGW
Poland adw4	(1)	-----	-----	-----	-----MGGW
Japan ayr	(1)	MLLIITSKLGIIYILCGRLA	FYIREKLH	AAPHFVGHHILGNKSY	SMGGW
Gelibert ayw	(1)	-----	-----	-----	-----
Consensus	(1)	MLLIITSKLGIIYILCGRL	FYIREKLH	AAPHFVGHHILGNKSY	SMGGW
Section 2					
	(50)	60	70	80	98
G683-A1	(50)	SSKPRQGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
G683-A2	(48)	--KPRQGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDH--
G683-A3	(50)	SSKPRQGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
G376-A6	(50)	SSKPRQGMGTNLSV	PNPLG-----	-----	-----
G376-A7	(50)	SSKPRQGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
Gan adr	(50)	SSKPRQGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
Japan1 adr	(50)	SSKPRQGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
adw2	(5)	SSKPRKGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
Poland adw4	(5)	SSKPRKGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
Japan ayr	(50)	SSKPRQGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
Gelibert ayw	(1)	-----	-----	-----	-----
Consensus	(50)	SSKPRQGMGTNLSV	PNPLGFFPDHQLDPA	FGANSNNPDWDFNPN	KDHW
Section 3					
	(99)	99	110	120	130
G683-A1	(99)	EAHQVGAGAFGPGFT	PPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
G683-A2	(91)	---QVGAGAFGPGFT	PPHGGLLGWN	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
G683-A3	(99)	EAHQVGAGAFGPGFT	PPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
G376-A6	(69)	--NQVGAGAFGPGFT	PPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
G376-A7	(99)	EAHQVGAGAFGPGFT	PPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
Gan adr	(99)	EAHQVGAGAFGPGFT	PPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
Japan1 adr	(99)	DKIKVGAGDFGPGFT	PPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
adw2	(54)	AANQVGAGAFGPR	LTTPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
Poland adw4	(54)	AANQVGAGAFGPG	LTTPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
Japan ayr	(99)	EAHQVGAGAFGPGFT	PPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
Gelibert ayw	(43)	DANKVGAGAFGLG	FTPPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
Consensus	(99)	EAHQVGAGAFGPGFT	PPHGGLLGWS	PQAQGI	LTTPVAPPPASTNRQSG
Section 4					
	(148)	148	160	170	180
G683-A1	(148)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
G683-A2	(137)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
G683-A3	(148)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
G376-A6	(116)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
G376-A7	(148)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
Gan adr	(148)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
Japan1 adr	(148)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
adw2	(103)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTAFHQ	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
Poland adw4	(103)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTAFHQ	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
Japan ayr	(148)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
Gelibert ayw	(92)	RQPTPISPLRNT	HPQAMQWNSTTFHQ	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
Consensus	(148)	RQPTPISPLRDSHP	QAMQWNSTTFHQAL	LDPRV	RGlyFPAGGSSSGTV
Section 5					
	(197)	197	210	220	230
G683-A1	(197)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
G683-A2	(186)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
G683-A3	(197)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
G376-A6	(165)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
G376-A7	(197)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
Gan adr	(197)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
Japan1 adr	(197)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
adw2	(152)	NPAPNIASHISSIS	ARTGDPVTNMENT	ITSGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
Poland adw4	(152)	NPAPNIASHISSIS	ARTGDPVTNMENT	ITSGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
Japan ayr	(197)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
Gelibert ayw	(141)	NPVLTITASPISSIF	SRTGDPALNMENT	ITSGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
Consensus	(197)	NPVPTTASPISSIF	SRTGDPAPNMENTT	SGFLG	PLLVLQAGFLLTRIL
Section 6					
	(246)	246	260	270	280
G683-A1	(246)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGAPTC	PGQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
G683-A2	(235)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGAPTC	PGQNSQSPTS	NH-----
G683-A3	(246)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGAPTC	PGQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
G376-A6	(214)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGAPTC	PGQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
G376-A7	(246)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGAPTC	PGQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
Gan adr	(246)	TIPQSLHSWWTSLN	FLGAAPTCL	GQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
Japan1 adr	(246)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGAPTC	PGQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
adw2	(201)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGSPVCL	GQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
Poland adw4	(201)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGSPVCL	GQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
Japan ayr	(246)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGAPTC	PGQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
Gelibert ayw	(190)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGTTVCL	GQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM
Consensus	(246)	TIPQSLDSWWTSLN	FLGGAPTC	PGQNSQSPTS	NHSPSCPPICPGYRWM

Section 7									
	(295)	295	300	310	320	330	343		
G683-A1	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST	--	GPCK				
G683-A2	(269)	-----							
G683-A3	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST	--	GPCK				
G376-A6	(263)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTT	TTTGPCK					
G376-A7	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTT	TT--	GPCK				
Gan adr	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PRTSTTST	--	GPCK				
Japan1 adr	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST	--	GPCK				
adw2	(250)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLI	PGSTTTST	--	GPCK				
Poland adw4	(250)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLI	PGSTTTST	--	GPCK				
Japan ayr	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST	--	GPCR				
Gelibert ayw	(239)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLI	PGSTTST	--	GPCR				
Consensus	(295)	CLRRFIIIFLFILLLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLP	PGTSTTST		GPCK				
Section 8									
	(344)	344	350	360	370	380	392		
G683-A1	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWASARFLWELASVRFS							
G683-A2	(269)	-----							
G683-A3	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWASARFLWELASVRFS							
G376-A6	(312)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
G376-A7	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Gan adr	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Japan1 adr	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
adw2	(297)	TCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Poland adw4	(297)	TCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Japan ayr	(342)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Gelibert ayw	(286)	TCMTTAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Consensus	(344)	TCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFS							
Section 9									
	(393)	393	400	410	420	430	441		
G683-A1	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
G683-A2	(269)	-----							
G683-A3	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
G376-A6	(361)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
G376-A7	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
Gan adr	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
Japan1 adr	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
adw2	(346)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFLPLPIFF							
Poland adw4	(346)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFLPLPIFF							
Japan ayr	(391)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
Gelibert ayw	(335)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLPIFF							
Consensus	(393)	WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF							
Section 10									
	(442)	442	448						
G683-A1	(440)	CLWVYI-							
G683-A2	(269)	-----							
G683-A3	(416)	-----							
G376-A6	(410)	CLWVYI-							
G376-A7	(440)	CLWVYI-							
Gan adr	(440)	CLWVYI-							
Japan1 adr	(440)	CLWVYI-							
adw2	(395)	CLWVYI-							
Poland adw4	(395)	CLWVYI-							
Japan ayr	(440)	CLWVYI-							
Gelibert ayw	(384)	CLWVYI-							
Consensus	(442)	CLWVYI							

图1 前-前-S基因编码多肽序列比较结果。

在美国国立卫生院(NIH)的门户网站,应用BLAST软件,以G683-A1前-前-S区编码的推断氨基酸序列MQLIITSKLGIYILCGRLVFIYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS进行搜索,发现存储的5个克隆有前-前-S区多肽序列,分别为BAA32849、S43492、CAA25747、BAA89327和CAB38230,氨基酸序列同源性分别为95%(43/45)、93%(42/45)、93%(42/45)、77%(35/45)和66%(30/45)。克隆BAA89327来自大猩猩^[13]。

3 讨论

1979年, Gelibert et al^[1,2]首次报告了HBV基因组的全序列,并定位了4个ORF。早期的研究学者大多采用将HBV基因组限制性内切酶消化后克隆入载体质粒中,之后进行测序的方法获得的全序列。我国学者^[7,8]于1984

年报道了大陆HBV株(adr)的序列。而后的学者多利用重叠引物PCR法扩增HBV基因,之后对PCR引物直接进行测序以揭示不同基因型、血清型之间的区别。目前在美国国立卫生院的GenBank中,存储了200多HBV全基因组序列,但之后的学者对4个ORF分区的界定并无异议。

1995年,在分子生物学发展的基础上, Gunther et al^[11,12]利用LA-PCR技术,之后以TA克隆法将患者体内的HBV基因组克隆到质粒载体中,该技术核心是应用DNA多聚酶具有3'-5'外切酶功能。该方案保证了扩增片段与原模板之间的高度一致性,又展示了模板多样性,比Gelibert et al的研究方法简便,易于操作。本研究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, G683的3株克隆之间的同源性为

97.5 %, G376 的 2 株克隆之间的同源性为 96.6 %, 5 株之间的同源性为 93.6 %, 各个克隆之间均存有一定差异, 证明患者血清内的序列是不完全相同的, 符合准种表现. 本研究其他报道^[13-22]以及其他学者近期的研究结果^[23-26]证实了 1990 年代初病毒学家^[27,28]提出的 HBV 准种假说.

本研究在分析所获得的 5 个克隆的过程中, 在前-S1 区之前发现还存在一个 ORF, 长度 135 bp, 编码 45 aa, 命名为前-前-S 区. 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-前-S 区 ORF, 另 3 个克隆由于在前-前-S 起始密码子的部位发生点替换突变而导致表达不能. 应用 DNA SIS 软件的蛋白质分析功能分析了前-前-S、前-S1、前-S2 和 S 基因的完全表达产物, 前-前-S 区较以往认为的大蛋白多出一个小的疏水区. 如果前-前-S 区被证明是真实存在的, 那么全 S 蛋白(含前-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-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. 前-前-S 多肽推断氨基酸序列中含有 6 个亮氨酸(L), 分别位于第 3、9、15、19、27、39 位, 前 3 个 L 是否可形成亮氨酸拉链结构, 尚需要进一步证实.

我们应用了 2 种方法来证实前-前-S 区的真实存在. 方法一是在 GenBank 中选择不同血清型的 HBV 基因组全序列, 应用 DNA SIS 软件重新确定其 ORF, 结果发现甘人宝 et al^[8]、Mukaide et al^[5]、Okamoto et al^[4]克隆的 HBV 基因组序列中均存在前-前-S 区 ORF. 方法二是利用 NIH 网站的 BLAST 软件, 将前-前-S 区编码氨基酸序列输入后进行同源性搜索, 结果发现已经存入 GenBank 中的序列中, 有 5 个克隆中含有的氨基酸序列与本研究获得的序列有较高的同源性, 分别为: BAA32849^[29](1998 年)、S43492^[30](1990 年)、CAA25747^[31](1983 年)、BAA89327^[13](2000 年)和 CAB38230 (资料未发表, 1998 年), 氨基酸序列同源性分别为 95 %、93 %、93 %、77 % 和 66 %. 综合上述 2 种方法证实的结果以及我们的资料, 可以肯定前-前-S 区是实际存在的, 来源于不同的地域的 HBV 克隆株均有前-前-S 区的明确编码. 前-前-S 区 ORF 最早在 1983 年 Fujiyama et al^[31]克隆的 adr 亚型的 S 基因产物中被提及, 作者认为存在一身份不明的 ORF(unidentified reading frame (s gene)); 而 Mimms et al^[32]将克隆 S43492 进行再分析后, 认为该段多肽是前-S1 多肽内部, 他们认为的前-S1 长度为 164 aa, 而不是通常认为的 119 aa 或 108 aa. 我们认为多种资料的研究结果证明前-前-S 区的存在, 以往的研究认为该区的编码并不是一种普遍现象, 因而未加以重视. Bruss et al^[33,34]界定了 HBV 表面抗原大蛋白的基因结构之后, 其他学者多认同这一观点, Gerlich et al^[35]或其他教科书均未提及前-前-S 区的存在. 我们分析的结果提示具有前-前-S 区的 HBV 克隆株多来自日本和中国, 欧美学者在最初的研究中获得的样本存在一定的

偏差, 这可能是忽视该区域的原因之一. 另外, 由于目前仍缺乏对 HBV 的大规模分子流行病学资料, 因而早期发现前-前-S 区的学者可能认为一些位点发生变异, 而不认为这是一种主流现象, 但我们自抽取其他学者获得的克隆中发现前-前-S 区, 应当认为前-前-S 区的存在不是一种个别现象, 至少在中国和日本是非常常见的. 由于 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^[36,37]和大蛋白^[38]具有反式激活作用, 这种功能与是表面抗原的多种形式激活癌基因有关^[39], 我们的早期研究已经证明了 HBV 截短型表面抗原中蛋白和 X 蛋白^[40-42]具有强大的反式激活作用, 进一步将研究前-前-S-大蛋白完全表达产物是否具有反式激活作用.

来源于 G683 的三个克隆在前-前-S 多肽的第 20 和第 30 位均编码 V, 而 G376 的 2 株克隆和甘人宝 et al^[8]、Mukaide et al^[5]、Okamoto et al^[4]发表的克隆株在这 2 个位点编码为疏水氨基酸 A, 这印证了我们^[43-45]以前的关于 HBV 在不同患者体内存在个体化变异的报告.

作为完整的基因, ORF 之前应当存在启动子区域, 经过比较发现在前-前-S 区上游存在一段 TA 富集区. 在前-前-S 区起始密码子 ATG 上游有 3 段 TA 富集序列, 无真核基因所特有的 TATA-box 结构, 仅有 TATA 样盒, 分别位于: TA1: TATTAT, ATG 上游 -8 ~ -13 bp; TA2: ATTAAA, 上游 -17 ~ -22 bp; TA3: AAATATTT, 上游 -39 ~ -46 bp. 如继续上溯, 在距前-前-S 区 ATG 上游 -79 ~ -90 bp 处有一长的 TA 区, 为 ATTAAAATTAATTAT. 这段上游序列中是否具有启动子功能, 尚需要验证. 在前-前-S 区内, 存在前-S 区启动子 1(SP I)^[46], 具有典型的 TATA 结构; 在前-S1 区内, 存在 SP II^[47]. SP I 和 SP II 分别调控既往定义的大蛋白和中/主蛋白的表达^[48-50]. 我们的初步分析认为前-前-S 区之前可能存在一启动子区, 如经实验证实其启动子作用, 其功能为调控前-前-S 区与大蛋白的融合表达. 我们已确立了检测启动子活性的方法^[51,52], 进一步的工作将验证 SP III 的存在.

总之, 在 HBV 前-S1 ORF 之前存在有一融合编码的 ORF, 我们将其命名为前-前-S 区. 前-前-S 区之前可能有一新的启动子区域(SP III). 如前-前-S 多肽的表达得到进一步证实, 将对 HBV 感染的检测、疫苗设计、HBV 进入肝细胞机制(受体学说)、表面抗原的表达过程及功能、宿主抗感染机制、HCC 产生机制研究均产生重大影响.

4 参考文献

- 1 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
- 2 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
- 3 Valenzuela P, Quiroga M, Zalvidar J, Gray P, Rutter WJ. The

- nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. In: Fields BN Eds ANIMAL VIRUS GENETICS. New York, Academic Press, 1980:57-70
- 4 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;67:2305-2314
- 5 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
- 6 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
- 7 吴祥甫, 周翎钟, 冯宗铭, 李载平, 夏绍源. 人乙型肝炎病毒 -HBV adr 亚型基因组的克隆和限制酶切图谱. 中国科学 B 辑 1983;2:162-167
- 8 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李载平. 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;5:55-65
- 9 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1997:179-182
- 10 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 11 Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 1995;69:5437-5444
- 12 Preikschat P, Meisel H, Will H, Gunther S. Hepatitis B virus genomes from long-term immunosuppressed virus carriers are modified by specific mutations in several regions. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 10):2685-2691
- 13 Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, Prince AM. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000;267:58-64
- 14 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
- 15 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 16 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123.
- 17 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 18 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 19 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. HBsAg 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 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 21 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325.
- 22 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 23 Cane PA, Mutimer D, Ratcliffe D, Cook P, Beards G, Elias E, Pillay D. Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation. *Antivir Ther* 1999;4:7-14
- 24 Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-707
- 25 Ngui SL, Teo CG. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents. *J Viral Hepat* 1997;4:309-315
- 26 Kojima N, Horike N, Michitaka K, Onji M. In situ detection of mutated hepatitis B virus in microdissected, formalin-fixed liver tissues from patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1999;30:359-65
- 27 Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993;35:40-50
- 28 Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-353
- 29 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-2326
- 30 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940
- 31 Fujiyama A, Miyanoara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K. Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res* 1983;11:4601-4610
- 32 Mimms LT, Solomon LR, Ebert JW, Fields H. Unique preS sequence in a gibbon-derived hepatitis B virus variant. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:186-191
- 33 Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1059-1063
- 34 Bruss V, Thomssen R. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. *J Virol* 1994;68:1643-1650
- 35 Gerlich KM. Structure and Molecular Virology. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, eds. Viral Hepatitis. 2nd ed. Churchill Livingstone, Harcourt Publishers Limited, 1998:77-106
- 36 Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 1992;66:5284-5289
- 37 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 38 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239
- 39 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
- 40 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙型肝炎表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 41 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙型肝炎病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 42 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 43 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 44 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:130-135
- 45 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
- 46 Zhou DX, Yen TS. Differential regulation of the hepatitis B viral surface gene promoters by a second viral enhancer. *J Biol Chem* 1990;265:20731-20734
- 47 Zhou DX, Yen TS. The hepatitis B virus S promoter comprise A CCAAT motif and two initiation region. *J Biol Chem* 1991;266:23416-23421
- 48 Lu CC, Chen M, Ou JH, Yen TS. Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression. *Virology* 1995;206:1155-1158
- 49 Lu CC, Yen TS. Activation of the hepatitis B virus S promoter by transcription factor NF-Y via a CCAAT element. *Virology* 1996;225:387-394
- 50 Xu Z, Jensen G, Yen TS. Activation of the hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1997;71:7387-7392
- 51 刘妍, 成军, 董菁, 王琳, 王刚, 夏小兵. HBV X 蛋白与 HCV 核心蛋白协同反式激活 SV40 病毒早期启动子 / 增强子的研究. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:39-41
- 52 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219

乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定

董菁, 成军

董菁, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
董菁, 男, 1969-02-07生, 河北省徐水县人, 汉族, 博士, 1993年第四军医大学毕业, 主治医师, 主要从事乙型肝炎病毒分子生物学与病毒性肝炎治疗的研究, 发表论文25篇, 参编专著4部, 获军队科技进步奖1次。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Study on definition of pre-X region in hepatitis B virus genome

Jing Dong, Jun Cheng

Jing Dong, Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070690; and the Key Science and Technology Brainstorm Project of PLA during the 9th five year plan period, No. 98D063; the Start-up Funds for Returned Overseas Students of PLA, No. 98H038; and the Science and Technology Brainstorm Funds for Young Scholars of PLA during 10th five year plan period, No. 01Q138; and the Research and Technology Foundation of PLA during 10th five year plan period, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: To identify the pre-X gene in HBV strains of Chinese patients.

METHODS: The whole HBV genome was amplified by long-distance and accurate polymerase chain reaction (LA-PCR) method from the serum of 2 patients with chronic HBV infection, and then the PCR products were cloned into pGEM Teasy vectors. Five clones of HBV genome were sequenced. Sequences of our finding were compared with other HBV genome sequence deposited in GenBank.

RESULTS: Pre-X region was found in the HBV genome of these 5 clones, just upstream to the X gene. The pre-X gene is 168 bp long, and can be translated with X gene in frame. The amino acids sequence of pre-X gene was as the following: MGLGYWSPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCS QPVWSETYRNRLCCPLSQIHLLS.

CONCLUSION: Pre-X region may be a serotype-specific coding gene.

Dong J, Cheng J. Study on definition of pre-X region in hepatitis B virus genome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1097-1101

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒(HBV)基因组存在前-X基因. 乙型肝炎病毒(HBV)基因组内部结构基因与编码基因之间相互重叠, 是基因组序列高度集中利用的一个典型. 早期研究中确定了编码病毒蛋白的4个开放读码框架(ORF), 本研究通过对于中国HBV感染者的流行病毒株的基因序列进行分析比较, 阐明基因组结构的特点, 并探索是否存在新型ORF的可能性.

方法: 考虑到HBV基因组序列的准种特点以及多聚酶链反应(PCR)技术的精确度, 我们采用的技术是长距离且精确PCR(LA-PCR)技术, 根据中国HBV患者的病毒基因序列设计PCR扩增用引物, 自慢性HBV感染患者外周血血清中扩增HBV基因组序列, 克隆入pGEM Teasy质粒, 挑选克隆进行全基因组DNA测序, 与其他HBV基因组序列进行比较.

结果: 测序结果提示来源于2个患者的5株HBV全基因组核苷酸序列在X基因之前存在一ORF, 我们命名其为前-X(pre-X)区. 前-X区编码氨基酸与X蛋白融合表达, 序列为MGLGYWSPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPVVWSETYRNRLCCPLSQIHLLS. 该编码序列仅在adr血清型中有编码表现.

结论: 在HBV基因组中存在有一新的ORF, 命名为前-X区, 该区可能是一种HBV血清型特异性编码区.

董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1097-1101

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1097.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组全长3 200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链DNA病毒. Galibert et al^[1,2]于1979年发表了HBV基因组的第一个全长核苷酸序列, 长度为3 182 nt, 血清型为ayw亚型, 我国学者^[3-5]于1984年报道了中国大陆流行的adr亚型全序列. Galibert et al^[1]最初的研究将HBV基因组划分出4个开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区. 1990年Loncarevic et al^[6]克隆了一株adr血清型的HBV基因组, 发现了前-X基因, 并初步认为是adr血清型特异性的一段序列. Takahashi et al^[7]于1995年的初步研究认为前-X区变异与肝细胞癌(HCC)的形成有关, 之后在1998年发表^[8]的研究报告中发现来源于HCC患者的40个全HBV基

因序列中,有18株具有前-X基因,且均为adr血清型。我们应用长距离并且精确PCR技术(long and accurate PCR, LA-PCR)研究了乙型肝炎患者血清中存在的HBV病毒子基因组,证实前-X基因存在于中国大陆流行HBV株中。

1 材料和方法

1.1 材料 应用的LA-PCR试剂成套试剂均购自日本Takara公司, pGEM Teasy载体、玻璃奶试剂、和琼脂糖凝胶为Promega公司产品, 细菌JM109为本室保存, 蛋白酶K为Merck公司产品, 酚、氯仿、氨苄青霉素、X-gal等均为国产试剂。

1.2 方法

1.2.1 HBV全基因组的克隆与测序 见文献[9, 10]。简言之, 自诊断为病毒性肝炎, 乙型, 慢性^[11]的2例患者采集静脉血, 蛋白酶K消化-饱和酚: 氯仿(1:1)抽提法提取200 μL血清中的HBV DNA。参考文献[12, 13]中改进的全长HBV基因组扩增方法, 设计引物为P1: 5' - CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3', P2: 5' - CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G-3'。PCR法扩增目的片段。玻璃奶法回收PCR产物, 与pGEM Teasy载体连接。将重组质粒转入细菌JM109。选择经鉴定pGEM Teasy内插入3.2 kb产物的菌落送检测序, 由上海

博亚公司完成。测序结果存入美国国立卫生院GenBank中。

1.2.2 核苷酸序列分析 应用DNA SIS对获得的5个克隆进行了ORF判读, 并将推断的ORF翻译为氨基酸序列, 应用Vector 6.0版软件对推定的ORF核苷酸序列与氨基酸序列与已经存储在GenBank中不同血清型的HBV核苷酸与氨基酸序列进行比较, 血清型包括: adr^[4, 14]、ayr^[15]、adw2^[6]、adw4和ayw^[1]。

1.2.3 前-X区氨基酸序列比较 在美国国立卫生院(NIH)生物工程信息中心建立的门户网站, 应用BLAST软件, 以本研究证实的G683-A2编码的前-X区氨基酸序列进行搜索, 以寻找存储于GenBank中的表达前-X区基因的克隆。另将该段氨基酸序列在Vector 6.0版软件进行疏水性分析。

2 结果

2.1 HBV基因组核苷酸序列的测定 以2例乙型肝炎患者血清中抽提的HBV基因组为模板, 应用LA-PCR-TA克隆方法, 将实际存在的HBV基因组克隆到测序载体中。经验证后, 选择5个克隆测序, 分别命名为G683-A1、G683-A2、G683-A3、G376-A6和G376-A7, 获得的HBV基因组核苷酸长度分别为3 215、3 182、3 213、3 215和3 125 nt。测序结果存入美国国立卫生院的GenBank中, 序列号为AF363961、AF363962、AF363963、AF384371和AF384372。

Section 1						
	(1)	10	20	30	46	
ADR G683-A1	(1)	MGLGYWPSPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPVWSETYRNRQLC				
ADR G683-A2	(1)	MGLGYWPSPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPVWSETYRNRQLC				
ADR G683-A3	(1)	MGLGYWPSPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPVWSETYRNRQLC				
ADR G376-A6	(1)	MGLGYWPSPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPVWSKTYRNRQLC				
ADR G376-A7	(1)	MGLGYWPSPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPVWSKTYRNRQLC				
ADR Gan 1984	(1)	MGLGYWPSPPAWNLCGSSADPYCGTPGSLFCSQPVWSKTYRNRQLC				
ADR Janpan1	(1)	-----				
ADW2	(1)	-----				
ADW4 POLAND	(1)	-----				
AYR Japan	(1)	-----				
AYW Gelibert 1979	(1)	-----				
Consensus	(1)	MGLGYWPSPAWNLCGSSADPYCGTPSLFCSQPVWSTYRNRQLC				
Section 2						
	(47)	47	60	70	80	92
ADR G683-A1	(47)	CPLSQIHLLSMAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGPFGT				
ADR G683-A2	(47)	CPLSEIHLLSMAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGPFGT				
ADR G683-A3	(47)	CPLSEIHLLSMAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGPFGT				
ADR G376-A6	(47)	CPLSEIHLLSMAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAESRRRPVSGPFGT				
ADR G376-A7	(47)	CPLSEIHLLSMAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGPFGT				
ADR Gan 1984	(47)	CPLSEIHLLSMAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGPFGP				
ADR Janpan1	(1)	-----MAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGPFGP				
ADW2	(1)	-----MAARLYCQLDPSRDVLCRLPVGAESRGRPLSGPLGT				
ADW4 POLAND	(1)	-----MAARLYCQLDPSRDVLCRLPVGAESRGRPLSGPLGT				
AYR Japan	(1)	-----MAARLCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGPFGP				
AYW Gelibert 1979	(1)	-----MAARLCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGSLGT				
Consensus	(47)	CPLSIHLLSMAARVCCQLDPARDVLCRLPVGAESRGRPVSGPFGT				
Section 3						
	(93)	93	100	110	120	138
ADR G683-A1	(93)	LSPSSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETT				
ADR G683-A2	(93)	LSPSSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETT				
ADR G683-A3	(93)	LSPSSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETT				
ADR G376-A6	(93)	LSPSSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETT				
ADR G376-A7	(93)	LSPSSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETT				
ADR Gan 1984	(93)	LSSPSSSTVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALPFTSARRMETT				
ADR Janpan1	(37)	LSPSSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETT				
ADW2	(37)	LSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARCMTT				
ADW4 POLAND	(37)	LSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARCMTT				
AYR Japan	(37)	LSPSSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARSMETT				
AYW Gelibert 1979	(37)	LSPSPSAVPTDHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETT				
Consensus	(93)	LSPSSSSAVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETT				

Section 4						
	(139)	139	150	160	170	184
ADR G683-A1	(139)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEETR				
ADR G683-A2	(139)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEETR				
ADR G683-A3	(139)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEETR				
ADR G376-A6	(139)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEETR				
ADR G376-A7	(139)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEETR				
ADR Gan 1984	(139)	VNAHQVLPKVLHKSTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEEIR				
ADR Janpan1	(83)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEEIR				
ADW2	(83)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLPAMSTTDLEAYFKDCVFKDWEELGEEIR				
ADW4 POLAND	(83)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLPAMSTTDLEAYFKDCVFKDWEELGEEIR				
AYR Japan	(83)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEEIR				
AYW Gelibert 1979	(83)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEEIR				
Consensus	(139)	VNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEEIR				
Section 5						
	(185)	185	190	200	210	220 230
ADR G683-A1	(185)	LMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFTSA	-----			
ADR G683-A2	(185)	LMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFTSA	-----			
ADR G683-A3	(185)	LMIFVLGGCRHKLVCSPAHATFSPLPNHLMFMSYCSSLQAVPWVAL				
ADR G376-A6	(185)	LKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFTSA	-----			
ADR G376-A7	(185)	LKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFTSA	-----			
ADR Gan 1984	(185)	LKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFTSA	-----			
ADR Janpan1	(129)	LKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFTSA	-----			
ADW2	(129)	LKVFVLGGCRHKLVCAPAPCNFFTSA	-----			
ADW4 POLAND	(129)	LMIFVLGGCRHKLVCAPAPCNFFTSA	-----			
AYR Japan	(129)	LKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFPSA	-----			
AYW Gelibert 1979	(129)	LKVFVLGGCRHKLVCAPAPCNFFTSA	-----			
Consensus	(185)	LKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFFTSA				
Section 6						
	(231)	231	235			
ADR G683-A1	(211)	-----				
ADR G683-A2	(211)	-----				
ADR G683-A3	(231)	GHGH-				
ADR G376-A6	(211)	-----				
ADR G376-A7	(211)	-----				
ADR Gan 1984	(211)	-----				
ADR Janpan1	(155)	-----				
ADW2	(155)	-----				
ADW4 POLAND	(155)	-----				
AYR Japan	(155)	-----				
AYW Gelibert 1979	(155)	-----				
Consensus	(231)					

图1 前-X基因编码多肽序列比较结果。

2.2 核苷酸序列的分析 5株克隆之间的比较提示: G683的3株克隆之间的同源性为97.5%, G376的2株克隆之间的同源性为96.6%。按照Galibert et al^[1]最初定义的X区分析5株克隆的X区ORF, 4株克隆编码155 aa, 一株由于发生终止密码子的替换突变, 导致编码长度延长至179 aa。应用DNA SIS软件对上述5个克隆的ORF再分析过程中, 发现在5株克隆的X区的上游均有一ORF, 该区区长168 bp, 与X基因融合表达。我们为了排除选择样本的误差, 在GenBank中选择不同血清型的全基因序列进行比较, 选择的GenBank序列号为: D12980 (adr^[11]): 3 215 bp; G329616 (adr^[4]): 3 221 bp; X04615 (ayr^[12]): 3 215 bp; X02763 (adw2^[13]): 3 221 bp; Z35717 (adw4): 3 221 bp 和 G329640 (ayw^[1]): 3 182 bp。结果发现克隆株G329616存在前-X区ORF。X04615在前-X区第一起始密码子ATG处由于核苷酸的替换突变而成为TTG, 克隆X02763、Z35717和G329640在前-X区第一起始密码子ATG均编码CTG, 因此不表达前-X多肽。另一adr亚型克隆D12980在第一起始密码子ATG无替换突变, 但在第二起始密码子ATG之前出现替换突变, 而终止了前-X多肽的表达。

2.3 氨基酸序列的比较 前-X多肽氨基酸残基(aa)序列比较结果见图1。新的ORF长度为168 bp, 编码56个

aa, 克隆G683-A2编码的前-X基因推断的氨基酸残基序列为: MGLGYWSPPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFC SQPVWSETYRNRQLCCPLSEIHLLS。G683的3个克隆在第10位编码脯氨酸(P), G376的2个克隆与克隆G329616编码组氨酸(H); G683的3个克隆在第38位均编码谷氨酸(E), 而G376的2株克隆与克隆G329616编码为赖氨酸(K)。以G683-A2编码的前-X多肽分析, 该多肽M_r 6 200, 有15个疏水氨基酸残基, 24个极性氨基酸残基, 5个半胱氨酸(C)。此外, 该多肽还包含7个亮氨酸(L), 分别位于第3、14、29、45、49、54、55位, 以及9个丝氨酸(S)^[16]。

在美国国立卫生院(NIH)的门户网站, 应用BLAST软件, 以G683-A2前-X区编码的推断氨基酸序列进行搜索, 发现存储的19 (18)个克隆有前-X区多肽序列, 氨基酸序列同源性为85-94%。

3 讨论

1979年Galibert et al^[1]首次将HBV基因组全序列测序并发表出来, 当时即定位了4个ORF, 分别为C、P、S、X区。之后我国学者^[3,4]于1980年代解读了大陆HBV流行株(adr)的全基因序列。目前在美国国立卫生院的GenBank中, 存储了200多HBV全基因组序列, 但

多数学者对4个ORF分区的界定并无异议。

本研究利用LA-PCR-以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, G683的3株克隆之间的同源性和为97.5%, G376的2株克隆之间的同源性和为96.6%, 证明患者血清内的序列是不完全相同的, 符合准种表现。本研究其他报道^[17-25]证实了近年其他学者^[26-31]提出的HBV准种假说。

本研究在分析所获得的5个克隆的过程中, 在X区之前发现还存在一个ORF, 长度168 bp, 编码56 aa。以G683-A2编码的前-X多肽分析, 该多肽M_r6 200, 有15个疏水氨基酸, 24个极性氨基酸。应用DNA SIS软件的蛋白质分析功能分析了前-X和X基因的完全表达产物, 前-X区较以往认为的X蛋白多出一个小的亲水区。前-X区编码多肽含有5个C, 可能形成多个二硫键, 易于产生新的二级结构。如果该区被证明是真实存在的, 那么前-X和X蛋白(我们初步命名其为全X蛋白)与X蛋白有不小的差异。前-X多肽含有24个极性氨基酸, 形成一个亲水功能域, 可能影响到整个蛋白的空间构象。在对我们获得的5个克隆与甘人宝 et al^[4]报告的前-X多肽进行比较时发现, G683的3个克隆在第10位编码P, G376的2个克隆与克隆G329616^[4]编码H; G683的3个克隆在第38位均编码E, 而G376的另3个克隆编码K。这印证了我们^[32,33]以前的关于HBV在不同患者体内存在个体化变异的报告。

我们应用了2种方法来证实前-X区的真实存在。方法一是在GenBank中选择不同血清型的HBV基因组全序列, 应用DNA SIS软件重新确定其ORF, 结果发现甘人宝 et al^[4](1984年)揭示的HBV基因组序列中存在前-X区ORF。其他亚型不表达前-X区多是由于前-X区起始密码子ATG发生替换突变所致, 其他亚型的克隆表现为TTG(X04615), 或CTG(克隆X02763、Z35717和G329640)。另一adr亚型克隆D12980保留了第一起始密码子ATG, 但在两个起始密码子之间由于发生替换突变, 而终止了前-X多肽的表达。初步推定前-X区起始密码子处发生的替换突变可能是血清型特异性的。方法二是利用NIH网站的BLAST软件, 将前-X区编码氨基酸序列输入后进行同源性搜索, 结果发现已经存入GenBank中的序列中, 有19个克隆中含有的氨基酸序列与本研究获得的序列有较高的同源性, 分别为来自2组报道, 其中2个克隆是来自同一序列的不同解释, 另17个克隆均来自日本学者^[8]对肝细胞癌(HCC)患者体内存在的HBV基因组分析所获得。我们克隆的氨基酸序列与18例相关克隆的比较, 发现同源性为85-94%。这些克隆的共性为: 一均为adr亚型; 二均克隆自HCC患者。综合上述2种方法证实的结果以及我们的资料, 可以肯定前-X区是实际存在的。

我们认为多种资料的研究结果证明前-X区是事实存在的, 以往的研究认为该区的编码并不是一种普遍现象, 因而未加以重视。Zuckerman et al 或其他教科书

均未提及前-X区的存在, 仍沿用Gelibert et al 建立的ORF划分方法。我们分析的结果提示具有前-X区的HBV克隆株多来自日本和中国, 且均来自adr亚型, 而欧美学者由于选择的样本误差可能是忽视了该区域的主要原因。另外, 由于目前仍缺乏对HBV的大规模分子流行病学资料, 因此早期发现前-X区的学者^[6]可能认为一些位点发生变异, 而不认为这是一种主流现象, 因而未得到重视^[34]。

早在1990年Loncarevic et al^[6]自HCC患者血液中克隆的adr亚型的HBV基因组中提及了前-X区, 作者简单介绍了前-X区的存在; Takahashi et al^[7]于1995年的研究结果认为前-X区与HCC有密切关系。1998年, Takahashi et al^[8]自HCC患者体内克隆了40株HBV全序列, 其中38株为adr亚型, 其中18株含有前-X基因, 作者综合以往的资料, 认为前-X基因与HCC有密切的关系。但上述资料分析的患者病例数较少, 结论需要进一步推敲。我们选择的患者为慢性乙型肝炎患者, 并不是HCC患者。我们搜集的24株编码前-X基因的克隆均为adr亚型, 提示前-X区的存在可能是一种亚型特异性现象。与HBV表面抗原大蛋白^[35-37]一样, X蛋白是一个强的反式激活因子^[38], 该蛋白反式激活作用不仅作用于病毒蛋白启动子, 更可以通过与癌基因的相互作用而调控细胞的分化^[39-41]。根据Takahashi et al^[7,8]的观察, 该区与HCC密切相关, 是否提示全X蛋白较X蛋白有更强的反式激活作用, 还有待于进一步确定。根据针对前-X多肽的氨基酸组成分析, 发现该区域含有多个S, 可能是磷酸化的重要区域, 与细胞内信号转导有关。

作为完整的基因, 以前确定的4个ORF有4个启动子, 分别为S启动子I、II(SP I和SP II), X启动子(XP)和C启动子(CP)^[42-45], 前-X区位于既往定义的XP区。启动子区定义的方法目前仍沿用报告基因表达调控法^[46,47]所确定, 刘妍 et al^[48]以往的研究解释了不同准种克隆对CP的影响, 我们将应用这种方法进一步确定前-X之前是否存在有新的启动子区(XP II?), 并研究HBV异质性^[49]对启动子区功能的影响。

总之, 在HBV X基因之前存在有一融合编码的ORF, 为前-X区; 如前-X多肽的表达得到进一步证实, 将对HBV感染的检测、全X蛋白的功能、HBV的致癌机制的研究均会产生重大影响。我们早先的研究探讨了X蛋白^[50]不同变异株的反式激活作用的强弱, 下一步将探讨全X蛋白的反式激活作用。

4 参考文献

- 1 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
- 2 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

- 3 吴祥甫, 周翊钟, 冯宗铭, 李载平, 夏绍源. 人乙型肝炎病毒-HBV adr 亚型基因组的克隆和限制酶切图谱. 中国科学B辑 1983;2:162-167
- 4 甘入宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李载平. 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;5:55-65
- 5 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1997:179-182
- 6 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940
- 7 Takahashi K, Kishimoto S, Ohori K, Yoshizawa H, Akahane Y, Okamoto H, Mishiro S. A unique set of mutations in the "preX" region of hepatitis B virus DNA frequently found in patients but not in asymptomatic carriers: implication for a novel variant. *Int Hepatol Commun* 1995;3:131-138
- 8 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-2326
- 9 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
- 10 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
- 11 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 12 Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 1995;69:5437-5444
- 13 Preikschat P, Meisel H, Will H, Gunther S. Hepatitis B virus genomes from long-term immunosuppressed virus carriers are modified by specific mutations in several regions. *J Gen Virol* 1999;80:2685-2691
- 14 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
- 15 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;67:2305-2314
- 16 Valenzuela P, Quiroga M, Zalvidar J, Gray P, Rutter WJ. The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. In: Fields BN Eds ANIMAL VIRUS GENETICS. New York, Academic Press, 1980: 57-70
- 17 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
- 18 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 19 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前C/C基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 20 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒X基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 21 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒C基因启动子区异质性检测初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 22 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
- 23 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异特点. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 24 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 25 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前S2序列异质性的初步研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 26 Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993;35:40-50
- 27 Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-353
- 28 Cane PA, Mutimer D, Ratcliffe D, Cook P, Beards G, Elias E, Pillay D. Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation. *Antivir Ther* 1999;4:7-14
- 29 Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-707
- 30 Ngui SL, Teo CG. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents. *J Viral Hepat* 1997;4:309-315
- 31 Kojima N, Horiike N, Michitaka K, Onji M. In situ detection of mutated hepatitis B virus in microdissected, formalin-fixed liver tissues from patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1999;30:359-365
- 32 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
- 33 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原-级结构多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:130-135
- 34 Gerlich KM. Structure and Molecular Virology. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, eds. Viral Hepatitis. 2nd ed. Churchill Livingstone, Harcourt Publishers Limited, 1998: 77-106
- 35 Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 1992;66:5284-5289
- 36 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 37 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239
- 38 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 39 刘妍, 董菁, 成军, 钟彦伟, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟. 乙型肝炎病毒X蛋白及反式激活SV40病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 40 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
- 41 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调c-myc基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144.
- 42 Zhou DX, Yen TS. Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer. *J Biol Chem* 1990;265:20731-20734
- 43 Zhou DX, Yen TS. The hepatitis B virus S promoter comprises a CCAAT motif and two initiation regions. *J Biol Chem* 1991;266:23416-23421
- 44 Lu CC, Chen M, Ou JH, Yen TS. Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression. *Virology* 1995;206:1155-1158
- 45 Chen IH, Huang CJ, Ting LP. Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of hepatitis B virus. *J Virol* 1995;69:3647-3657
- 46 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒前基因组启动子的结构与调节机制. 中华医学研究杂志 2001;1:122-125
- 47 Cheng J. Molecular mechanisms of hepatitis virus-hepatocyte interactions. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S342-S343
- 48 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130.
- 49 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19:5-6
- 50 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王琳, 王刚, 李莉. 乙型肝炎病毒X基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127

羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因1的克隆化研究

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 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

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

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

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Cloning of gene 1 transactivated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus

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

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

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

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

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: To investigate the transactivation effects of C-terminally truncated middle surface protein (MHBst) of hepatitis B virus (HBV) by differential display method. To clone new gene with unknown function that could be transactivated by MHBst with suppression subtractive hybridization (SSH), and pave the way for the study and better understanding of the transactivation effects of MHBst.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify the coding sequence of MHBst, and the expressive vector pcDNA3.1-MHBst was constructed by routine molecular biological method. The differentially expressed genes were screened and identified by SSH method between the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-MHBst and the vector pcDNA3.1, respectively. Bioinformatics techniques were used to search homologously expressed sequence tag (EST) and full-length coding sequence transactivated by MHBst. The mRNA was purified from HepG2 cells and the DNA fragment was amplified by reverse transcription PCR (RT-PCR) technique. The coding se-

quence was analyzed by bioinformatics. The new gene transactivated by MHBst was designated as target gene 1 transactivated by truncated middle surface protein of HBV (TTP1).

RESULTS: The expressive vector pcDNA3.1-MHBst was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. SSH method was employed for the screening and identification of the differentially expressed genes from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-MHBst and pcDNA3.1, respectively. Among the target genes, we identified a new gene with unknown function and deposited its sequence into GenBank. From the homology search, we evaluated this gene as a new gene with unknown function.

CONCLUSION: The gene 1 transactivated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus was identified.

Liu Y, Cheng J, Wang L, Wang JJ, Lu YY, Li K. Cloning of gene 1 transactivated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1102-1106

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒(HBV)羧基末端截短型表面抗原中蛋白(MHBst)的反式激活作用, 利用差异显示技术, 筛选克隆 MHBst 蛋白的反式激活作用的靶基因, 发现新型基因, 为阐明 MHBst 对于肝细胞表达基因谱的影响, 探索新的研究方向。

方法: 利用多聚酶链反应技术(PCR)扩增MHBst的编码基因片段, 构建真核表达载体 pcDNA3.1-MHBst, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 与仅转染空白载体 pcDNA3.1 的 HepG2 细胞进行差异显示, 利用抑制性消减杂交技术(SSH)克隆鉴定 MHBst 的反式激活作用的靶基因, 通过生物信息学技术, 确定新基因的序列, 设计序列特异性引物, 利用 HepG2 细胞来源的 mRNA 进行逆转录 PCR (RT-PCR) 扩增, 克隆新基因, 并对于新基因的序列以及编码基因产物序列进行分析。利用生物信息学技术确定 TTP1 基因是新基因。

结果: 构建表达载体 pcDNA3.1-MHBst, 经过序列分析和酶切鉴定正确。转染 HepG2 细胞系, 利用 SSH 技术获得差异表达的基因片段。经对于美国生物工程信息学中心(NCBI)建立的核苷酸序列的数据库(GenBank)检索, 证实这是一个新型基因片段。通过对于同源基因序列的比对, 根据 Kozak 规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确

定新基因的序列, 将这种 MHBst 反式激活的新基因命名为 TTP1, 并在 GenBank 中注册登录。

结论: 克隆并鉴定了乙型肝炎病毒羧基末端截短型表面抗原中蛋白反式激活作用的新型靶基因 TTP1, 为今后研究 MHBst 的反式激活作用, 开辟了新的研究方向和可能。

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8): 1102 - 1106

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1102.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)与肝细胞之间的相互关系非常复杂。HBV 既需要肝细胞中的蛋白质成分的结合与调控, 决定其嗜肝细胞的特性, 同时 HBV 基因组表达的蛋白对于肝细胞的基因表达谱产生影响, 参与 HBV 的致病过程^[1-12]。HBV 编码蛋白由于其细胞内分布和功能的特点, 某些结构形式的病毒蛋白对于肝细胞的基因表达谱具有显著影响。羧基末端截短型的表面抗原中蛋白(MHBst)就是其中的典型代表。具有反式激活作用的MHBst是从肝癌细胞中整合的 HBV DNA 序列中鉴定的, 对于其反式激活作用进行了广泛的研究, 认为 MHBst 是 HBV 感染引发肝细胞癌(HCC)的重要机制^[13-28]。但是, 最近我们从慢性乙型病毒性肝炎患者外周血中也克隆到了 MHBst 的编码基因, 说明 MHBst 编码基因除了与肝细胞基因组整合的存在方式之外, 在外周血中也是存在的。关于外周血中 MHBst 编码基因的发现, 拓展了 MHBst 存在的意义和研究范围^[29-34]。

关于 MHBst 的反式激活作用, 首先在体外实验中以异源性启动子指导的报告基因的表达得到了证实。构建了 MHBst 的表达载体, 与 SV40 早期启动子指导的氯霉素乙酰化转移酶(CAT)的表达载体进行共转染试验, 发现 MHBst 的表达对于 SV40 的启动子活性具有显著的激活作用, 通过抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术的筛选, 我们也筛选到 MHBst 的反式激活作用的靶基因, 而且我们应用 Western blot 杂交技术证实 MHBst 对于肝细胞中的原癌基因 c-myc 的表达上调作用。同时, 我们还克隆、鉴定了一种未知功能的新基因, 命名为羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1(TTP1), 提示 MHBst 反式激活作用具有新的靶位。

1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞及大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(ampersham pharmacia biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech), 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure

PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega)^[35]。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体的构建及细胞转染 MHBst真核表达质粒pcDNA3.1(-)-Mt167由本室构建^[36]。用Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-Mt167 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, 直接提取转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性、定量分析。

1.2.3 双链 cDNA(dscDNA)合成 使用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit 中的试剂, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA。

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

1.2.5 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h。挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(200-800 bp), 测序(上海博亚公司)。应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析。

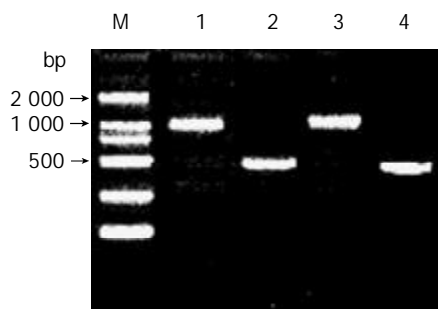
1.2.6 多聚酶链反应扩增 设计引物 5' -ATG GAC CTT CAG GCC GCC GGG GCC CAG GCG-3' 和 5' -TCA ATC TTC AGC ATC GTC AAA CTG TCC TGT-3' 从 HepG2 细胞提取 mRNA, 逆转录后进行 PCR 扩增, 进行 Teasy 载体的克隆化, 测序。

2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 5.64 μg 和 5.20 μg, A260/A280=1.95。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质优量足。

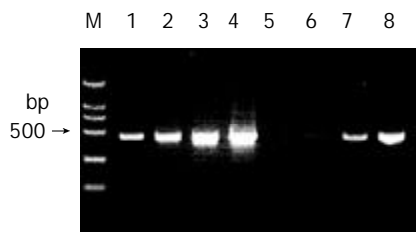
2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤。将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同

的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增,产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定.结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已与接头高效率连接(图 1).



M: DNA Marker; 1: dscDNA 与 adaptor 1 连接, 上游引物为接头部序列, 下游引物为 G3PDH 3'; 2: dscDNA 与 adaptor 1 连接, 上游引物为 G3PDH 5', 下游引物为 G3PDH 3'; 3: dscDNA 与 adaptor 2 连接, 上游引物为接头部序列, 下游引物为 G3PDH 3'; 4: dscDNA 与 adaptor 2 连接, 上游引物为 G3PDH 5', 下游引物为 G3PDH 3' 图 1 接头连接效率分析结果.

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别以消减及未消减 PCR 产物为模板,用 G3PDH 引物进行 PCR 扩增,分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5 μ L 进行电泳鉴定.结果显示:与未消减组 PCR 产物相比,消减组 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 2).



M: DNA Marker; 1-4: 未消减组, 引物为 G3PDH3', 5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组, 引物为 G3PDH3', 5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33 图 2 消减效率分析结果.

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增 杂交产物经两轮 PCR 扩增后,凝胶电泳显示部分差异表达的 cDNA 条带,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 3).

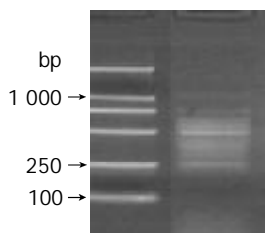


图 3 消减杂交 PCR 产物电泳图.

差异表达基因片段的克隆 菌落 PCR 扩增结果显示为 200-800 bp 大小不等的插入片段(图 4),所获得的 94 个克隆中均含有插入片段.

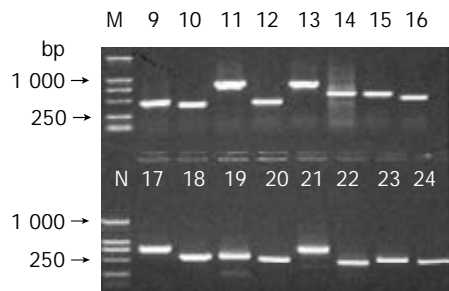


图 4 部分克隆(9-24)菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.5 cDNA 测序与同源性分析初步结果 挑选 50 个克隆测序,与 GenBank 数据库进行初步比较.其中 4 个克隆未检索到任何对应的相似序列,可能代表了某些新基因,进一步的分析鉴定出一个未知功能的新基因,即 TTP1.

2.6 新基因序列 TTP1 新基因长度为 555 nt,四种核苷酸组成分别为 A135、C 147、G 170、T 103, GC 比率占 57%,编码的蛋白由 184 aa 组成,序列如图 5 所示. TTP1 基因序列已经在 GenBank 中注册,注册号为 AF407672.

```

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

```

图 5 TTP1 基因核苷酸序列及编码产物序列.

3 讨论

乙型肝炎病毒 MHBst 具有复杂的分子生物学调节功能. Caselmann et al^[23] 构建了羧基末端缺失 167 aa 的表面抗原中蛋白的表达载体 MHBst167, 首先验证了对于 HBV 本身调节元件的作用. 在以 CAT 作为报告基因的细胞共转染实验研究中, 发现 MHBst167 对于 HBV 的增强子 I 的活性具有促进作用, 但是对于 HBV 的其他调节元件如 X 启动子、S1 和 S2 启动子、增强子 II、核心启动子等没有反式激活作用目前还没有证据表明 MHBst167 与 DNA 之间具有直接的结合作用, 因此认为 MHBst167 主要是通过通过与细胞和内转录因子蛋白的相互作用, 间接产生转录调节作用. 因此, MHBst167 在细胞内的蛋白-蛋白相互作用的研究也十分重要. 在体外的 DNA-蛋白结合的电泳泳动度迁移率试验(EMSA)中, 发现转录因子蛋白 Sp1、AP1、NF- κ B 等都是 MHBst167 反式激活作用的介导因子. 但是 CREB、NF1 或肝特异性因子 C/EBP 与此无关. 这些研究结果表明 MHBst167 是具有多种调节作用的蛋白. 其作用没有显著的肝细胞特异性, 但影响的基因类型在肝细胞的增生和炎症中具有十分重要的作用.

Lauer et al^[27] 从肝癌组织中克隆了羧基末端截短型的前-S2/St, 既往的研究证实前-S2/St 具有激活原癌基因 c-myc、c-fos 的功能, 因此对于 AP1 转录因子的作用进行了研究. 如果在 c-myc 基因启动子的序列中, 缺失掉 AP1 (Jun-Fos) 转录因子蛋白的结合序列, 前-S2/St 激活 c-myc 启动子的活性就消失. 如果在基因的启动子区插入多个 AP-1 的结合序列, 就可以具备前-S2/St 诱导的功能. 抑制 AP-1 的激活, 就可以抑制前-S2/St 的反式激活作用. 除了 AP-1 之外, 前-S2/St 还可以激活另外一个与之无关的转录因子 NF- κ B 和 AP-2 的功能, 表明前-S2/St 可以通过几种不同的机制间接影响细胞基因的转录功能. 因为转录因子 AP-1 的调节涉及到一系列的与肿瘤有关的基因的表达, 因此前-S2/St 的反式激活作用在 HBV 感染相关的 HCC 的发生发展中具有十分重要的作用.

MHBst 的反式激活作用可能与其在细胞内的亚细胞定位有关. Hildt et al^[37] 在昆虫细胞 Sf9 中表达了羧基末端缺失 76 aa 的表面抗原中蛋白 MHBst76, 在蛋白水平上研究了 MHBst76 的生物学功能. 研究发现 MHBst76 在细胞内与内质网(ER)有关, 在高尔基体中停留. MHBst76 蛋白是否经过糖基化修饰对于其反式激活功能没有显著影响. 以大肠杆菌表达的 MHBst76 也同样具有反式激活作用.

Natoli et al^[38,39] 为了研究 MHBst 的结构与反式激活功能相互之间的关系, 进行了一系列的缺失突变分析. 构建一系列的 MHBst 基因, 在腺病毒主要晚期启动子的指导下表达, 利用 c-myc 和 c-fos 的调节序列作为反式激活作用的靶基因进行研究. S 基因的缺失突变研究证实, 疏水区的缺失突变的范围超过第一个内质网插

入信号(ER signal I)时反式激活作用就消失, 说明这一结构对于其反式激活作用非常重要. 发现转录因子 TRE、SRE、NF- κ B 等在 MHBst 的反式激活作用都有重要的地位和作用.

对于 HBV 基因组编码的 MHBst 反式激活作用目前有了公认的认识, 但是其作用的机制研究还处于初步阶段^[40-44]. 虽然已经积累了一些资料, 但是关于 MHBst 的反式激活作用的具体的分子生物学机制目前还有许多环节没有阐明, 研究 MHBst 反式激活作用及其靶基因的方法有多种, 其中之一就是基因表达谱的差异分析技术. 近几年来根据差异表达的原理建立的技术包括差异杂交技术、任意引物差异显示逆转录多聚酶链反应(AP-DD-RT-PCR)、抑制性消减杂交技术、基因芯片(DNA chip)技术等. 相比较而言, 基因芯片的高通量筛选更有吸引力, 但目前商业途径服务的基因芯片的容量一般较小, 只是基因组表达基因类型的一小部分, 而且大部分都是已知功能的基因, 对于以发现新基因为主要目的的研究不合适. 经过进一步的改进, 抑制性消减杂交技术也具有其独特优点. 因为这一技术对于要研究的对象不进行特别的要求, 因此更加适合新基因的克隆化研究. 我们构建了 MHBst 的表达载体, 转染以后在 HepG2 细胞中得到了 MHBst 的表达, 通过与仅转染空白载体的 HepG2 细胞的比较, 发现一个基因片段与目前 GenBank 中收录的已知功能的基因没有同源性, 通过对于 GenBank 中收录的表达序列标签(EST)的比较, 克隆了 MHBst 蛋白反式激活的新基因 TTP1. 关于新基因 TTP1 的结构与功能、表达与调控, 以及其生物学和临床医学意义, 正在研究之中.

4 参考文献

- 1 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 2 皇甫竟坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及接种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 3 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建与表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 4 洪源, 成军. 肝炎病毒 DNA 疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:221-223
- 5 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215
- 6 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 7 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
- 8 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
- 9 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2^b 小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140
- 10 皇甫竟坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 11 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
- 12 Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Brechot P, Brechot C, Kremsdorf D. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus

- X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61:7803-7810
- 13 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:141-144
- 14 Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- 15 Gilbert S, Galarneau L, Lamontagne A, Roy S, Belanger L. The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1. *J Virol* 2000;74:5032-5039
- 16 Gottlob K, Pagano S, Levrero M, Graessmann A. Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer Res* 1998; 58:3566-3570
- 17 Su TS, Hwang WL, Yauk YK. Characterization of hepatitis B virus integrant that results in chromosomal rearrangement. *DNA Cell Biol* 1998;17:415-425
- 18 Caselmann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997;78:1487-1495
- 19 Kumar V, Jayasuryan N, Kumar R. A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5647-5652
- 20 Henkler FF, Koshy R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J Viral Hepat* 1996;3:109-121
- 21 Mita E, Hayashi N, Kamada T. Transactivation function of X gene-cellular gene fusion product or 3' truncated pre S2/S gene cellular gene fusion product from integrated hepatitis B virus DNA. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl):89-93
- 22 Wei Y, Etienne J, Fourel G, Vitvitski-Trepo L, Buendia MA. Hepadna virus integration generates virus-cell cotranscripts carrying 3' truncated X genes in human and woodchuck liver tumors. *J Med Virol* 1995;45:82-90
- 23 Caselmann WH. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 1):34-37
- 24 Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, De Marzio E, Collepardo D, Falco M, Balsano C, Levrero M. Modulation of intracellular signal transduction pathways by the hepatitis B virus transactivator pX. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 1):14-20
- 25 Murakami S, Cheong JH, Kaneko S. Human hepatitis virus X gene encodes a regulatory domain that represses transactivation of X protein. *J Biol Chem* 1994;269:15118-15123
- 26 Tsuei DJ, Hsu TY, Chen JY, Chang MH, Hsu HC, Yang CS. Analysis of integrated hepatitis B virus DNA and flanking cellular sequences in a childhood hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 1994;42:287-293
- 27 Lauer U, Weiss L, Lipp M, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus preS2/St transactivator utilizes AP-1 and other transcription factors for transactivation. *Hepatology* 1994;19:23-31
- 28 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs' 的反式激活作用. *国外医学病毒学分册* 2000;7:190-193
- 29 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. *中华肝脏病杂志* 2001;9:163-165
- 30 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 31 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002; 27:125-127
- 32 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. *解放军医学杂志* 2002;27:128-130
- 33 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:217-219
- 34 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. *中华肝脏病杂志* 2002;10:354-357
- 35 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. *中华传染病杂志* 2002;20:218-221
- 36 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 37 Hildt E, Urban S, Lauer U, Hofschneider PH, Kekule AS. ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene* 1993;8:3359-3367
- 38 Natoli G, Avantaggiati ML, Balsano C, De Marzio E, Collepardo D, Elfassi E, Levrero M. Characterization of the hepatitis B virus preS/S region encoded transcriptional transactivator. *Virology* 1992;187:663-670
- 39 Natoli G, Balsano C, Avantaggiati ML, De Marzio E, Artini M, Collepardo D, Elfassi E, Levrero M. Truncated pre-S/S proteins transactivate multiple target sequences. *Arch Virol Suppl* 1992;4:65-69
- 40 Yamamoto S, Nakatake H, Kawamoto S, Takimoto M, Koshy R, Matsubara K. Transactivation of cellular promoters by an integrated hepatitis B virus DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:111-118
- 41 Nakatake H, Yamamoto S, Matsubara K. Trans-activating function of integrated hepatitis B virus. *Nippon Rinsho* 1993; 51:357-363
- 42 Kwee L, Lucito R, Aufiero B, Schneider RJ. Alternate translation initiation on hepatitis B virus X mRNA produces multiple polypeptides that differentially transactivate class II and III promoters. *J Virol* 1992;66:4382-4389
- 43 Takada S, Koike K. Trans-activation function of a 3' truncated X gene-cell fusion product from integrated hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5628-5632
- 44 Kekule AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 1990;343:457-461

乙型肝炎病毒 X 蛋白激活基因 1 的克隆化与序列分析

刘 妍, 成 军, 王 琳, 王建军, 陆荫英, 李 克

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 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

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

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

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Cloning and identification of human gene 1 transactivated by hepatitis B virus X antigen

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

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

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

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

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: To study the transactivation effects of HBxAg, and clone the target genes of HBxAg transactivating effects, in order to help understand the mechanism of pathogenesis of HBxAg.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) was employed to amplify the coding sequence of HBxAg. The hepatoblastoma cell HepG2 was transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-X, respectively. Total mRNA was purified from the HepG2 cells transfected and suppression subtractive hybridization (SSH) method was used to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. The sequences were searched for homologous DNA sequence from GenBank. The new DNA sequence was confirmed and the full-length coding sequence was identified according to the Kozak rule and the existence of polyadenyl signal sequences. Reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to amplify the new gene by using mRNA from HepG2 cell as the template. The coding sequence for the new gene was deduced according to the nucleotide sequence.

RESULTS: PCR technique was employed to amplify the coding sequence for HBxAg by using pCP10 plasmid containing

whole HBV genome as the template. The recombinant plasmid expressing HBxAg was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. HepG2 cells were transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-X by lipofectamine, respectively. Total mRNA was purified from transfected HepG2 cell, and suppression subtractive hybridization method was used for the screening and identification of differentially expressed genes by these two cell groups. After sequencing, each DNA sequence was compared with the genes deposited in the GenBank and the new gene with no homology with known genes in this database was identified. Electric polymerase chain reaction was conducted for the cloning of the full-length DNA of the new gene and in conjunction with Kozak rule and the existence of polyadenyl signal sequence. RT-PCR technique was used to amplify the new gene, named as XTP1, from the mRNA of HepG2 cells. The sequence for the XTP1 gene was deposited into GenBank, and the accession number is AF488828.

CONCLUSION: A new gene named XTP1 which is transactivated by hepatitis B virus X protein has been successfully cloned by molecular biological methods. These results pave the way for the study of the molecular mechanism of HBxAg transactivating effects and the development of new therapy for chronic hepatitis B.

Liu Y, Cheng J, Wang L, Wang JJ, Lu YY, Li K. Cloning and identification of human gene 1 transactivated by hepatitis B virus X antigen. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1107-1113

摘要

目的: 利用分子生物学技术, 研究乙型肝炎病毒(HBV)X蛋白(HBxAg)的反式激活作用, 克隆 HBxAg 反式激活作用的靶基因, 为进一步探索 HBxAg 的反式激活作用, 以及反式激活作用的靶基因, 阐明 HBV 感染引起慢性肝炎、肝细胞癌(HCC)发生发展的分子生物学机制, 为探索新型预防和治疗技术、寻求新型途径奠定理论基础。

方法: 利用聚合酶链反应(PCR)技术, 扩增 HBxAg 的编码基因, 构建表达载体 pcDNA3.1(-)-X, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 与转染空白载体的 HepG2 细胞对照组分别提取总 mRNA, 并进行抑制性消减杂交(SSH)分析。对于获得的差异表达基因片段序列的同源性基因进行搜索, 确认为与已知的功能基因无同源性之后, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 进行电子拼接, 完成新基因序列的确定。然后自 HepG2 细胞提取总 mRNA, 应用生物信息学技术确定的新基因的序列设计特异性引物, 进行逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术的扩增, 获得阳性克隆之后, 进行鉴定并对克隆的基因及其编码产物的序列进行分析。

结果: PCR技术扩增获得的HBxAg基因序列, 经过限制性酶切鉴定和序列测定证实无误. 转染HepG2细胞并提取足量的mRNA, 利用SSH技术进行分析, 获得的基因片段序列分析结果表明, 其中之一为新型基因片段序列, 与GenBank中注册的已知功能基因序列没有同源性. 通过对EST数据库中注册的基因片段序列同源性的搜索和比对, 电子拼接成功, 根据基因起始密码子的Kozak规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 确定新型基因序列. 从HepG2细胞提取总mRNA, 以RT-PCR技术, 扩增获得该新基因的全基因序列, 并测序证实, 命名为XTP1, 在GenBank中注册, 注册号为AF488828.

结论: 利用分子生物学技术与生物信息学技术相结合, 发现并鉴定、克隆了HBxAg的反式激活作用的新基因XTP1, 并为进一步研究HBxAg的反式激活作用的分子生物学机制和探索新型治疗技术奠定了基础.

刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒X蛋白激活基因1的克隆化与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1107-1113
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1107.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的X基因编码产物(HBxAg)是一种具有反式激活作用的病毒蛋白. 各种血清型和基因型的HBV编码的HBxAg大小不等, 但一般由145-154个氨基酸残基(aa)组成, HBxAg蛋白的氨基末端相对保守, 但羧基末端相对高变^[1-15]. 近年来研究的资料表明, HBV X基因可以发生插入、缺失、碱基颠换、终止密码子的提前出现以及准种(quasispecies)等特点, 在发现HBxAg的初期阶段, 并不清楚其生物学功能. 目前认为其主要的生物学功能就是作为HBV基因组表达的反式调节蛋白, 在HBV基因组的复制和表达过程中具有十分重要的作用^[16-20]. HBxAg的反式激活功能不仅仅限于HBV基因组中不同的调节基因序列, 而且对于其他一系列不同病毒的基因启动子的活性、肝细胞等宿主细胞某些重要基因的表达调节也产生影响. HBxAg对于肝细胞等的基因表达谱的影响在HBV感染的致病机制过程中具有十分重要的地位和作用. 这一作用机制是HBV感染相关性肝细胞癌(HCC)发生发展的重要分子生物学机制. 近年来在细胞凋亡(apoptosis)和细胞周期的分子生物学调控方面的研究进展积累了丰富的资料^[21-24]. 相信HBxAg对于HBV感染肝细胞的细胞凋亡和细胞周期的调控是HBV感染引起HCC的重要的分子生物学基础.

关于HBxAg反式激活的靶基因的研究已经积累了丰富的资料, 使我们对于HBxAg的反式激活作用及其部分机制有了清楚的了解^[25-27]. 但是, 关于HBxAg的反式激活作用的分子生物学机制研究仍然有许多方面知之甚少, 需要利用现代分子生物学技术进行新的开拓. 我们利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive

hybridization, SSH), 对于表达HBxAg载体转染的HepG2细胞进行研究, 阐明了部分HBxAg的反式激活作用的靶基因, 同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了HBxAg蛋白反式激活作用的新的靶基因, 即乙型肝炎病毒X蛋白激活基因1(XTP1), 从而为HBxAg反式激活作用的研究提供新的研究方向.

1 材料和方法

1.1 材料 DNA回收纯化试剂购于Bio 101公司, 克隆载体pCR2.1及细胞转染试剂lipofectamine购于Invitrogen公司, T4 DNA连接酶、限制性内切酶购自Takara公司, 质粒提取试剂及 β -gal检测试剂购自Promega公司. 抑制性消减杂交试剂盒及相关试剂购自Clontech公司.

1.2 方法

1.2.1 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HBxAg基因片段. 采用冷启动方式进行PCR, 参数为94℃预变性1 min, 94℃ 50 s, 55℃ 50 s, 72℃ 40 s, 共30个循环; 72℃延伸10 min. PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 回收纯化500 bp DNA条带.

1.2.2 真核表达载体的构建、纯化和DNA测序 以T-A克隆法, 将目的基因片段插入载体pCR2.1, XhoI单酶切, 电泳鉴定插入基因片段的定向性. 将获得的质粒pCR2.1-X和真核表达载体pcDNA3.1(-)分别用Hind III和Apa I双酶切, 用T4 DNA连接酶进行定向连接, 产物转化DH5 α 细菌, 筛选抗氨苄青霉素阳性菌落; 提取质粒, 酶切及PCR鉴定含有HBxAg基因的阳性克隆, 命名为pcDNA3.1(-)-X. DNA测序由Takara公司完成.

1.2.3 HBxAg蛋白在COS-7细胞中的瞬时表达 试剂盒方法提取质粒以备转染, 以标准方案培养COS-7细胞. 具体转染方法参照说明书进行. 转染48 h后, 收集细胞, 以ELISA方法检测细胞中HBxAg蛋白的瞬时表达.

1.2.4 pcDNA3.1(-)-X与pSV-lacZ共转染COS-7细胞 用0.1-1.2 μg 不同梯度pSV-lacZ质粒转染COS-7, 检测 β -gal的表达, 选择合适的报告质粒用量. 再用一定量的pSV-lacZ和pcDNA3.1(-)-X, 不同比例的脂质体共转染COS-7, 检测 β -gal的表达, 选择最佳脂质体用量. β -gal的检测采用Promega试剂盒方法. 以选择的最佳量脂质体、报告质粒pSV-lacZ和pcDNA3.1(-)、pcDNA3.1(-)-X(本室构建)、pcDNA3.1(-)-X共转染COS-7, 检测 β -gal的表达, 观察不同质粒对pSV-lacZ SV40启动子功能的影响^[28,29].

1.2.5 抑制性消减杂交筛选流程 见文献[30]. 简言之, 以空白载体pcDNA3.1(-)和表达HBxAg的pcDNA3.1(-)-X分别转染HepG2细胞, 提取mRNA, 进行逆转录, 经过SSH的2轮杂交和2轮扩增, 获得差异表达的基因片段. 对于PCR扩增的差异表达基因片段进行TA克隆化, 对于阳性集落进行序列分析, 对于每一条基因片段的序列提交GenBank进行同源基因序列的搜索, 确认所

得基因片段的独特性, 然后依据表达序列标签(EST)数据库中的同源基因片段进行电子拼接, 根据 Kozak 规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列。

1.2.6 新基因的PCR 扩增与序列分析 根据电子拼接序列的新基因序列, 设计新基因的序列特异性的引物, 利用从 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 技术的扩增与克隆技术, 获得阳性克隆并进行序列分析。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 的 HBxAg 基因约 500 bp. 构建的中间载体 pCR2.1-X 用 EcoRI 单酶切, 电泳图谱为两条带: 500 bp(HBxAg 基因片段)、3 900 bp (pCR2.1 空载体), 而以 Hind III 和 Apa I 双酶切所得基因片段定向插入 pcDNA3.1(-)载体后, 酶切和 DNA 测序证实读码框架正确, 保证了其表达产物的正确性。

2.2 HBxAg 蛋白在 COS-7 的瞬时表达 ELISA 方法检测转染 pcDNA3.1(-)-X 的 COS-7 细胞裂解液的 HBxAg 蛋白, 结果为阳性。

2.3 pcDNA3.1(-)-X 编码的 HBxAg 反式激活作用 以 1.2 μ g 3 种质粒与 0.3 μ g 报告质粒 pSV-lacZ 共转染 COS-7 细胞(2 者以 4:1 的比例效果最佳), 脂质体用量 6 μ L. pcDNA3.1(-)-X 实验组酶的表达是空质粒的 4.5 倍, 可见 pcDNA3.1(-)-X 明显促进 β -gal 的表达, 而 pcDNA3.1(-)则无作用, 说明 HBxAg 对 SV40 启动子有反式激活作用, 增强 pSV-lacZ 基因的 β -gal 的表达。

2.4 抑制性消减杂交技术筛选 经过对于转染细胞的差异表达基因序列的比较分析, 发现一段基因序列与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源。

2.5 新基因序列的部分特点 新基因序列命名为 XTP1, 在 GenBank 中的注册号 AF488828, 基因序列的长度为 1 143 bp, 其中 A 为 343、C 为 223、G 为 252、T 为 325, GC 含量为 42%。XTP1 基因序列及其编码产物如图 1 所示。

```

ATG AAT TCT GAG ATG TGG TAC AAG CGT CAC
M N S E M W Y K R H
AGT ATT GCA ATT GGA GAG GTG CCA GCT TGC
S I A I G E V P A C
CGT CTT GTC CAC CGC AGA CAG CTG ACA GAG
R L V H R R Q L T E
GCC AAT GTA GAA GAG ATA TGG AAG TCT ATG
A N V E E I W K S M
ACA TTA TCA TAC TTA CAG AAA ATT CTT GGC
T L S Y L Q K I L G
CTG GAT TCC TTA GAA GAA GTT TTA GAC GTC
L D S L E E V L D V
AAA CTT GTC AAT TCG AAG TTC ATC ATC CAT
K L V N S K F I I H
AAT GTA TAT AGT GTT AGC AAG CAG GGA GTT
N V Y S V S K Q G V

```

```

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

```

*

图1 XTP1 基因序列及其编码产物序列。

3 讨论

关于反式激活作用蛋白的靶基因及其作用的分子生物学机制研究,近年来建立了一系列的技术和方法,例如反式激活蛋白表达载体的构建、细胞转染技术,结合基因表达谱的比较分析技术,如消减杂交技术(subtractive hybridization)、任意引物差异显示逆转录多聚酶链反应(AP-DD-RT-PCR, arbitrary primer differential display reverse transcription polymerase chain reaction)、DNA芯片(DNA chip)、代表性差异显示分析技术(RDA, representative differential assay)以及抑制性消减杂交技术(SSH)等.这些技术各有优缺点.基因芯片技术的发展,使高通量筛选的效率显著提高,但是目前由于技术方面的原因,选择的目的基因类型还只是人类基因组中所表达的基因的一小部分,而且大部分基因只是功能已知的基因,因此尽管基因芯片技术的应用具有广泛的发展前景,但目前至少是选择的目的基因片段偏少、不利于克隆未知功能基因的研究.经过多次改进的SSH技术也具有其他技术所不能比拟的优势,经过2次均等化和2次杂交的SSH技术,假阳性率得到了显著抑制,并适合丰度较低基因的克隆化,由于对于研究对象没有先决条件,因此可能会筛选得到未知功能的新基因.这是SSH技术的突出的优点所在^[31-39].我们应用SSH技术对于反式激活作用蛋白的激活的靶基因进行克隆研究,获得了成功.不仅筛选到HBxAg反式激活作用的已知功能的基因,同时还筛选到了HBxAg蛋白反式激活作用的新型靶基因XTP1,从而为HBxAg的反式激活作用的分子生物学机制研究开辟了新的道路.

近年来肝炎病毒编码产物的反式激活作用得到了空前的重视. HBV基因组编码的X蛋白和羧基末端截短的表面抗原中蛋白(MHBst),以及丙型肝炎病毒(HCV)基因编码的核心蛋白、非结构蛋白3(NS3)、非结构蛋白5A(NS5A)等都已经得到证实具有反式激活作用.但是这些蛋白的反式激活作用的特点和机制有所差别. Tu et al^[40]首次发现X蛋白的反式激活功能,由Vero细胞表达的X蛋白能够增强人干扰素 β (IFN β)调控序列控制下的氯霉素乙酰转移酶(CAT)表达.后来的研究发现X蛋白主要作用于多种基因的增强子和启动子元件,包括HBV的增强子和C基因的启动子、SV40早期增强子/启动子、多种病毒的长末端重复序列(LTR)、人IFN β 基因调控序列,对c-myc、人白细胞抗原(HLA)-DR、主要组织相容性复合体(MHC)-I及白介素8(IL-8)等都有反式激活作用.

对于乙型肝炎病毒的X蛋白功能域的分析阐明了HBxAg结构与功能之间的关系.研究认为至少有一个位于103-117 aa的功能域对其作用非常重要. N末端和C末端对其反式激活都不重要,认为转录活性区位于32-148 aa内,105-148 aa区富含负电荷,是其他反式激活因子的典型激活功能域所具有的特征;32-66 aa区可能为结合功能域. Takada et al 认为C末端134-139 aa

(LGGCRHK)较保守,缺失后X的反式转录活性几乎完全丧失. 成军 et al^[26]认为有3个关键功能域:第46-52 aa(尤其是Pro-46、His-49、His-52),第61-69 aa(尤其是Cys-61、Gly-67、Pro-68、Cys-69),第132-139 aa(尤其是Phe-132、Cys-137、His-139),这3段序列在不同的嗜肝病毒中高度保守,第1段序列形成组氨酸/天冬氨酸功能样特征,第2与第3段序列与Kunitz样丝氨酸蛋白酶抑制剂的Kunitz功能区高度同源. N末端的5-27 aa或C末端143-154 aa缺失,对X蛋白活性没有影响.但也有相互矛盾的结果,可能是X蛋白在不同细胞通过不同因子或途径起作用而导致所需的功能域不同所致^[41-44].

X基因编码蛋白反式激活作用的特点:(1)X蛋白是非特异性的反式激活因子,其作用具有广谱性.来源于许多细胞的X蛋白都具有反式激活作用,如人正常细胞或癌细胞、肝源性或非肝源性细胞,以及其他哺乳动物细胞,甚至昆虫或大肠杆菌等.其激活的靶基因也有多种.(2)X蛋白是对自己或异源基因的增强子或启动子作用,促进转录起始作用.(3)在同一细胞X蛋白对顺式元件似乎有相当的特异性,当顺式元件不同时,其反式激活作用相差悬殊.而且X蛋白的作用具有时间依赖性.(4)X蛋白的作用显示出细胞依赖性,仅有很少启动子在任何细胞中都能被反式激活^[45-47].

乙型肝炎病毒对于肝细胞的作用机制包括对于Ras-Raf-MAPK信号转导途径的影响. Ras是目前所知最保守的一族膜相关的G结合类癌基因,对细胞生长、增生、发育、分化及癌细胞产生起重要作用. 编码产物Ras是一大族小的单聚体GTP/GDP结合蛋白,因为 M_r 21 000 Da,因而也称之为p21. 结合GTP为活性状态,结合GDP为非活性状态.研究表明^[48-50],培养细胞中HBxAg的表达可刺激Ras-GTP复合物的形成,提示HBxAg与Ras信号途径存在一定的关系.现在普遍认为,HBxAg反式激活通过2种模式起作用,第1种模式,认为HBxAg通过与DNA结合蛋白的结合激活大量转录因子和(或)激活转录的基本元件.随着对HBxAg研究的深入,另1种模式被越来越多的学者重视,即认为HBxAg的反式激活是通过刺激细胞内信号转导途径而起作用.在此模式里HBxAg可以激活大量的转录元件,包括AP-1(activator protein 1, c-Jun/c-Fos)、AP-2、AP-3、CRE(cyclic adenosine monophosphate response element)、SRE(serum response element)、NF- κ B(nuclear factor κ B)、Oct-1等.其中研究比较多的是HBxAg对AP-1和NF- κ B的激活^[51,52].

研究发现,在转染细胞中HBxAg表达可以诱导Ras-GTP复合物的形成以及有丝分裂原蛋白激酶(MAPK)的活化,从而通过Ras-MAPK途径激活转录因子.这一激活可因转染细胞Ras和Raf的显性负突变(dominant negative mutant)而阻断,而与蛋白激酶C(PKC)抑制剂的存在无关.进一步研究发现,由HBxAg刺激合成的Ras-GTP复合物可通过激活Raf转换其上游活化信号,促使其下游元件发生磷酸化. Raf一旦被活化,就作为MAPKKK

(MEKK)将 MAPKK(MEK)磷酸化而激活, MEK 活化后进而使 MAPK 磷酸化而活化, 活化的 MAPK 可以使包括 AP-1、AP-2 和 NF- κ B 在内的多种转录因子活化, 促进转录的发生. 通过 HBxAg 刺激 Ras 活化机制的研究, 发现 HBxAg 激活 Ras 途径是通过 HBxAg 作为 Src 家族的酪氨酸激酶的胞质内激活剂, 而诱导 Ras 上游的激活蛋白 Shc、Grb2、SOS 的联系, 同时在不改变 Ras 特殊的 GTP 酶激活蛋白活性的情况下, 使 GTP 和 Ras 结合, 但 HBxAg 本身并不参与复合物的形成. 例如 v-Src 介导强烈的 Shc 酪氨酸磷酸化, 引起与 Grb2 的联系及 Ras 信号途径的激活. 同样的 c-Src 可诱导 Shc 酪氨酸磷酸化, 进而导致 Shc 与 Grb2 结合, 最终激活 Ras. HBxAg 在不含血清的 NIH 3T3 细胞能强烈刺激 Src 家族激酶, 从而激活整个 Ras 途径. 最近的研究表明, HBxAg 还可直接通过激活 Src 酪氨酸激酶启动一个高水平的病毒复制, 其机制是 HBxAg 在细胞中通过 Src 介导的途径刺激病毒前基因组 mRNA 逆转录为 cDNA 所致^[53].

研究报道 HBxAg 能促进 NF- κ B 依赖的转录活性, NF- κ B 为 P50/P65 或 P52/P65 组成的二聚体, 在生理条件下, 胞质中存在许多 NF- κ B 抑制因子, 包括 I κ B α 、I κ B β 、BCL-3、NF- κ B1 蛋白前体(P105)等. HBxAg 可促进 I κ B 降解以及 RelA 从 NF- κ B 1 蛋白前体中释放出来, 从而使 NF- κ B 的活性得以发挥. 并且抑制 Ras 活性可阻止对 NF- κ B 激活. 同时发现 HBx 并不与 NF- κ B 直接发生作用, 说明 HBx 对 NF- κ B 的激活可能是通过 Ras 途径完成的. 但也有与此相矛盾的报道, 认为 HBxAg 与其他 NF- κ B 诱导剂肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1(IL-1)等作用机制不同, 其刺激 NF- κ B 抑制剂 I κ B 降解并不依赖 Ras、Raf-1、PKC 的活化, 推测可能与其他机制有关^[54-56].

HBxAg 可通过活化 MAPK 方式诱导 AP-1, 控制 AP-1 活化的 MAPK 方式有两种, 一种是细胞外信号调节激酶(ERKs), 为依赖 Ras 的一种 c-Fos 的重要激活剂. 另一种 MAPK 是 c-Jun N 末端蛋白激酶(JNKs), 功能是使 c-Jun N 末端磷酸化. 较早的资料表明, Ras 激活 ERKs 是通过 Raf 途径完成的, 而 JNKs 的活化是由 MEKK-1 控制的, 由 Ras - MEKK-1 途径可介导中等水平的 JNKs 活化, JNKs 活化以及 c-Jun N 末端磷酸化被认为在 c-Jun 合成过程形成一个正性自动调控圈. 因此认为 HBx 诱导 AP-1 可能通过两个途径完成, 一是通过依赖 Ras 的 ERKs 刺激 c-Fos 的合成, 另一条途径是活化 JNKs 使 c-Jun N 末端磷酸化进而诱导 c-Jun 的大量合成. c-Fos 和 c-Jun 是构成 AP-1 的两个亚单位, 他们的大量合成是 AP-1 活化的基础. AP-1 直接结合特异序列的 AP-1 启动子上游反应元件, 使转录水平上调, 完成信号转导^[56-58].

HBxAg 激活 Ras 信号转导途径还被认为与 HBxAg 激活 RNA 聚合酶 III 转录 tRNA 有关. 研究发现 HBxAg 可刺激细胞内 TATA 结合蛋白(TBP)增高^[59]. 另外, 相关的研究资料也提出, 表达 HBxAg 基因的细胞 TBP mRNA

的水平可稳定增高, 该研究还证明, HBxAg 通过 Ras/Raf-1 信号途径的激活可刺激 TBP 启动子的转录. TBP 是转录因子 IIIB(TFIIB)复合物的亚单位, 为细胞基因转录所需的转录因子, 可控制 RNA 聚合酶 III 的转录, 即 TBP 增高可使 RNA 聚合酶 III 活性增强. 通过分析依赖 RNA 聚合酶基因启动子和 Copia 启动子的表达以及 TBP 水平的检测, 表明 HBxAg 介导依赖 RNA 聚合酶 III 的反式激活及其增加细胞内 TBP 水平的能力有赖于 Ras 的活化. 进一步研究表明, 通过 HBxAg 介导的 Ras 刺激依赖 RNA 聚合酶 III 的基因可发生于各类细胞而不受细胞类型的限制. RNA 聚合酶 III 主要负责 tRNA 和 5S RNA 的转录, 被认为是维持细胞旺盛生长的必需因子, 例如猴病毒促进细胞转化的基本特征之一是 tRNA 的合成显著上升, 因此认为, HBxAg 促进 RNA 聚合酶 III 转录活性可能与其致癌有一定关系. HBxAg 也可反式激活依赖 RNA 聚合酶 I 的启动子, 该启动子负责 28 S、18 S、5.8 S rRNA 的转录合成, 而 HBxAg 诱导 RNA 聚合酶 I 基因的活性也是由 Ras 的激活所介导^[60-63].

HBxAg 可通过 Ras 途径刺激细胞周期的进程, 使细胞从 G0 期进入 S 期至少缩短 12 h. 增强细胞通过 G0/G1 和 G2/M 检查点(checkpoint)控制, 从而促进细胞的增生^[64].

此外, HBxAg 蛋白具有的另外的一些特性也许有助于人们对其作用机制的进一步了解. HBxAg 蛋白能进入细胞转录因子 CREB 和 ATF-2 的蛋白-蛋白复合物中, 扩展这些调节蛋白的 DNA 结合特异性, 这也可能是 HBxAg 蛋白参与转录调节的一种机制. 在大肠杆菌中表达的 HBxAg 蛋白对人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)的 LTR 所引导的转录有反式激活作用, 并发现此蛋白具有内源性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的活性. 研究发现 HBxAg 蛋白与 V-abl 及小鼠 c-abl 基因座编码的 p18 蛋白同源, 而此蛋白具有酪氨酸激酶活性, 从而提出了 HBxAg 蛋白通过共价修饰细胞因子或酶而引起激活的机制. 对 HBxAg 蛋白的分析还发现它具有 Kunitz 型的丝氨酸蛋白酶抑制子的 Kunitz 功能域顺序. 此顺序的突变导致反式激活作用的完全丧失, 因此 HBxAg 蛋白与这种抑制物或其同类物相似, 可与丝氨酸蛋白酶自然的抑制子竞争, 结合肝细胞来源的特异的丝氨酸蛋白酶, 从而扰乱细胞内转录因子的蛋白水解途径, 而执行其反式激活作用. 由此可见 HBxAg 蛋白激活途径的多样性^[65-70].

需要强调的是, 目前对 HBxAg 反式激活的研究结果也存在不一致性, 甚至有矛盾的结果. 因为研究大多数采用瞬时表达系统, 将含有 X 基因的表达载体与报告基因载体用共转染实验. 分析其原因可能包括: (1)体外细胞培养研究单个病毒蛋白的孤立的效应可能与体内整体细胞蛋白的效应不同, 因为体内多种病毒蛋白可能具有协同或拮抗作用; (2)转染细胞中蛋白表达水平也会影响观察到的效应, 体外试验中目的蛋白都是过表达, 而病毒蛋白, 尤其是 HBxAg 蛋白在患者体内水

平通常很低; (3)不同的细胞类型将有不同的应答; (4)细胞培养环境不可能完全真实地反映活体内环境; (5)应用报告基因瞬时转染观察的效应不可能完全模拟病毒蛋白对内源性细胞基因的作用^[71-75]。

4 参考文献

- Schuster R, Hildt E, Chang SF, Terradillos O, Pollicino T, Lanford R, Gerlich WH, Will H, Schaefer S. Conserved transactivating and pro-apoptotic functions of hepadnaviral X protein in ortho- and avihepadnaviruses. *Oncogene* 2002; 21:6606-6613
- Carretero M, Gomez-Gonzalo M, Lara-Pezzi E, Benedicto I, Aramburu J, Martinez-Martinez S, Redondo J, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein binds to and activates the NH(2)-terminal trans-activation domain of nuclear factor of activated T cells-1. *Virology* 2002;299:288-300
- Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 2002;76:5875-5881
- Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* 2000;275:15157-15165
- Reifenberg K, Wilts H, Lohler J, Nusser P, Hanano R, Guidotti LG, Chisari FV, Schlicht HJ. The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J Virol* 1999; 73:10399-10405
- Kim JH, Rho HM. Activation of the human transforming growth factor alpha (TGF-alpha) gene by the hepatitis B viral X protein (HBx) through AP-2 sites. *Mol Cell Biochem* 2002; 231:155-161
- Assogba BD, Choi BH, Rho HM. Transcriptional activation of the promoter of human cytomegalovirus immediate early gene (CMV-IE) by the hepatitis B viral X protein (HBx) through the NF-kappaB site. *Virus Res* 2002;84:171-179
- Arima T, Nakao K, Nakata K, Ishikawa H, Ichikawa T, Hamasaki K, Ishii N, Eguchi K. Transactivation of human alpha-fetoprotein gene by X-gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *Int J Mol Med* 2002;9:397-400
- Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002;76:2579-2584
- Majano P, Lara-Pezzi E, Lopez-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, Garcia-Monzon C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology* 2001;34:1218-1224
- Zhang Z, Torii N, Hu Z, Jacob J, Liang TJ. X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo. *J Clin Invest* 2001; 108:1523-1531
- Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1162-1168
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001;36:651-660
- Lee JH, Rho HM. Nuclear factor of activated T cells (NFAT1-C) represses the enhancer II and pregenomic promoter (EnII/Cp) of hepatitis B virus (HBV) through its responsive site GGAGA and nullifies the HBx-driven transcriptional activation. *IUBMB Life* 2001;51:255-261
- Kim H, Lee YH, Won J, Yun Y. Through induction of juxtaposition and tyrosine kinase activity of Jak1, X-gene product of hepatitis B virus stimulates Ras and the transcriptional activation through AP-1, NF-kappaB, and SRE enhancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:886-894
- Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, Errington W, Goldin RD, Fish D, McGarvey MJ. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol* 2001;64:419-426
- Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- Bouchard M, Giannakopoulos S, Wang EH, Tanese N, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway. *J Virol* 2001;75:4247-4257
- Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276:16969-16977
- Jaitovich-Groisman I, Benlimame N, Slagle BL, Perez MH, Alpert L, Song DJ, Fotouhi-Ardakani N, Galipeau J, Alaoui-Jamali MA. Transcriptional regulation of the TFIIH transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem* 2001;276:14124-14132
- Goila R, Banerjee AC. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by novel DNA enzymes. *Biochem J* 2001;353:701-708
- 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:217-219
- 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
- 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10: 15-18
- 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
- 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
- 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. *国外医学病毒学分册* 2002;9:33-36
- 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002; 27:125-127
- 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟劲松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因克隆化的研究. *中华肝脏病杂志* 2003;11:5-7
- 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. *中华传染病杂志* 2002;20:218-221
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2003; 28:40-43
- 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:399-403
- 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:456-458
- 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
- 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. 生物信息学技术与新基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:474-477
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原蛋白协同反式激活功能的研究. *中华肝脏病杂志* 2002;10:354-357
- Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Brechot P, Brechot C, Kremsdorf D. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61:7803-7810
- Pflum MK, Schneider TL, Hall D, Schepartz A. Hepatitis B virus X protein activates transcription by bypassing CREB phosphorylation, not by stabilizing bZIP-DNA complexes. *Biochemistry* 2001;40:693-703
- Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001;82:171-182

- 43 Yeh CT, Shen CH, Tai DI, Chu CM, Liaw YF. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:5213-5220
- 44 Kong HJ, Hong SH, Lee MY, Kim HD, Lee JW, Cheong J. Direct binding of hepatitis B virus X protein and retinoid X receptor contributes to phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transactivation. *FEBS Lett* 2000;483:114-118
- 45 Chen WN, Oon CJ, Leong AL, Koh S, Teng SW. Expression of integrated hepatitis B virus X variants in human hepatocellular carcinomas and its significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:885-892
- 46 Sitterlin D, Bergametti F, Tiollais P, Tennant BC, Transy C. Correct binding of viral X protein to UVDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses. *Oncogene* 2000;19:4427-4431
- 47 Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:3717-3726
- 48 Wentz MJ, Becker SA, Slagle BL. Dissociation of DDB1-binding and transactivation properties of the hepatitis B virus X protein. *Virus Res* 2000;68:87-92
- 49 Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbuthnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000;33:142-151
- 50 Sohn S, Jaitovitch-Groisman I, Benlimame N, Galipeau J, Batist G, Alaoui-Jamali MA. Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. *Mutat Res* 2000;460:17-28
- 51 Tarn C, Zou L, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes. *J Virol* 2002;76:9763-9772
- 52 Yun C, Um HR, Jin YH, Wang JH, Lee MO, Park S, Lee JH, Cho H. NF-kappaB activation by hepatitis B virus X (HBx) protein shifts the cellular fate toward survival. *Cancer Lett* 2002;184:97-104
- 53 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275:25858-25864
- 54 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- 55 Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 2000;19:1173-1180
- 56 Barnabas S, Andrisani OM. Different regions of hepatitis B virus X protein are required for enhancement of bZip-mediated transactivation versus transrepression. *J Virol* 2000;74:83-90
- 57 Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kanegae Y, Kimura S, Saito I, Koike K. Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system. *J Gen Virol* 1999;80:3257-3265
- 58 Lee DH, Choi BH, Rho HM. The synergistic transactivation of the hepatitis B viral (HBV) pregenomic promoter by the E6 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16 E6) with HBV X protein was mediated through the AP1 site of E element in the enhancer I (EnI) in human liver cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:62-66
- 59 Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Brechot C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 1999;18:4848-4889
- 60 Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux O, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 1999;73:7231-7240
- 61 Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- 62 Bergametti F, Prigent S, Lubet B, Benoit A, Tiollais P, Sarasin A, Transy C. The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines. *Oncogene* 1999;18:2860-2871
- 63 Perini G, Oetjen E, Green MR. The hepatitis B pX protein promotes dimerization and DNA binding of cellular basic region/leucine zipper proteins by targeting the conserved basic region. *J Biol Chem* 1999;274:13970-13977
- 64 Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81:519-526
- 65 Kim YK, Junn E, Park I, Lee Y, Kang C, Ahn JK. Repression of hepatitis B virus X gene expression by hammerhead ribozymes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:759-765
- 66 Nomura T, Lin Y, Dorjsuren D, Ohno S, Yamashita T, Murakami S. Human hepatitis B virus X protein is detectable in nuclei of transfected cells, and is active for transactivation. *Biochim Biophys Acta* 1999;1453:330-340
- 67 Amaro MJ, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis B virus X protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter. *Hepatology* 1999;29:915-923
- 68 Chomarat P, Rice JM, Slagle BL, Wild CP. Hepatitis B virus-induced liver injury and altered expression of carcinogen metabolising enzymes: the role of the HBx protein. *Toxicol Lett* 1998;102-103:595-601
- 69 Choi BH, Park GT, Rho HM. Interaction of hepatitis B viral X protein and CCAAT/ enhancer-binding protein alpha synergistically activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter. *J Biol Chem* 1999;274:2858-2865
- 70 Azizan A, Cong YS, Shain K, Tsai SC, Yao YL, Olashaw N, Seto E. Transactivation by expression of the hepatitis B virus X protein with an inducible system. *Mol Biol Rep* 1998;25:231-236
- 71 Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7086-7094
- 72 Lara-Pezzi E, Armesilla AL, Majano PL, Redondo JM, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J* 1998;17:7066-7077
- 73 Gottlob K, Fulco M, Levrero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998;273:33347-33353
- 74 Dorjsuren D, Lin Y, Wei W, Yamashita T, Nomura T, Hayashi N, Murakami S. RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7546-7555
- 75 Lin Y, Tang H, Nomura T, Dorjsuren D, Hayashi N, Wei W, Ohta T, Roeder R, Murakami S. The hepatitis B virus X protein is a co-activator of activated transcription that modulates the transcription machinery and distal binding activators. *J Biol Chem* 1998;273:27097-27103

乙型肝炎病毒前-S2蛋白结合蛋白基因S2-29的克隆化研究

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞

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

陆荫英, 女, 1973-08-27生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础及临床工作。

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

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Screening and identification of a novel gene coding for hepatitis B virus pre-S2 antigen interacting protein S2-29

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Cheng, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Ke Li, Jian Zhang, Qing Shao, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Cheng, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Ke Li, Jian Zhang, Qing Shao, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhonglu, Beijing 100039, China

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

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: The Pre-S2 region of hepatitis B virus (HBV) has been reported to have complex biological functions. It has human polymerized albumin receptor (PAR) activity, which correlates with viral replication, and it can induce neutralization antibody. As an important part of truncated middle surface proteins (MHBS), the Pre-S2 domain binds PKC α/β and triggers a PKC-dependent activation of the c-Raf-1/MAP2-kinase signal transduction cascade, resulting in activation of transcription factors such as AP-1 and NF- κ B. To investigate the biological function of hepatitis B virus (HBV) Pre-S2 protein, we used yeast two-hybrid technique to screen proteins interacting with HBV Pre-S2 antigen in hepatocytes.

METHODS: The HBV Pre-S2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into yeast expression vector Pgbkt7 to construct HBV Pre-S2 bait plasmid. The bait plasmid was transformed into yeast AH109 and mated with yeast Y187 containing liver cDNA library plasmid in 2 \times YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout

nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing X- α -gal for selection and screening. After being extracted and sequenced, genes were analyzed by bioinformatics. The complete sequence of new gene S2-29 was amplified from the mRNA of HepG2 cell by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pGADT7, then translated by using reticulocyte lysate and analysed by immunoprecipitation technique *in vitro*.

RESULTS: Twenty-six colonies were obtained, among them two colonies were new genes with unknown function and no homeobox genes were found in Genbank by blast. The complete sequence of new gene S2-29 could be amplified from the mRNA of HepG2 cell and the interaction between HBV Pre-S2 antigen and S2-29 was further confirmed by coimmunoprecipitation technique.

CONCLUSION: Genes of HBV Pre-S2 interacting proteins were successfully screened. A novel gene S2-29 was cloned and could express in HepG2 cell. The HBV Pre-S2 antigen could interact with S2-29, which brings new clues for studying the biological functions of HBV Pre-S2 and the pathogenesis of HBV infection.

Lu YY, Cheng TY, Cheng J, Liang YD, Wang L, Liu Y, Li K, Zhang J, Shao Q, Zhang LX. Screening and identification of a novel gene coding for hepatitis B virus pre-S2 antigen interacting protein S2-29. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1114-1117

摘要

目的: 筛选人肝细胞中与乙型肝炎病毒 (HBV) 前-S2蛋白 (Pre-S2) 相互作用的蛋白, 探寻 HBV 致病机制。

方法: 用多聚酶链反应 (PCR) 技术扩增 HBV 前-S2 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 文库质粒的酵母细胞 Y187 进行配合, 用营养缺陷型培养基及蓝白斑双重筛选阳性菌落, 提取酵母质粒转化大肠杆菌并测序, 进行生物信息学分析。逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 方法从 HepG2 细胞的 mRNA 中扩增出完整的新基因 S2-29, 连入另一酵母表达载体 pGADT7, 并用免疫共沉淀方法再次证实二者间的相互作用。

结果: 成功克隆出 HBV 前-S2 基因并在酵母细胞中表达, 配合后筛选出既能在四缺 (SD/-Trp-Leu-His-Ade) 培养基又能在铺有 X- α -半乳糖 (X- α -gal) 的四缺培养基上生长并变成蓝色的真阳性菌落 26 个, 其中有 1 个未知基因 S2-29, 该基因能在 HepG2 细胞中表达, 免疫共沉淀方法证实二者在体外也有结合作用。

结论: 成功克隆出与乙型肝炎病毒前-S2蛋白相结合的新基因, 为进一步研究 HBV 前-S2 的作用提供了新线索.

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1114-1117

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1114.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的前-S2(Pre-S2)蛋白是 HBV 外膜蛋白的组成部分之一, 因有多聚人血清白蛋白(PHSA)结合位点而与 HBV 的嗜肝性及入侵肝细胞有关^[1-3]; 前-S2 蛋白上存在 B 淋巴细胞识别位点, 有较强的免疫原性, 可诱导中和抗体的产生, 在 HBV 疫苗的研究和应用方面深受重视^[4-10]; 近年来还发现 HBV 前-S2 区域是 HBV 截短型中蛋白的反式激活功能的重要功能域, 与肝脏肿瘤发生密切相关^[11,12], 使前-S2 蛋白的功能变得更加复杂, 明确其具体的作用机制并进行相应的阻断对于 HBV 感染的防治有着重要的意义; 我们用酵母双杂交技术筛选其结合蛋白基因, 找到肝细胞能与前-S2 蛋白结合的新基因 S2-29, 为研究前-S2 蛋白的生物学功提供新的线索.

1 材料和方法

1.1 材料及主要试剂 AH109 酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4^Δ, gal80^Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lacZ MEL1)、预转化的 cDNA 肝文库(Y187)、pGBKT7-BD 克隆载体及酵母 YPD 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp-Leu-His, SD/-Trp-Leu-His-Ade 等培养基、X-α-gal 购于 Clontech 公司. 大肠杆菌 DH5 α 及 HBV ayw 亚型基因全序列质粒载体 pCP10 为本室保存, c-myc 单克隆抗体本室自制, 由购自 ATCC 的 1-9E10.2 杂交瘤产生. 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购于北京中山生物公司. Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、BamHI 和 PstI 购于 Takara 生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG 及 X-β-Gal 及 pGEM-T 载体购于 Promega 公司. TEMED 购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于 Sigma 公司. HBV 多聚酶(PCR)链技术扩增 Pre-S2 基因片段所用引物(P1 5'-GGATCCATGCAGTGAATTCCACAACCTTCC-3', P2 5'-CTGCAGGTTTCAGCGC AGGGTCCCCAATCCTC-3'), 根据表达载体外源基因插入位点设计肝cDNA文库插入序列扩增引物(P3 5'-CTATTC GATGATGAAGATACC CCACCAAACCC-3', P4 5'-GTGAACCTGCGGGG TTTT TCAGTATCTACG A-3'), 未知基因 S2-29 扩增引物(p5 5'-GAATTCATGGGGGCCACTGAGGTTGGGG ATG-3', p6 5'-GGATCCTCACCCCCCTCTTCTTC TGATGTGG -3')合成及 DNA 测序在上海博亚公司进行.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 PCR 从 HBV ayw 亚型基因全序列质粒载体 pCP10 中扩增 HBV 前-S2 基因, 与 pGBK-T7 载体连接, 酶切鉴定后转化入酵母菌株 AH109, 提取酵母蛋白质, 用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 免疫印迹法验证 HBV 前-S2 基因在酵母中的表达.

1.2.2 诱饵与肝文库的酵母配合 pGBKT7 载体中有色氨酸(Trp)基因, 转化成功的酵母菌株能在缺乏 Trp 的 SD 平板上生长, 挑取在 SD/-Trp 培养基上生长的 pGBKT7-HBV 前-S2 质粒的酵母 AH109 菌落一到数个接种于 SD/-Trp 培养基中, 30 °C 250 r·min⁻¹ 振荡过夜, 次日离心后用 2 × YPDA 培养液 5 mL 重悬细胞, 计数细胞数大于 1 × 10¹²·L⁻¹ 时与 1 mL 的肝文库酵母细胞(含有亮氨酸 Leu 基因)在 50 MI 2 × YPDA 中 30 °C 30-50 r·min⁻¹ 配合 18-24 h, 离心, 用 1 × YPDA 10 mL 重悬细胞, 分别取 250 μl 铺于 15 cm 的 SD/-Trp-Leu-His(3 缺), SD/-Trp-Leu-His-Ade (4 缺)培养基各 25 块上, 同时将配合产物按 1:10、1:100、1:1 000 铺于 SD/-Trp-Leu 培养基上检验配合效率. 生长 6-18 d 后挑取大于直径 3 mm 的菌落再次画线于铺有 X-α-gal 的 4 缺培养基上检查 X-α-gal 酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. PCR 扩增出目的片段后测序并进行生物信息学分析.

1.2.3 未知基因完整序列的克隆及测序 根据 Genbank 的序列信息设计引物 p5、p6, 以 HepG2 细胞的 mRNA 为模板, 逆转录 RT-PCR 扩增 S2-29 基因的全序列, EcoRI、BamHI 双酶切克隆入酵母表达载体 pGADT7, 鉴定后送 DNA 测序.

1.2.4 体外免疫共沉淀再次证实结合作用 TNT 网织红细胞裂解物体外翻译 HBV Pre-S2 Ag 和 S2-29 蛋白(在此过程中掺入 ³⁵S), 二者各取 5 μL 在 1.5 mL 的微离心管中冰上混合, 30 °C 孵育 1 h, 加入 470 μL 免疫共沉淀缓冲液、10 μL 蛋白-G 琼脂糖珠、10 μL c-myc 单克隆抗体、4 °C 孵育 2 h. 14 000 r·min⁻¹ 离心 1-2 min, 弃上清. 加入 TBST 0.5 mL 洗 3 次, 加 15 μL SDS 上样缓冲液, 80 °C 加热变性 5 min, 瞬时离心后将上清 10 μL 上样到 SDS-PAGE 胶上电泳, 清洗固定凝胶后, 恒定 60 °C 真空干燥 40 min, -20 °C 条件下放射自显影.

2 结果

2.1 pGBKT7-HBV Pre-S2 重组诱饵质粒的构建及表达 利用自行设计的引物 P1、P2 成功扩增出 HBV 前-S2 蛋白基因片段, PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约 165 bp, 与预期片段符合, 且无非特异扩增现象, 测序结果显示完全符合报告序列. 用 BamHI 及 PstI 双酶切所得片段, 连接到用相同酶所切的 pGBKT7 载体中, 经酶切鉴定结果正确. 用醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母 AH109 株后在 SD/-Trp 培养

基上筛选生长 6-8 d, 挑取阳性菌落培养并提酵母蛋白质, 进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析. 结果显示转化了 pGBKT7- HBV 前-S2 的酵母蛋白提取物 Western 印迹分析可见明显目的条带(约 24 Kd, 其中 c-myc 1.3 kd, DNA 结合域 17 kD, Pre-S2 蛋白约 6 kD), 且无杂带, 说明 HBV 前-S2 蛋白基因已成功地在酵母中表达(图 1).



1: (pGBKT7-HBV PreS2)酵母蛋白提取物; 2: 蛋白 Marker
图 1 Western 免疫印迹图.

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果 配合后筛选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-His-Ade)培养基生长又能分解 X- α -gal 变成蓝色的真阳性菌落 26 个, PCR 扩增出目的片段后, 测序结果在 GenBank 中进行分析, 发现其中有未知基因 2 个.

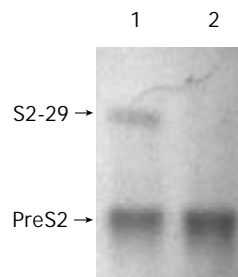
2.3 未知基因完整序列的克隆及测序 RT-PCR 方法成功克隆出 S2-29# 新基因的完整序列(图 2), 大小为 342 bp, Genebank 注册号 AF 497566, 并连接入 pGADT7 载体中.

```

      M G A T E V G D E N A G T V S
1  ATG GGG GCC ACT GAG GTT GGG GAT GAA AAT GCC GGT ACC GTC AGT
      A Q P C S R Q C C L E D F W A
46  GCA CAG CCC TGT TCC AGA CAG TGC TGC CTG GAA GAT TTC TGG GCT
      L L R R H P A P E P P P W T P
91  CTC CTG AGG CGC CAC CCC GCA CCT GAG CCA CCT CCT TGG ACT CCT
      V L Y P L R T S L P S T L A V
136  GTC CTC TAC CCC TTG AGG ACC TCC CTC CCT TCT ACC CTA GCT GTC
      F L N L G L S F P K A S I T S
181  TTC TTG AAC TTG GGA CTC TCC TTT CCC AAG GCT TCC ATC ACT AGC
      S W R D W T L H L P F A W S L
226  TCC TGG AGG GAC TGG ACT TTG CAT CTT CCC TTC GCG TGG AGC CTC
      S V R G P S Q C V H V R G G G
271  AGT GTG AGA GGC CCT AGC CAA TGC GTG CAT GTC AGA GGT GGT GGG
      D H I R R R G G *
316  GAC CAC ATC AGA AGA AGA GGG GGG TGA
  
```

图 2 Pre-S2-29 新基因序列(GenBank 号: AF 497566).

2.4 体外免疫共沉淀再次证实结合作用 HBV Pre-S2 蛋白(M_r 6 000), 新基因编码蛋白的相对分子质量为(M_r 12 500), 经体外翻译相互作用 SDS 电泳后, 放射自显影图上可看出(图 3), 1 泳道两条带的大小正确, 对照 2 泳道仅有 HBV Pre-S2 蛋白的一条带, 进一步证实二者在体外也能相互结合.



1: HBV PreS2+S2-29; 2: HBV PreS2
图 3 免疫共沉淀图.

3 讨论

HBV 前-S2 蛋白作为 HBV 包膜蛋白的组成之一, 功能复杂, 不仅能与 PHSA 结合介导肝细胞的黏附及入侵, 在其肽段内还包含有 I、II 类 MHC 限制性和 T 细胞受体(TCR)的不同功能位点和特异性 T、B 淋巴细胞结合位点, 能引起中和抗体和保护性免疫的发生, 可用于构建新型的乙型肝炎疫苗^[13-18]. 近年来还有报道前-S2 蛋白 N 末端 I 区的存在对于截短型中蛋白(MHBs¹)的反式激活作用是必不可少的, MHBs¹通过启动不同的细胞内信号系统分别来激活转录因子 Ap-2、NF κ B、血清应答元件(SRE)以及转录因子 Sp1, 从而完成其反式激活功能, 提示前-S2 蛋白可能参与 HBV 慢性化及 HCC 的发生过程. 弄清 HBV 前-S2 蛋白在肝细胞中到底与那些蛋白质因子相互作用、如何作用, 对于研究 HBV 在自然感染中的具体过程和机制是非常关键的.

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 DNA 结合域(BD)和转录激活域(AD)上, X 与 Y 的相互作用使 BD 和 AD 重新结合在一起, 重构了激活因子的完整结构功能, 导致下游报告基因的转录、表达^[19-23]. 基于该原理, 我们在真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-HBV 前-S2 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBV 前-S2 基因, 与人肝 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合, 寻找与前-S2 蛋白相互作用的蛋白, 经过营养缺陷和蓝白斑双重选择^[24-30], 筛选出与 HBV Pre-S2 蛋白有相互作用的未知功能的新基因 S2-29#, 将其在 Genebank 中进行比较未找到与之同源的基因序列, 用自行设计的引物能从肝癌细胞系 HepG2 细胞的 mRNA 中逆转录出该基因的完整序列, 说明该基因在之前从未被报道过, 是一个全新的基因序列, 并能在肝癌细胞系 HepG2 中表达. 为进一步确证, 我们又用体外免疫共沉淀的方法再次证实二者在体外也有相互作用^[31,32], 由此得出结论 HBV 前-S2 蛋白能与肝细胞中的未知基因 S2-29 表达产物结合, 并可能在 HBV 感染肝细胞的过程中起着一定作用.

以上结果为前-S2 蛋白的功能研究提供了新的有价值的线索, 对 HBV 致病机制的探讨也提出了全新的主

题, 但我们还需要进一步探明其间相互作用的具体机制、作用结果及其对HBV前-S2蛋白生物学功能的影响, 为寻找阻断HBV感染及原发性肝癌(HCC)发生的有效方法开辟新道路。

4 参考文献

- Kondo J, Shimomura H, Fujioka S, Iwasaki Y, Takagi S, Ohnishi Y, Tsuji H, Sakaguchi K, Yamamoto K, Tsuji T. Mutations in the hepatitis B virus Pre-S2 region and abrogated receptor activity for polymerized human albumin. *Acta Med Okayama* 2002;56:193-198
- Deng H, Cheng J, Shi S, Hong Y, Ren X, Li L. A preliminary study on the heterogeneity of Pre-S2 region in hepatitis B virus. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002;41:233-236
- Sobotta D, Sominskaya I, Jansons J, Meisel H, Schmitt S, Heermann KH, Kaluza G, Pumpens P, Gerlich WH. Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. *J Gen Virol* 2000;81:369-378
- Park JH, Cho EW, Lee YJ, Shin SY, Kim KL. Determination of the protective effects of neutralizing anti-hepatitis B virus (HBV) immunoglobulins by epitope mapping with recombinant HBV surface-antigen proteins. *Microbiol Immunol* 2000;44:703-710
- Sobotta D, Sominskaya I, Jansons J, Meisel H, Schmitt S, Heermann KH, Kaluza G, Pumpens P, Gerlich WH. Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. *J Gen Virol* 2000;81:369-378
- Soussan P, Pol S, Garreau F, Brechot C, Kremsdorf D. Vaccination of chronic hepatitis B virus carriers with Pre-S2/S envelope protein is not associated with the emergence of envelope escape mutants. *J Gen Virol* 2001;82:367-371
- Eyigun CP, Yilmaz S, Gul C, Sengul A, Hacibektasoglu A, Van Thiel DH. A comparative trial of two surface subunit recombinant hepatitis B vaccines vs a surface and PreS subunit vaccine for immunization of healthy adults. *J Viral Hepat* 1998;5:265-269
- Jilg W. Novel hepatitis B vaccines. *Vaccine* 1998;16:65-68
- Madalinski K, Sylvan SP, Hellstrom U, Mikolajewicz J, Zembrzuska-Sadkowska E, Piontek E. Antibody responses to preS components after immunization of children with low doses of BioHepB. *Vaccine* 2001;20:92-97
- Shi X, Liu Q, Wang Z, Zhang D. Cloning and sequence analysis of light chain gene of human antibody against HBV pre-S2. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:30-33
- Hildt E, Hofschneider PH. The Pre-S2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The Pre-S2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- Pol S, Nalpas B, Driss F, Michel ML, Tiollais P, Denis J, Brecho C. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001;34:917-921
- Pol S, Couillin I, Michel ML, Driss F, Nalpas B, Carnot F, Berthelot P, Brechot C. Immunotherapy of chronic hepatitis B by anti HBV vaccine. *Acta Gastroenterol Belg* 1998;61:228-233
- Hui J, Li G, Kong Y, Wang Y. Expression and characterization of chimeric hepatitis B surface antigen particles carrying preS epitopes. *J Biotechnol* 1999;72:49-59
- Cho EW, Park JH, Yoo OJ, Kim KL. Translocation and accumulation of exogenous hepatitis B virus preS surface proteins in the cell nucleus. *J Cell Sci* 2001;114:1115-1123
- Yamada T, Iwabuki H, Kanno T. Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. *Vaccine* 2001;19:3154-3163
- Kuttner G, Kramer A, Schmidtke G. Nucleotide, protein characterization of neutralizing anti-pre-S1 and anti-pre-S2 (HBV) monoclonal antibodies and their fragments. *Mol Immunol* 1999;36:669-683
- 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
- Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Duan HJ, Zhang LX. Cloning and expression of hepatitis B virus X gene in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:15-18
- Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y. Screening and cloning of the genes of protein interacting with human augments of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:161-164
- Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY. Cloning and expression of recombinant augments of liver regeneration in yeast. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:384
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Li L, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yeast two hybrid 'bait' vector in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:129-132
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L. Mutual interaction between hepatitis C virus core protein and translin, a recombination hotspot binding protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1-5
- Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-s1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2002;27:341-342
- Hartmann-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* 2001;75:5343-5351
- Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux O, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 1999;73:7231-7240

酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒e抗原结合蛋白E-19的研究

陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞

陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
陆荫英, 女, 1973-08-27生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础及临床工作。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Screening and identification of a novel hepatitis B virus e antigen binding protein E-19 in hepatocytes by yeast two-hybrid technique

Yin-Ying Lu, Qing Shao, Jun Cheng, Tian-Yan Cheng, Lin Wang, Yao-Dong Liang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Qing Shao, Jun Cheng, Tian-Yan Cheng, Lin Wang, Yao-Dong Liang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhonglu, Beijing 100039, China
Supported by Grants from National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: The hepatitis B precore Ag (HBeAg) is a secreted nonparticulate version of the viral nucleocapsid hepatitis B core Ag (HBcAg), and its function is unknown. Some researchers have proposed that the HBeAg may have an immunoregulatory function in promoting viral persistence and is associated with immunologic tolerance. To investigate biological functions of hepatitis B virus e protein (HBeAg), yeast two-hybrid technique was employed to seek proteins in hepatocytes interacting with HBeAg.

METHODS: HBeAg bait plasmid was constructed by ligating HBeAg gene with yeast expression vector pGBKT7, then transformed into yeast AH109 (a type). The transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2 \times YPDA medium. Diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- α -gal for selection twice. Plasmid of true positive blue

colonies were extracted and analysed by DNA sequencing and blast in Genbank. After the complete sequence of new gene E-19 was amplified from the mRNA of HepG2 cell by RT-PCR and cloned into pGADT7 vector, the recombinant plasmid was translated by using reticulocyte lysate and analysed by immunoprecipitation technique *in vitro* together with HBeAg.

RESULTS: Twenty genes in thirty nine positive colonies were obtained, there were five new genes. The complete sequence of new gene E-19 was successfully amplified from the mRNA of HepG2 cell by RT-PCR. The interaction between HBeAg and expression products of new gene E-19 was further confirmed by immunoprecipitation technique.

CONCLUSION: Genes of HBeAg interacting proteins in hepatocytes were successfully cloned and HBeAg could bind with the protein expressed by new gene E-19.

Lu YY, Shao Q, Cheng J, Cheng TY, Wang L, Liang YD, Liu Y, Zhang J, Li K, Zhang LX. Screening and identification of a novel hepatitis B virus e antigen binding protein E-19 in hepatocytes by yeast two-hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1118-1121

摘要

目的: 乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)对HBV的感染和复制都不是必须的, 普遍认为其与HBV引起免疫耐受、免疫系统功能障碍有关。筛选并克隆人肝细胞cDNA文库中与HBeAg相互作用蛋白的基因, 明确其具体作用机制。

方法: 应用酵母双杂交系统3, 将多聚酶链反应(PCR)法扩增的HBeAg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- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选阳性菌落, 提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠杆菌氨苄青霉素-LB平板上选择并测序, 结果在GenBank中进行生物信息学分析。并根据GenBank中的序列信息设计引物从并克隆到另一酵母表达载体pGADT7中, 体外免疫共沉淀方法再次验证二者之间的结合作用。

结果: 成功克隆出HBeAg基因并在酵母细胞中表达, 与肝文库配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-His-Ade)培养基又能使X- α -gal变成蓝色的真阳性菌落39个, 其中有5个未知基因, 在genbank中未找到同源序列, 在HepG2细胞的mRNA中成功扩增出该基因的全序,

体外免疫共沉淀方法证明HBeAg与新基因E-19表达的蛋白质在体外也有结合作用。

结论: 成功克隆出 HBeAg 的肝细胞结合蛋白, 发现与 HBeAg 有相互作用的未知蛋白新基因, 为 HBeAg 的功能研究提出新线索。

陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒e抗原结合蛋白E-19的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1118-1121

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1118.asp

0 引言

乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)是核壳蛋白的分泌型, 研究发现HBeAg对乙型肝炎病毒(HBV)的感染和复制无重要作用, 有学者提出他可能具有免疫调节的作用而导致HBV感染的持续^[1-3]. HBeAg可阻断细胞毒性T淋巴细胞优先清除对HBcAg特异的Th1细胞及Th1细胞介导的抗-HBc抗体反应, 使免疫应答转换为Th2细胞亚型, 使HBV逃避免疫清除, 感染慢性化^[4-7]. 但HBeAg与肝细胞之间的相互作用的机制尚不清楚, 此方面的研究较少, 从寻找HBeAg与肝细胞间的相互作用蛋白入手, 可望在研究HBeAg的确切生物学功能方面有所发现^[8-10].

1 材料和方法

1.1 材料 AH109酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4^Δ, gal80^Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lacZ MEL1)、预转化的cDNA肝文库(Y187)、pGBKT7-BD、pGADT7-AD克隆载体及酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp-Leu-His, SD/-Trp-Leu-His-Ade等培养基、X-α-gal 购于Clontech公司. 大肠杆菌DH5 α及HBV ayw亚型基因全序列质粒载体pCP10为本室保存, c-myc单克隆抗体本室自制, 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG购于北京中山生物公司. Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、EcoR I和Pst I购于Takara生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG及X-β-Gal及pGEM-T载体、RT-PCR试剂盒购于Promega公司. TEMED购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于Sigma公司. HepG2细胞购于中科院上海细胞生物研究所. HBeAg扩增引物(P1 5'-GAATTCATGCAACTTTTTCACCTCTG-3', p2 5'-CTGCAGGCCCAAGCCACCCAAGGC-3', 新基因E-19扩增引物(P3 5'-GAATTCATGTCATGGACACCCACCTC-3', P4 5'-GGATCCAGAAAGAAACA GGG TGAGGG-3')的合成及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 PCR扩增HBeAg基因与

pGBKT7载体连接, 酶切鉴定后醋酸锂法转化入酵母菌株AH109, 提取酵母蛋白质用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western免疫印迹法验证HBeAg在酵母中的表达.

1.2.2 诱饵与肝文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp培养基上生长的pGBKT7-HBeAg质粒的酵母AH109菌落一到数个接种于SD/-Trp培养基中, 30℃ 250 r·min⁻¹振荡过夜, 次日离心后用2×YPDA培养液5 mL重悬细胞, 计数细胞数大于1×10¹²·L⁻¹时与1 mL的肝文库酵母细胞在50 mL 2×YPDA中30℃ 30-50 r·min⁻¹配合18-24 h, 离心用1×YPDA 10 mL重悬细胞, 分别取250 μL铺于15 cm的SD/-Trp-Leu-His(3缺), SD/-Trp-Leu-His-Ade(4缺)培养基各25块上, 同时将配合产物按1:10、1:100、1:1 000铺于SD/-Trp-Leu培养基上检验配合效率. 生长6-18 d后挑取大于直径3 mm的菌落再次划线于铺有X-α-gal的4缺培养基上检查X-α-gal酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. 提取阳性酵母细胞中的质粒, 电穿孔法转化大肠杆菌, 氨苄青霉素平板筛选阳性克隆并测序.

1.2.3 新基因全序及表达载体的克隆及重组 根据Genbank的序列信息设计引物p3、p4, 以HepG2细胞的mRNA为模板, 逆转录RT-PCR扩增E-19基因的全序列, 送DNA测序鉴定后EcoR I、BamH I双酶切克隆入酵母表达载体pGADT7.

1.2.4 体外免疫共沉淀 TNT网织红细胞裂解物体外翻译HBeAg和E-19蛋白(在此过程中掺入³⁵S), 二者各取5 μL在1.5 mL的微离心管中冰上混合, 30℃孵育1 h, 加入470 μL免疫共沉淀缓冲液、10 μL G蛋白-琼脂糖珠、10 μL c-myc单克隆抗体、4℃孵育2 h. 14000 r·min⁻¹离心1-2 min, 弃上清. 加入TBST 0.5 mL洗3次, 加15 μL SDS上样缓冲液, 80℃加热变性5 min, 瞬时离心后将上清10 μL上样到SDS-PAGE胶上电泳, 清洗固定凝胶后, 恒定60℃真空干燥40 min, -20℃条件下放射自显影.

2 结果

2.1 pGBKT7-HBeAg重组诱饵质粒的构建及表达 成功扩增出HBeAg基因片段, 连接到pGBKT7载体中酶切鉴定结果正确. 诱饵质粒转化酵母AH109株, 提酵母蛋白质进行SDS-PAGE和Western免疫印迹分析结果显示, 对照无表达, 而转化了pGBKT7-HBeAg的酵母蛋白提取物Western印迹分析可见明显目的条带(图1).



图1 pGBKT7-HBeAg酵母表达Western免疫印迹分析.

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果 配合后筛选出既能在在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有X- α -半乳糖(X- α -gal)的四缺培养基上生长并变成蓝色的真阳性菌落39个,其中有5个未知基因,在GenBank中未找到同源序列。

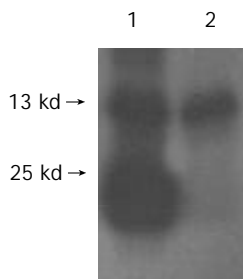
2.3 新基因全序及表达载体的克隆及重组结果 RT-PCR方法成功克隆出E-19新基因的完整序列(图2),大小为351 bp, Genbank 注册号AF529373,并接入pGADT7载体。

```

      M S W T P T S C S C G L G D G
1  ATG TCA TGG ACA CCC ACC TCT TGT TCC TGC GGC CTC GGT GAT GGC
      I G H I L G V Q R R P T R A R
46  ATA GGT CAC ATT TTG GGA GTT CAG AGG AGG CCT ACA AGG GCA AGG
      S D G R A R L V L R A S L S L
91  TCA GAT GGC AGA GCA AGG TTG GTC CTC AGG GCC TCT CTA AGC CTT
      R A P P L L G L G C L V N C H
136 AGG GCC CCT CCT CTC CTT GGC CTT GGC TGT TTG GTT AACT GTT CAC
      L P L R A S A L Y L F P S S Q
181 CTT CCA CTC AGG GCC TCT GCT CTA TAT CTA TTC CCT TCC AGC CAG
      T G R W G L P P T P E D E D K
226 ACT GGC AGA TGG GGG CTT CCC CCT ACC CCT GAG GAT GAG GAC AAG
      P L G Q F S V P V L L P W A A
271 CCC CTC GGC CAG TTC AGC GTT CCC GTG CTT CTC CCT TGG GCA GCC
      S L L S P S P C F F L *
316 TCT CTC TTG AGC CCC TCA CCC TGT TTC TTT CTG TGA
  
```

图2 E-19新基因序列(Genbank号AF529373)。

2.4 体外免疫共沉淀再次证实结合作用 HBeAg的M_r25 000,新基因E-19编码蛋白的M_r13 000,经体外翻译相互作用SDS电泳后,放射自显影图上可看出,1泳道两条带的大小正确,对照2泳道仅有HBeAg一条带,证实二者在体外也能相互结合(图3)。



1: HBeAg+E-19; 2: HBeAg
图3 免疫共沉淀结果。

3 讨论

近年来由于乙肝疫苗的广泛应用对HBV感染起到了一定的阻断作用,但全世界仍有超过3.5亿人处于HBV慢性感染状态,成为重要的传染源,其中有很大部分要转化为肝硬化、肝癌^[11-14]。在HBV感染的漫长过程中,大多数感染者由于HBeAg的阴转及抗HBe的出现

而伴随病毒复制明显减少;但少数HBeAg阴性的感染者体内病毒仍有持续或间断的高水平复制,并伴肝细胞坏死性炎症及进行性纤维化。既往的研究结果普遍认为HBeAg是一种免疫调节因子,可调节宿主的免疫应答,抑制宿主T细胞的细胞毒活性,形成对HBV感染的免疫耐受性^[15-17]。另一方面,由于HBeAg含有病毒高度保守的体液和细胞抗原靶位,与HBcAg有部分共同的序列,有相同的抗原靶位,当HBeAg发生突变时,失去血清中HBeAg的调节,表达HBcAg的肝细胞经受增强的T细胞的细胞毒作用,可导致病情加重^[18-22]。血中抗HBe长期阳性的患者,发生肝硬化、肝癌的几率较高,原因不清,这些发现使得HBeAg的生物学功能变得更复杂。寻找肝细胞中HBeAg的相互作用蛋白,并进一步阐明其机制,对于明确上述问题有着重要意义。

在本项研究中所使用的酵母双杂交系统3,在原有系统的基础上增加了报告基因的数量,分别与BD和AD结合的HBeAg和肝文库中的蛋白要确实有相互作用,才能同时激活下游的3个报告基因,表达3种编码产物,加上2个载体上各自带有的氨基酸报告基因,筛出的真阳性菌落才能在缺乏4种氨基酸的培养基上生长,并能分解x- α -gal显现蓝色。另外,该系统利用a型和 α 型酵母配合形成的二倍体细胞内,诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用的原理,免去了需要共转染2种质粒所带来的低效率问题,并将真阳性率提高到95%,大大增强了结果的可靠性^[23,24]。

我们应用此技术构建了pGBKT7-HBeAg诱饵表达质粒,在预转化的人肝cDNA文库中“钓”出与HBeAg有相互作用的蛋白基因20种,其中3种为未知基因,在genbank中未发现与之同源的表达基因序列^[25-31]。根据genbank的信息,我们自行设计了新基因E-19的上下游引物,并成功地从HepG2细胞的mRNA中逆转录出该基因的完整序列,说明该基因能在HepG2细胞中表达。将其连入另一酵母表达载体pGADT7,与pGBKT7-HBeAg一起分别在TNT网织红细胞系统翻译,掺入同位素,免疫共沉淀方法分析,结果显示新基因E-19的表达产物在体外能与HBeAg结合,聚丙烯酰胺凝胶电泳可见二者配合后的两条带,对应的分子量大小正确。HBeAg的肝细胞结合蛋白新基因E-19的发现及证实,提示我们对HBeAg生物学功能、HBV致病机制的认识存在很大的局限性,目前的研究着眼点可能遗漏了很多重要的方面,或许有更关键的因素没有被发现,而使研究工作误入歧途;新基因的发现同时也为今后的科研工作指明了新的方向。

4 参考文献

- 1 Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-2021
- 2 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol*

- Hepatology* 1997;12:218-222
- 3 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:178-187
 - 4 Wan K, Tang S, Gong H. Relationship between T cell subgroups and HBV markers in the patients with chronic hepatitis B. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 1999;24:590
 - 5 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
 - 6 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral Res* 2001;52:99-111
 - 7 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
 - 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 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
 - 10 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
 - 11 Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, Kajiya Y, Takeda Y, Higashi S, Hamasaki K, Nakao K, Nakata K, Eguchi K. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:2663-2668
 - 12 Miranda J, Cabezas C. Hepatitis B among health workers. *Rev Gastroenterol Peru* 2001;21:128-135
 - 13 Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-486
 - 14 Marx G, Martin SR, Chicoine JF, Alvarez F. Long-term follow-up of chronic hepatitis B virus infection in children of different ethnic origins. *J Infect Dis* 2002;186:295-301
 - 15 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002;76:8609-8620
 - 16 Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin- α 1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002;9:280-287
 - 17 Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
 - 18 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Nondeletional T-cell receptor transgenic mice: model for the CD4(+) T-cell repertoire in chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2000;74:7587-7599
 - 19 Jiang R, Lu Q, Hou J. Polarized populations of T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2000;80:741-744
 - 20 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
 - 21 Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Gruner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999;116:650-657
 - 22 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
 - 23 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
 - 24 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
 - 25 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Duan HJ, Zhang LX. Cloning and expression of hepatitis B virus X gene in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:15-18
 - 26 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y. Cloning and expression of pre-s1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2002;27:341-342
 - 27 Lu YY, Li K, Liu Y, Wang L, Cheng J, Zhang LX. Cloning and expression of PreS2 gene of hepatitis B virus in yeast. *Weichangbingxue He Ganbingxue Zazhi* 2002;11:222-224
 - 28 Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y. Screening and cloning of the genes of protein interacting with human augmentor of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:161-164
 - 29 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core protease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
 - 30 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Li L, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yeast two hybrid 'Bait' vector in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:129-132
 - 31 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L. Mutual interaction between hepatitis C virus core protein and translin, a recombination hotspot binding protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1-5

酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究

陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞

陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
陆荫英, 女, 1973-08-27 生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 博士, 2003 年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础及临床工作。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Screening and identification of a novel gene coding for Hepatitis B virus core antigen interacting protein C-12 in hepatocytes

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

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Chen, Jun Cheng, Qing Shao, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhonglu, Beijing 100039, China
Supported by Grants from National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: Hepatitis B virus (HBV) core protein (HBcAg) is present in the nucleus and cytoplasm of infected hepatocytes. Phosphorylation of HBcAg was a prerequisite for pregenomic RNA encapsidation into viral capsids. HBcAg capsids are extremely immunogenic and can activate naive B cells by cross-linking their surface receptors and HBcAg-specific CD4(+) T-cell responses are believed to play an important role in the control of human HBV infection. To investigate the complex biological functions of HBcAg, we employed yeast-two hybrid technique to screen proteins in hepatocytes interacting with HBcAg.

METHODS: HBcAg gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The pGBKT7-HBcAg bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3 and transformed into yeast cells AH109, then mated with yeast cells Y187 containing liver cDNA library plasmid in 2×YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout

nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- α -gal for selection two times. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, we conducted bioinformatics analysis. Primers of new gene were designed according to the information in Genbank and used to amplify the complete sequence of new gene C-12#. Gene of C-12# was ligated into another yeast expression vector pGADT7 and transformed into yeast cell Y187 and mated with yeast cell AH109 containing pGBKT7-HBcAg bait plasmid to further verify the interaction between HBcAg and the novel protein coded by the new gene C-12.

RESULTS: Sixteen colonies were sequenced. Among them, there were four new genes with unknown function. The complete sequence of new gene C-12 was successfully amplified from the mRNA of HepG2 cell by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The interaction between HBcAg and the novel protein coded by the new gene C-12 was further confirmed by re-mating.

CONCLUSION: Genes of HBcAg interacting proteins in hepatocytes were successfully cloned. The findings of new genes coding for HBcAg associated proteins pave the way for studying the biological functions of HBcAg.

Lu YY, Chen TY, Cheng J, Shao Q, Liang YD, Wang L, Liu Y, Zhang J, Li K, Zhang LX. Screening and identification of a novel gene coding for Hepatitis B virus core antigen interacting protein C-12 in hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1122-1125

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白(HBcAg)在HBV感染的肝细胞中可同时存在于细胞核和胞质中,对于病毒前基因组 RNA 装配入核壳体是必须的,HBcAg 还是 HBV 介导体液免疫反应和 CD4⁺T 细胞免疫反应的重要抗原,寻找人肝细胞 cDNA 文库中与 HBcAg 相互作用蛋白的基因,是研究 HBcAg 生物学功能的重要途径。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增 HBcAg 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- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选阳性菌落,PCR 从中扩增出目的片段并测序,进行生物信息学分析。根据 Genbank 的信息设计新基因的引物,从 HepG2 细胞的 mRNA 中逆转录 PCR 扩增出 C-12# 新基因的完整序列,连入另一酵母表达载体 pGADT7,并转化进酵母细胞 Y187,再次与转化了诱饵质粒的酵母细胞 AH109 配合(回交),以进一步证实 HBcAg 与 C-12# 新基因编码蛋白的结合作用。

结果: 成功克隆出HBcAg基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-His-Ade)培养基又能在铺有X- α -gal的四缺培养基上均能生长, 并变成蓝色的真阳性菌落16个, 其中未知基因4个. 用自行设计的引物成功地从HepG2细胞的mRNA中扩增出C-12#新基因的完整序列, 回交实验再次证实二者之间的结合作用。

结论: 成功克隆出HBcAg的肝细胞结合蛋白, 发现未知功能基因, 为进一步研究HBcAg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。

陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因C-12的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1122-1125

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1122.asp>

0 引言

在HBV感染的肝细胞中, HBcAg同时存在于胞核和胞质内, 具有保护病毒mRNA, 防止其被RNA酶降解的作用; HBcAg与病毒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^[1,2], 其磷酸化作用对于乙肝病毒前基因组RNA的装配入核壳体、基因组DNA的合成必不可少^[3-5]. 在介导免疫应答方面, HBcAg特异性CD4⁺T细胞免疫应答是清除HBV的重要反应^[6-8]; 另外, B细胞刺突尖部有HBcAg的抗原决定簇, 可产生相应的体液免疫反应^[9]. 利用酵母双杂交技术寻找HBcAg与肝细胞中相互作用的蛋白, 对于明确HBV致病机制, 有效防治乙型肝炎有着重要意义^[10-16].

1 材料和方法

1.1 材料 AH109酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lacZ MEL1)、预转化的cDNA肝文库(Y187)、pGBKT7-BD克隆载体及酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp-Leu-His, SD/-Trp-Leu-His-Ade等培养基、X- α -gal 购于Clontech公司. 大肠杆菌DH5 α 及HBV ayw亚型基因全序列质粒载体pCP10为本室保存, c-myc单克隆抗体本室自制. 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG 购于北京中山生物公司. Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、EcoRI和PstI 购于Takara生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG及X- β -Gal及pGEM-T载体、Trizal RNA提取及RT-PCR试剂盒购于Promega公司. TEMED 购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于Sigma公司. HBcAg扩增引物(P1 5'-GAATTCATGGACATCGACCCTTATAA-3', P2 5'-CTGCAGAACATTGAGATTCCC GAGAT-3', 肝文库插入序列扩增引物(P3 5'-CTATT CGATGATGAAGATACCCC ACCAAACCC-3', P4 5'-GTGAACTTGCGGGGTTT TTCAGTATCTACGA-3'),

新基因扩增引物(P5 5'-GAATTCATGGACATCGACCCTTATAA-3', P6 5'-CTCAGAACATTGAGATTCCCGAGAT-3')合成及DNA测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法 (1) 诱饵质粒的构建及表达: PCR扩增HBcAg基因与pGBKT7载体连接, 酶切鉴定后转化入酵母菌株AH109, 提取酵母蛋白质用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western免疫印迹法验证HBcAg在酵母中的表达. (2) 诱饵与肝文库的酵母配合: 挑取在SD/-Trp培养基上生长的pGBKT7-HBcAg质粒的酵母AH109菌落一到数个接种于SD/-Trp培养基中, 30℃ 250 r·min⁻¹振摇过夜, 次日离心后用2×YPDA培养液5 mL重悬细胞, 计数细胞数大于1×10¹²·L⁻¹时与1 mL的肝文库酵母细胞在50 mL 2×YPDA中30℃ 30-50 r·min⁻¹配合18-24 h, 离心用1×YPDA 10 mL重悬细胞, 分别取250 μ L铺于15 cm的SD/-Trp-Leu-His(3缺), SD/-Trp-Leu-His-Ade(4缺)培养基各25块上, 同时将配合产物按1:10、1:100、1:1 000铺于SD/-Trp-Leu培养基上检验配合效率. 生长6-18 d后挑取大于直径3 mm的菌落再次划线于铺有X- α -gal的4缺培养基上检查X- α -gal酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. PCR扩增出文库靶基因片段后测序并进行生物信息学分析. (3) C-12新基因的克隆: Trizal RNA提取试剂盒提取HepG2细胞的RNA, 逆转录成cDNA, 以cDNA为模板, 以P5、P6为引物行PCR扩增出C-12新基因的完整序列, 酶切后并连接入另一酵母表达载体pGADT7中. (4) 回交实验: 将构建好的pGADT7-C12#新基因质粒转化入 α 型酵母细胞Y187, 接种在1缺亮氨酸的SD平板上, 筛选出的阳性菌落再次与转化了诱饵质粒的a型酵母细胞AH109配合, 4缺/SD培养基上筛选鉴定, 进一步验证HBcAg与C-12#新基因表达产物的结合作用。

2 结果

2.1 pGBKT7-HBcAg重组诱饵质粒的构建及表达 利用引物P1、P2成功扩增出HBcAg基因片段, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示片段为549 bp, 测序结果完全符合报告序列. 连接到用相同酶所切的pGBKT7载体中, 经酶切鉴定结果正确. 醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母AH109后在SD/-Trp培养基上筛选生长6-8 d, 挑取阳性菌落培养后提酵母蛋白质, 进行SDS-PAGE和Western免疫印迹分析结果显示, 对照无表达而转化了pGBKT7-HBcAg的酵母蛋白提取物Western印迹分析可见明显目的条带(图1), 说明HBcAg基因已成功地在酵母中表达。

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果 配合后筛选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有X- α -半乳糖(X- α -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落16个, 用文库扩增引物行PCR, 扩增出目的片段并测序, 结果在GenBank中进行分析,

找到未知基因4个。

2.3 新基因 C-12 全序列的克隆 用引物 P5, P6 成功地从 HepG2 细胞 cDNA 中扩增出 C-12# 新基因的全序列长 591 bp (图 2), 并连入载体 pGADT7 中 (图 3)。



图 1 pGBKT7-HBcAg 酵母细胞表达 Western 免疫印迹分析。

M I S E G G W G W Q G W G R S Q G

1 ATG ATA AGT GAA GGC GGA TGG GGA TGG CAG GGG TGG GGG CGA AGC CAA GGT

L R P A P C S W V S R M V S P P A

52 CTG AGA CCT GCA CCC TGC AGC TGG GTC AGC AGG ATG GTA TCT CCA CCC GCG

A I Q E T Q L H F L A D T L P S P

103 GCC ATC CAG GAA ACA CAG CTC CAT TTC CTT GCT GAC ACC CTC CCC TCC CCG

L S I L L P P H K Q E E L S Q S Q

154 TTG TCC ATC CTG CTC CCT CCC CAC AAG CAA GAG GAG TTG TCC CAG AGT CAG

L L I A D L L P A S D L G N F Q T

205 CTC CTC ATA GCT GAC CTC TTA CCA GCT TCG GAT CTA GGA AAC TTC CAG ACT

S R E T Q S Y Q K A Q P T P I S F

256 TCT AGG GAG ACA CAG AGC TAC CAG AAA GCC CAA CCC ACC CCC ATC TCT TTC

S P D H R K V S R D V I P G A A L

307 TCT CCA GAT CAT AGG AAA GTA TCA AGG GAT GTC ATT CCG GGA GCA GCC CTT

G T A S S R C W Q M L C P S P S V

358 GGG ACA GCC AGC AGC AGG TGC TGG CAG ATG CTC TGT CCT TCA CCC TCT GTC

P G T R W G R P Q W K L L N S V T

409 CCC GGC ACC AGA TGG GGA AGG CCA CAG TGG AAA CTT CTC AAT TCC GTC ACA

G Q S S D T V I S Q F S L A M S F

460 GGG CAG AGC TCT GAC ACT GTT ATA AGT CAG TTC TCC CTG GCC ATG TCT TTT

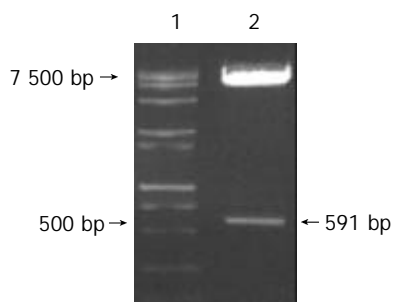
P N F P V P Q L R F L N T C S T D

511 CCT AAT TTT CCT GTC CCA CAA CTT AGG TTC CTT AAC ACT TGT TCT ACA GAT

E T K K S S V N K *

562 GAA ACA AAA AAG TCC TCT GTT AAC AAG TAG

图 2 c-12# 新基因序列图 (HBcbp, Genbank number: AF 529371)。



1: DNA Marker; 2: pGADT7-C12 质粒
图 3 pGADT7-C12 质粒酶切图。

2.4 回交实验 pGADT7-C12# 重组质粒转化入酵母 Y187, 在缺亮氨酸的 SD 平板上长出阳性菌落, 再次与转化了诱饵质粒的酵母 AH109 配合, 配合后的二倍体酵母能在 4 缺/SD 平板上长出阳性菌落, 说明 HBcAg 和 C12# 编码的蛋白有结合作用。

3 讨论

近年来新发展起来的酵母双杂交系统是一种分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用的一种分子生物学技术, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了有效的遗传学方法。分别融合到一酵母转录激活因子 GAL4 的 BD 和 AD 上的两种蛋白 X 和 Y 之间的相互作用重构了激活因子, 导致下游报告基因的转录, 产生容易探测到的表型, 间接证明 X 和 Y 两蛋白间有相互作用^[17,18]。

HBcAg 在感染肝细胞中可同时存在于胞核和胞质, 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, 他在肝内的分布与病毒的复制状态、炎症活动程度密切相关^[19]。HBcAg 有高免疫原性, 几乎所有 HBV 感染者均产生抗 HBc, HBcAg 通过 B 细胞表面受体轻重链的 FR1-CDR1 连接区域结合而激活 B 细胞产生抗体^[20], 同时还是 CTL 免疫应答的靶抗原, 针对 HBcAg 的细胞免疫应答在病毒清除中起重要作用^[21]。HBcAg 受细胞激酶或病毒编码的激酶作用部分磷酸化, 磷酸化是前基因组 RNA 包被入病毒核壳体过程中必不可少的环节; HBcAg 有鱼精蛋白样亲胞核性的羧基末端, 磷酸化后该末端的核定位序列暴露, HBcAg 与核孔复合体结合通过直接转运介导病毒基因组向核内转运, 而其他嗜肝 DNA 病毒的核壳体蛋白都不转运核内, 但到目前为止还没有发现宿主肝细胞中有与之有关的任何激酶^[22,23]。HBcAg 与肝细胞蛋白的相互作用是病毒装配、释放、清除过程中关键的环节, 找出其间的联系对于探明 HBV 致病机制, 寻找有效的防治方法有着深远意义^[24-28]。

本研究中所用的 Clontech 公司的酵母双杂交系统 3, 下游采用了 3 种报告基因, 由于增加了报告基因的种类, 使单个报告基因自激活出现假阳性的几率大大降低, 筛选结果的真阳性率可达 95 %^[29-32]。我们在真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-HBcAg 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBcAg 基因, 与转化了人肝 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 16 种, 其中 4 种为未知基因, 在 GenBank 中未发现同源序列。根据 GenBank 的信息, 我们设计了新基因 C-12 的上下游引物, 并成功地从 HepG2 细胞的 mRNA 中逆转录出该基因的完整序列, 说明该基因也能在 HepG2 细胞中表达。由于 C-12 新基因序列的大小与 HBcAg 相差仅几十个碱基, 体外免疫共沉淀后电泳很难将二者分开, 因此我们只有将其连入另一酵母表达载体 pGADT7, 转化入酵母菌株 Y187,

并再次与表达了 HBcAg 的 AH109 配合, 通过回交实验进一步证实 HBcAg 与 C-12# 新基因表达产物结合. 新基因的发现为我们研究 HBcAg 的功能提出了新线索, 对新基因功能的深入研究将对感染机制的了解及阻断提出新的思路, 对 HBV 感染的防治工作有着重要意义.

4 参考文献

- 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
- 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 secretion. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137
- Duclos-Vallee JC, Capel F, Mabit H, Petit MA. Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *J Gen Virol* 1998;79:1665-1670
- Kau JH, Ting LP. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* 1998;72:3796-3803
- 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
- Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
- Cao T, Meuleman P, Desombere I, Sallberg M, Leroux-Roels G. In vivo inhibition of anti-hepatitis B virus core antigen (HBcAg) immunoglobulin G production by HBcAg-specific CD4(+) Th1-type T-cell clones in a hu-PBL-NOD/SCID mouse model. *J Virol* 2001;75:11449-11456
- Lazdina U, Cao T, Steinbergs J, Alheim M, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Leroux-Roels G, Sallberg M. Molecular basis for the interaction of the hepatitis B virus core antigen with the surface immunoglobulin receptor on naive B cells. *J Virol* 2001;75:6367-6374
- Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Duan HJ, Zhang LX. Cloning and expression of hepatitis B virus X gene in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:15-18
- Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y. Screening and cloning of the genes of protein interacting with human augmenter of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:161-164
- Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core proyein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Li L, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yaest two hybrid 'Bait' vector in yeast. *Shijie Huaren Xiaoh Zazhi* 2002;10:129-132
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L. Mutunal interaction between hepatitis C virus core protein and translin, a recombination hotspot binding protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1-5
- Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-s1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2002;27:341-342
- Lu YY, Li K, Liu Y, Wang L, Cheng J, Zhang LX. Cloning and expression of PreS2 gene of hepatitis B virus in yeast. *Weichangbingxue He Ganbingxue Zazhi* 2002;11:222-224
- Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- Huang CJ, Chen YH, Ting LP. Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein. *J Biomed Sci* 2000;7:160-168
- Lazdina U, Cao T, Steinbergs J, Alheim M, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Leroux-Roels G, Sallberg M. Molecular basis for the interaction of the hepatitis B virus core antigen with the surface immunoglobulin receptor on naive B cells. *J Virol* 2001;75:6367-6374
- Tsai SL. Immunopathogenesis of viral hepatitis B and C. *Changcheng Yixue Zazhi* 1999;22:159-170
- Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1999;145:45-55
- Usuda S, Okamoto H, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. An enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies for the determination of phosphorylated hepatitis B core protein (p21c) in serum. *J Virol Methods* 1998;72:95-103
- Fehr T, Skrastina D, Pumpens P, Zinkernagel RM. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9477-9481
- Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 2000;191:503-514
- Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology* 2001;44:98-114
- Ulrich R, Koletzki D, Lachmann S, Lundkvist A, Zankl A, Kazaks A, Kurth A, Gelderblom HR, Borisova G, Meisel H, Kruger DH. New chimaeric hepatitis B virus core particles carrying hantavirus (serotype Puumala) epitopes: immunogenicity and protection against virus challenge. *J Biotechnol* 1999;73:141-153
- Murray K, Shiau AL. The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides. *Biol Chem* 1999;380:277-283
- Nagpal S, Ghosn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493

乙型肝炎病毒X蛋白与去唾液酸糖蛋白受体2突变体相互作用的研究

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
陆荫英, 女, 1973-08-27生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础及临床工作。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Cloning of a gene coding for novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 binding to hepatitis B virus X protein in hepatocytes

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

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Chen, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Qing Shao, Ke Li, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhonglu, Beijing 100039, China
Supported by Grants from National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: The pathogenesis of HBV-induced malignant transformation is incompletely understood. The X protein of hepatitis B virus (HBxAg) is a multifunctional protein that can influence a variety of signal transduction pathways within the cell and is essential for establishing natural viral infection, it also has been implicated in the development of liver cancer associated with chronic infection. Further understanding of the interaction between HBxAg and proteins in hepatocytes is of great significance for the prevention of the development of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: HBxAg bait plasmid was constructed by ligating the HBxAg gene with a yeast expression vector pGBKT7, then transformed into yeast AH109 (a type). The transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2xYPD medium. Diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and syn-

thetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x-α-gal for selection twice. Plasmid of true positive blue colonies was extracted and analysed by DNA sequencing and blast in genbank. After the complete sequence of the novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 (ASGPR2) was amplified from the mRNA of HepG2 cell by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pGADT7 vector, the recombinant plasmid was translated by using reticulocyte lysate and analysed by immunoprecipitation technique *in vitro* together with HBxAg.

RESULTS: Eighteen genes in forty-one positive colonies were obtained, one of them is a novel mutant of ASGPR2, which is 80 % homologous to natural ASGPR2. The complete sequence of the mutant was amplified from the mRNA of HepG2 cell by RT-PCR successfully. The interaction between HBx and ASGPR2 mutant was further confirmed by immunoprecipitation technique.

CONCLUSION: Interaction between HBx and ASGPR2 mutant can be observed in both yeast cell and *in vitro*.

Lu YY, Chen TY, Cheng J, Liang YD, Wang L, Liu Y, Zhang J, Shao Q, Li K, Zhang LX. Cloning of a gene coding for novel mutant of asialoglycoprotein receptor 2 binding to hepatitis B virus X protein in hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1126-1130

摘要

目的: 筛选并克隆鉴定人肝细胞中与乙型肝炎病毒(HBV) X蛋白(HBxAg)相互作用蛋白的基因, 明确HBxAg在HBV感染及致癌过程中的具体作用。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBxAg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, PCR从中扩增出阳性目的片段并测序, 进行生物信息学分析。根据Genbank中的序列信息设计引物, 从HepG2细胞的mRNA中逆转录出去唾液酸蛋白受体2(ASGPR2)突变体的完整序列, 克隆到另一酵母表达载体pGADT7中, 体外免疫共沉淀再次证明HBxAg与ASGPR2突变体的结合作用。

结果: 成功克隆出HBxAg基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-His-Ade)培养基又能分解X-α-半乳糖(X-α-gal)变成蓝色的真阳性菌落41个, 其中有一个是ASGPR2的新突变体。HepG2细胞的mRNA中能逆转录出ASGPR2的全基因序列,

体外免疫共沉淀结果证实该突变体与HBxAg在体外也有结合作用。

结论: 成功克隆出HBxAg的肝细胞结合蛋白, 发现一新的ASGPR2突变体, 并证实HBxAg与ASGPR2突变体在体外及酵母细胞内均有结合作用。

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X蛋白与去唾液酸糖蛋白受体2突变体相互作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1126-1130

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1126.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染是引发肝细胞癌的主要危险因素, HBV编码的X蛋白(HBxAg)具有潜在的致癌作用, 在多种基因发生异常转化的过程中起转录协同激活作用, 但具体机制不清^[1-4]. 许多研究提示HBV X蛋白能抑制肿瘤抑制蛋白P53的功能并影响多种信号转导途径, 对多种增强子及启动子有反式激活作用^[5-7]; 还可以抑制肝细胞DNA的损伤修复, 激活细胞信号级联包括促分裂原蛋白激酶(MAPK), Janus家族酪氨酸激酶(JAK)/信号转导子和转录通路激活因子(STAT), 对肝细胞的生长繁殖、细胞凋亡和细胞生长检测点的调节有着广泛的影响, 在HBV诱导肝细胞癌的发生中起着重要作用^[8-10]. 筛选肝细胞中与HBxAg的结合蛋白对探讨HBV致癌的细胞效应机制提供重要线索。

1 材料和方法

1.1 材料 AH109酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4^Δ, gal80^Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lac Z MEL1)、预转化的cDNA肝文库(Y187)、pGBKT7-BD克隆载体及酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp-Leu-His, SD/-Trp-Leu-His-Ade等培养基、X-α-gal 购于Clontech公司. 大肠杆菌DH5α及HBV ayw亚型基因全序列质粒载体pCP10、HepG2细胞为本室保存, c-myc单克隆抗体本室自制. 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG购于北京中山生物公司. Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、EcoRI和PstI、BamHI购于Takara生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG及X-β-Gal及pGEM-T载体、Trizol总RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒购于Promega公司. TEMED购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于Sigma公司. HBxAg基因扩增引物(P1 5'-GAATTCATGGCTGCTAGGCTGTGCTG-3'和P2 5'-CTGCAGATGGTGCTGGTGCG CAGACC-3'), 肝文库插入基因序列扩增引物(P3 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3', P4 5'-GTGAACTTGCGG GGTTTTTCAGTATCTACGA-3'), 去唾液酸蛋白受体突变体基因扩增引物(P5 5'-GAATTCATG

GCCAAGGACTTTCAAGATATCC-3', P6 5'-GGATCCTCAGGCC ACCTCGCCGGTGGCATTG-3')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 PCR扩增HBxAg基因与pGBKT7载体连接, 酶切鉴定后醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母AH109株后在SD/-Trp培养基上筛选生长6-8 d, 挑取阳性菌落培养后提酵母蛋白质, 用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western免疫印迹法验证HBxAg在酵母中的表达。

1.2.2 诱饵与肝文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp培养基上生长的pGBKT7-HBxAg质粒的酵母AH109菌落一到数个接种于SD/-Trp培养基中, 30℃ 250 r·min⁻¹振摇过夜, 次日离心后用2×YPDA培养液5 mL重悬细胞, 计数细胞数大于1×10¹²·L⁻¹时与1 mL的肝文库酵母细胞在50 mL 2×YPDA中30℃ 30-50 r·min⁻¹配合18-24 h, 离心用1×YPDA 10 mL重悬细胞, 分别取250 μL铺于15 cm的SD/-Trp-Leu-His(3缺), SD/-Trp-Leu-His-Ade(4缺)培养基各25块上, 同时将配合产物按1:10、1:100、1:1 000铺于SD/-Trp-Leu培养基上检验配合效率. 生长6-18 d后挑取大于直径3 mm的菌落再次划线于铺有X-α-gal的4缺培养基上检查X-α-gal酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. PCR扩增出目的片段后测序并进行生物信息学分析。

1.2.3 新基因全序的克隆及重组表达载体的构建 根据Genbank的序列信息设计引物P5、P6, 以HepG2细胞的mRNA为模板, 逆转录PCR(RT-PCR)扩增ASGPR2基因的全序列, 送DNA测序鉴定后EcoRI、BamHI双酶切克隆入酵母表达载体pGADT7。

1.2.4 体外免疫共沉淀 TNT网织红细胞裂解物体外翻译HBxAg和ASGPR2突变体(在此过程中掺入³⁵S), 二者各取5 μl在1.5 mL的微离心管中冰上混合, 30℃孵育1 h, 加入470 μL免疫共沉淀缓冲液、10 μL G蛋白-琼脂糖珠、10 μL c-myc单克隆抗体、4℃孵育2 h. 14 000 r·min⁻¹离心1-2 min, 弃上清. 加入TBST 0.5 mL洗3次, 加15 μL SDS上样缓冲液, 80℃加热变性5 min, 瞬时离心后将上清10 μL上样到SDS-PAGE胶上电泳, 清洗固定凝胶后, 恒定60℃真空干燥40 min, -20℃条件下放射自显影。

2 结果

2.1 pGBKT7-HBx重组诱饵质粒的构建及表达 扩增出的HBxAg基因连接到pGBKT7载体中经酶切鉴定结果正确. 转化入酵母AH109株筛选到阳性菌落, 提酵母蛋白质进行SDS-PAGE和Western免疫印迹分析, 结果显示对照无表达而转化了pGBKT7-HBx的酵母蛋白提取物Western印迹分析可见明显目的条带, 说明HBxAg基因已成功地在酵母中表达。

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果 配合后筛选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有X-

α -半乳糖(X- α -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落41个,用文库扩增引物PCR扩增出目的片段并测序,结果在GeneBank中进行分析,发现其中1个含ASGPR2突变体基因。

2.3 新基因全序的克隆及重组结果 用引物P5、P6从HepG2细胞的mRNA中逆转录扩增出ASGPR2突变体基因的全序列(图1, 2),测序鉴定正确后克隆入酵母表达载体pGADT7,酶切鉴定结果正确(图3)。

```

      M A K D F Q D I Q Q L S S E E N D H
1  ATG GCC AAG GAC TTT CAA GAT ATC CAG CAG CTG AGC TCG GAG GAA AAT GAC CAT
      P F H Q G E G P G T R R L N P R R G
55 CCT TTC CAT CAA GGT GAG GGG CCA GGC ACT CGC AGG CTG AAT CCC AGG AGA GGA
      N P F L K G P P P A Q P L A Q R L C
109 AAT CCA TTT TTG AAA GGG CCA CCT CCT GCC CAG CCC CTG GCA CAG CGT CTC TGC
      S M V C F S L L A L S F N I L L L V
163 TCC ATG GTC TGC TTC AGT CTG CTT GCC CTG AGC TTC AAC ATC CTG CTG CTG GTG
      V I C V T G S Q S A Q L Q A E L R S
217 GTC ATC TGT GTG ACT GGG TCC CAA AGT GCA CAG CTG CAA GCC GAG CTG CGG AGC
      L K E A F S N F S S S T L T E V Q A
271 CTG AAG GAA GCT TTC AGC AAC TTC TCC TCG AGC ACC CTG ACG GAG GTC CAG GCA
      I S T H G G S V G D K I T S L G A K
325 ATC AGC ACC CAC GGA GGC AGC GTG GGT GAC AAG ATC ACA TCC CTA GGA GCC AAG
      L E K Q Q Q D L K A D H D A L L F H
379 CTG GAG AAA CAG CAG CAG GAC CTG AAA GCA GAT CAC GAT GCC CTG CTC TTC CAT
      L K H F P V D L R F V A C Q M E L L
433 CTG AAG CAC TTC CCC GTG GAC CTG CGC TTC GTG GCC TGC CAG ATG GAG CTC CTC
      H S N G S Q R T C C P V N W V E H Q
487 CAC AGC AAC GGC TCC CAA AGG ACC TGC TGC CCC GTC AAC TGG GTG GAG CAC CAA
      G S C Y W F S H S G K A W A E A E K
541 GGC AGC TGC TAC TGG TTC TCT CAC TCC GGG AAG GCC TGG GCT GAG GCG GAG AAG
      Y C Q L E N A H L V V I N S W E E Q
595 TAC TGC CAG CTG GAG AAC GCA CAC CTG GTG GTC ATC AAC TCC TGG GAG GAG CAG
      K F I V Q H T N P F N T W I G L T D
649 AAA TTC ATT GTA CAA CAC ACG AAC CCC TTC AAT ACC TGG ATA GGT CTC ACG GAC
      S D G S W K W V D G T D Y R H N Y K
703 AGT GAT GGC TCT TGG AAA TGG GTG GAT GGC ACA GAC TAT AGG CAC AAC TAC AAG
      N W A V T Q P D N W H G H E L G G S
757 AAC TGG GCT GTC ACT CAG CCA GAT AAT TGG CAC GGG CAC GAG CTG GGT GGA AGT
      E D C V E V Q P D G R W N D D F C L
811 GAA GAC TGT GTT GAA GTC CAG CCG GAT GGC CGC TGG AAC GAT GAC TTC TGC CTG
      Q V Y R W V C E K R R N A T G E V A
865 CAG GTG TAC CGC TGG GTG TGT GAG AAA AGG CGG AAT GCC ACC GGC GAG GTG GCC
      *
919 TGA

```

图1 ASGPR 突变体基因序列图(Genbank 号: AF 529374).

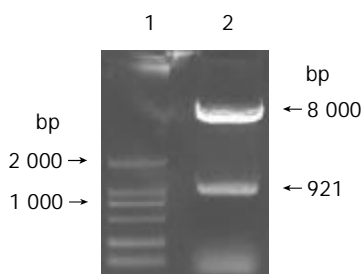
```

      188      205
G: TGGGTCCCAAAGTGAGGGTCACAGAGGTGCACAGCTGCAAGCCGA
M: TGGGTCCCAAAGTG.....CAC.....AGCTGCAAGCCGA
      244      248
68      69
G: AAGG.....GCCA
M: AAGGTGAGGGGCCAGGCACTCGCAGGCTGAATCCCAGGAGAGGAAATCCATTTTGAAGGGCCA
68      126

```

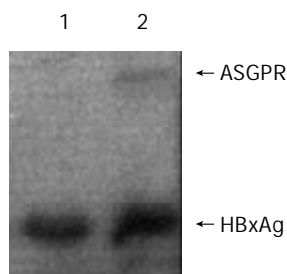
G: Genbank 的序列; M: 受体突变体序列

图2 新的去唾液酸蛋白受体突变体与 Genbank 中去唾液酸蛋白受体2的DNA序列比较。



1: DNA Marker; 2: pGADT7-ASGPR 质粒 EcoRI/PstI 双酶切
图 3 pGADT7-ASGPR 质粒酶切鉴定.

2.4 体外免疫共沉淀结果 放射自显影照片结果显示, 在泳道 2 出现各自的两条带的分子量大小正确, 说明 HBxAg 与该去唾液酸蛋白受体新的突变体在体外也能结合(图 4).



1: HBxAg; 2: HBxAg+ASGPR
图 4 体外免疫共沉淀图.

3 讨论

HBV 慢性感染可导致肝硬化、肝细胞癌发生, 其中 HBxAg 在致瘤方面的作用尤为重要, 已有研究证实 HBxAg 引起细胞基因异常是导致肝细胞癌过程中肝细胞异常增生的早期事件, 但具体机制尚未清楚. 近年来发现 HBxAg 的功能非常复杂^[11], 他能通过不同途径 (包括刺激蛋白激酶活性) 影响信号转导通路、反式激活各种细胞及病毒的启动子及增强子、抑制 P53 蛋白作用、妨碍 DNA 损伤修复, 并能通过诱导或封闭细胞凋亡来协调细胞增生及程序性坏死间的平衡^[12-19], 从而引起肝细胞基因突变, 肝细胞癌的发生. 持续低水平的 HBxAg 表达可导致 HCC 的发生, 但 HBxAg 的结构中不含能提供其细胞定位及在病毒感染肝细胞中起作用的特定的核定位信号、DNA 结合位点及其他的蛋白质结构域. 明确 HBxAg 在肝细胞中到底与哪些蛋白质因子相互作用、如何作用, 对于研究 HBV 在自然感染中所起的具体生物学功能是非常关键的^[20-26].

酵母双杂交系统是新近发展起来的一种分子生物学技术, 能有效分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用. 该系统通过将两个推定相互作用的用蛋白 X 和 Y 被分别融合到一酵母转录激活因子的 BD 和 AD 上, X 与 Y 的相互作用重构了激活因子的完整性能导致下游“报告基因”的转录, 产生易探测到的表型, 间接证实 X 与 Y 蛋白间的结合作用^[27-30]. 利用 Clontech 公司新推出的酵母双杂交系统 3, 我们在

真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-HBx 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBxAg 基因, 与人肝 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 18 种, 其中一个基因与 ASGPR2 的基因高度同源, 推测是一个新的突变体, 该突变体在第 68-69 位碱基间比 ASGPR2 基因多 57 个碱基, 在 244-248 位碱基间较 ASGPR2 基因少 15 个碱基.

体内糖蛋白通过去唾液酸糖蛋白途径代谢, 他们被去唾液酸后通过去唾液酸糖蛋白受体在肝脏被吸收. 由于肝细胞表面富含 ASGPR, ASGPR 现已被用做多种抗-HBV 药物的肝细胞靶向载体, 以增强抗肝炎病毒药物的疗效^[31]. 有报道从患者体内分离出的 HBV 病毒粒子能与 ASGPR 结合, 进一步研究发现 HBV 是通过前 S1 相关的包膜结合位点与 ASGPR 结合, 介导肝细胞对 HBV 病毒粒子的胞饮作用, 可能是 HBV 进入肝细胞的一个机制^[32,33]. 在本项研究中发现 HBxAg 能与 ASGPR2 结合, 对于研究 HBxAg 在 HBV 感染及 HCC 发生中的具体功能又提出了新的线索, 二者结合后会引起哪些的生物学效应是下一步研究的重点.

4 参考文献

- Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62: 29-37
- Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- Yeh CT. Hepatitis B virus X protein: searching for a role in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:339-341
- Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997;150:1141-1157
- Feitelson MA. Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobil Pancreat Surg* 1998;5:367-374
- Wang XW. Microinjection technique used to study functional interaction between p53 and hepatitis B virus X gene in apoptosis. *Mol Biotechnol* 2001;18:169-177
- Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12:189-205
- Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
- Mosialos G. The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol* 1997;8:121-129
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276:16969-16977
- Jaitovich-Groisman I, Benlimame N, Slagle BL, Perez MH, Alpert L, Song DJ, Fotouhi-Ardakani N, Galipeau J, Alaoui-Jamali MA. Transcriptional regulation of the TFIIF transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus

- x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem* 2001;276:14124-14132
- 14 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276:8328-8340
- 15 Yun C, Lee JH, Park H, Jin YM, Park S, Park K, Cho H. Chemotherapeutic drug, adriamycin, restores the function of p53 protein in hepatitis B virus X (HBx) protein-expressing liver cells. *Oncogene* 2000;19:5163-5172
- 16 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1→S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000;19:3384-3394
- 17 Su Q, Schroder CH, Otto G, Bannasch P. Overexpression of p53 protein is not directly related to hepatitis B x protein expression and is associated with neoplastic progression in hepatocellular carcinomas rather than hepatic preneoplasia. *Mutat Res* 2000;462:365-380
- 18 Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 2000;19:1173-1180
- 19 Jia L, Wang XW, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int J Cancer* 1999;80:875-879
- 20 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Duan HJ, Zhang LX. Cloning and expression of hepatitis B virus X gene in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:15-18
- 21 Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Wang G, Liu Y, Duan HJ, Hong Y. Screening and cloning of the genes of protein interacting with human augments of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:161-164
- 22 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- 23 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Li L, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yeast two hybrid 'Bait' vector in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:129-132
- 24 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L. Mutual interaction between hepatitis C virus core protein and translin, a recombination hotspot binding protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1-5
- 25 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2002;27:341-342
- 26 Lu YY, Li K, Liu Y, Wang L, Cheng J, Zhang LX. Cloning and expression of PreS2 gene of hepatitis B virus in yeast. *Weichangbingxue He Ganbingxue Zazhi* 2002;11:222-224
- 27 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 28 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 29 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 30 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 31 Treichel U, Meyerzum-Buschenfelde KH, Dienes HP, Gerken G. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol* 1997;142:493-498
- 32 De Meyer S, Gong ZJ, Suwandhi W, van Pelt J, Soumillion A, Yap SH. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat* 1997;4:145-153
- 33 Fiume L, Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, Bonino F, Torrancia-Cerenzia M, Verme G, Rapicetta M, Bertini M, Gervasi GB. Liver targeting of antiviral nucleoside analogues through the asialoglycoprotein receptor. *J Viral Hepat* 1997;4:363-370

世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中. 综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分. 通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号.

(世界胃肠病学杂志 2002-12-18)

羧肽酶N调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究

张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林

张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 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

张忠东, 男, 34岁, 汉族, 主治医师, 西安交通大学第一医院传染科2000年级内科传染病学硕士学位研究生, 主要研究乙型肝炎病毒的基因表达调控。

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

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Cloning and characterization of a human hepatocyte protein, carboxypeptidase N, which binds and activates core promoter of hepatitis B virus

Zhong-Dong Zhang, Jun Cheng, Yan-Wei Zhong, Qian Yang, Ye-Dong Wang, Jing Dong, Yan-Jie Yang, Shu-Lin Zhang

Zhong-Dong Zhang, Jun Cheng, Yan-Wei Zhong, Qian Yang, Ye-Dong Wang, Jing Dong, Yan-Jie Yang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China

Shu-Lin Zhang, The First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shann'xi Province, China

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

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

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: Infection of hepatitis B virus (HBV) causes acute and chronic hepatitis and is closely associated with the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Molecular biological studies have considerably advanced our understanding of how the HBV genome operates, providing important new clues to the natural history of HBV-related diseases and, potentially, new therapeutical avenues. The HBV genome consists of 3.2 kb of circular DNA encoding four overlapping reading frames driven by promoter and enhancer elements. The HBV core promoter has been especially targeted for detailed molecular analysis, for its pivotal role in the hepatotropism and early life cycle of HBV. The core promoter can be divided into two elements: the basal core promoter (BCP) and the core upstream regulatory sequence (CURS). We previously had used phage display to screen the human liver cDNA library. A binding-protein of HBV core promoter, homologous with carboxypeptidase N (CPN), has been identified. Carboxypeptidase N is a plasma metalloprotease that cleaves basic amino acid residues from the C terminal of peptides and

proteins. The enzyme plays a central role in regulating the biologic activity of peptides such as kinases and anaphylatoxins. The aim of this study was to observe the effect of carboxypeptidase N on HBV core promoter expression, to construct recombinant plasmid for transfection into cell and to investigate the role of carboxypeptidase in replication and expression of HBV DNA.

METHODS: PCR was performed to amplify the gene of HBV core promoter from the plasmid pCP10 containing the whole fragment of HBV. The core promoter region was amplified using the following primers: sense, 5'-ACG CGT CCA AGG TCT TAC ATA AG-3', and antisense, 5'-GCT AGC ATG ATT AGG CAG AGG TG-3', (spanning the HBV nucleotides 1643 nt to 1849 nt). Subcloning and sequencing of PCR products were performed by using the TA cloning kits. After *Mlu*I and *Nhe*I digestion the sizes of the inserts were determined by agarose gel electrophoresis. The fragments were introduced into the restriction sites *Mlu*I and *Nhe*I of the multiple cloning sites of the pCAT basic (without any promoter) or promoter reporter. Equally, PCR was performed to amplify the gene of carboxypeptidase N, using the following primers: sense, 5'-GAA TTC ATG CTC GGG GAT CCG AAT TC-3', and antisense, 5'-GGA TCC TCA AGA CCC GTT TAG AGG CC-3'. After *Eco*R I and *Bam*H I digestion, the PCR fragments were cloned into the restriction sites *Eco*R I and *Bam*H I of the multiple cloning sites of the pcDNA3.1(-). Murine fibroblast cell NIH 3T3 were in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % fetal bovine serum under 5 % CO₂ at 37 °C. DNA transfection by the liposomes method was performed. For analysis, the cells were harvested 48 h after transfection. Transfection efficiency was routinely checked by cotransfecting 0.2 µg of pCAT as an internal standard.

RESULTS: HBV core promoter gene was successfully cloned into pCAT named pCAT-CP. Carboxypeptidase N gene was successfully cloned into pcDNA3.1 (-) named pcDNA3.1(-)-CPN. The recombined vectors were transferred into NIH 3T3 cell simultaneously to measure the expression of CAT. The results showed that the HBV core promoter of expression was upregulated 5-6 fold by the expression of carboxypeptidase N.

CONCLUSION: Our findings suggest that carboxypeptidase N could bind HBV core promoter *in vivo*, and upregulate the expression of HBV core promoter, which pave the way for further studying the regulatory mechanism of HBV DNA.

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Yang Q, Wang YD, Dong J, Yang YJ, Zhang SL. Cloning and characterization of a human hepatocyte protein, carboxypeptidase N, which binds and activates core promoter of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1131-1134

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢

性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生发展密切相关. 为深入研究 HBV 调节表达的机制, 我们应用噬菌体展示技术, 以 HBV 核心启动子 DNA 片段为固相支持物, 筛选肝细胞 cDNA 文库, 获得 HBV 核心启动子的肝细胞结合蛋白 - 羧肽酶 N(CPN). CPN 是一种从多肽和蛋白质 C 端氨基酸残基分离的血浆金属蛋白酶, 他在调节激肽和过敏毒素的生物活性上起关键作用. CPN 是分子量 280 kD 的四聚体, 包含两个 50 kD 酶性亚单位和两个 83 kD 调节亚单位. 核心启动子产生两个 3.5 kb RNA: 前 - 核心和前基因组 RNA. 前 - 核心 RNA 编码前 - 核心蛋白和 e 抗原, 前基因组 RNA 不仅作为 mRNA 编码核心蛋白和聚合酶蛋白, 而且与病毒蛋白一起包埋入核衣壳, 作为模板逆转录. 前基因组 RNA 的表达调控在病毒复制周期中起着关键作用. 核心启动子分为两部分: 基本核心启动子和核心上游调节元件(CURS), 其上游为负性调节元件(NER, 1616-1621 nt). CPD 在体内与 HBV 核心启动子结合的作用还不清楚, 我们分别构建 HBV 核心启动子及羧肽酶 N 的重组载体, 通过脂质体转染 NIH 3T3 细胞, 研究 CPN 对核心启动子的调节表达.

方法: 根据 HBV 核心启动子及羧肽酶 N 的序列设计引物, 在核心启动子的引物两端引入 Mlu I 和 Nhe I 的酶切位点, 在羧肽酶 N 的引物两端引入 EcoR I 和 BamH I 的酶切位点. 用聚合酶链反应(PCR)的方法分别扩增 HBV 核心启动子和羧肽酶 N 基因, 克隆到 pGEM-Teasy 载体上. 核心启动子经 Mlu I 和 Nhe I 双酶切回收连接到同样酶切的 pCAT 载体上, 羧肽酶 N 经 EcoR I 和 BamH I 双酶切回收连接到同样酶切的 pcDNA3.1(-)质粒上, 构建 HBV 核心启动子的报告载体及羧肽酶 N 的真核表达载体, 脂质体法瞬时转染 NIH 3T3 细胞.

结果: HBV 核心启动子和羧肽酶 N(CPN)的 PCR 产物经 1 % 琼脂糖电泳鉴定与预期大小符合, 分别为 206 bp 和 580 bp. 重组载体经双酶切鉴定后, 证明 HBV 核心启动子的报告载体及羧肽酶 N (CPN)的真核表达载体构建成功. 脂质体法瞬时转染 NIH 3T3 细胞 48 h 后, 用 ELISA 法检测 β -gal 的表达, 显示核心启动子在羧肽酶 N(CPN)的影响下, 其活性有大约 5-6 倍的增加. 通过体内实验证明羧肽酶 N(CPN)可以上调 HBV 核心启动子的表达.

结论: HBV 核心启动子结合蛋白羧肽酶 N (CPN)与 HBV 核心启动子共转染细胞, 明显调节 HBV 核心启动子的表达, 为进一步研究 HBV 复制的分子生物学机制提供了新的理论基础.

张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨俊杰, 张树林. 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8): 1131-1134

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1131.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒

性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生发展密切相关^[1,2]. 但是, 目前除了部分慢性乙型肝炎患者对干扰素 α (IFN α), 或部分患者对于核苷类似物拉米夫定的治疗有部分应答之外, 还缺乏确切有效的治疗方法^[3,4]. 其原因是对 HBV DNA 复制的分子生物学机制还不十分清楚.

我们利用噬菌体展示技术, 以 DNA 为固相支持分子, 筛选肝细胞 cDNA 文库, 获得了和 HBV 核心启动子结合的肝细胞蛋白 - 羧肽酶 N (CPN), 在国内外首次进行了以噬菌体展示技术筛选启动子的结合蛋白的研究. 为深入研究其和 HBV 核心启动子结合的机制及功能, 我们分别构建报告载体和表达载体, 进行共转染细胞, 阐明二者相互作用的意义, 为进一步研究 HBV 复制的分子生物学机制提供了新的理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pGEM-Teasy 和 pcDNA3.1(-)(Promega 公司), Taq 酶、琼脂糖、dNTP、T4 DNA 连接酶、RNA 酶、玻璃奶 DNA 回收试剂盒(博大科技), EcoR I、BamH I、Mlu I、Nhe I (购置宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联黏附读数仪、大肠杆菌 DH5 α 、pCP10 质粒为本实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 HBV 核心启动子的扩增和克隆 根据 HBV ayw 的基因序列, 用 Vector NT I 软件设计引物, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡核苷酸引物, P1: 5' -ACG CGT CCA AGG TCT TAC ATA AG-3', P2: 5' -GCT AGC ATG ATT AGG CAG AGG TG-3', 在引物 5' 端分别引入 Mlu I 和 Nhe I 位点, 由赛百盛公司合成.

1.2.2 羧肽酶的扩增和克隆 根据羧肽酶 N cDNA 序列, 包含从 ATG 至 TAA 为止的全编码区, 用 Vector NT I 软件设计引物. 引物由上海博亚公司合成. P1: 5' -GAA TTC ATG CTC GGG GAT CCG AAT TC-3' 在 5' -端引入 EcoR I 酶切位点, P2: 5' -GGA TCC TCA AGA CCC GTT TAG AGG CC-3' 在 5' -端引入 BamH I 酶切位点.

1.2.3 重组报告载体 pCAT-CP 的构建与鉴定 将 HBV 核心启动子 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16 $^{\circ}$ C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 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. 此质粒及 pCAT Basic 均用 Mlu I 和 Nhe I 双酶切, 回收相应的酶切片段, 在 16 $^{\circ}$ C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落, 碱裂解法提取质粒, 进行 Mlu I 和 Nhe I 双酶切鉴定.

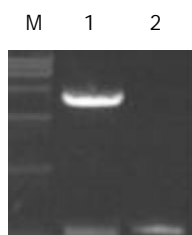
1.2.4 重组表达载体 pcDNA3.1(-)-CPN 的构建与鉴定 将噬斑的 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16 $^{\circ}$ C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用

氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 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. 此质粒及载体 pcDNA3.1(-)均用 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 回收相应的酶切片段, 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落, 碱裂解法提取质粒, 进行 EcoR I 和 BamH I 双酶切鉴定.

1.2.5 转染细胞 分别用磁珠法提取质粒, 将 pCAT basic、pCAT+pcDNA3.1(-)、pCAT-CP 和 pCAT-CP+ pcDNA3.1(-)-CPN 通过脂质体瞬时共转染 NIH 3T3 细胞, 用 ELISA 法检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达, 研究 pcDNA3.1(-)-CPN 对 pCAT-CP 的功能影响.

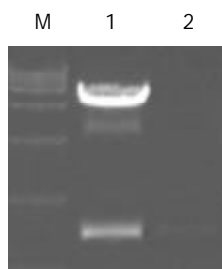
2 结果

2.1 pCAT-CP 重组质粒的酶切鉴定 利用自行设计的引物 P1/P2 成功扩增出 HBV 核心启动子基因片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段约为 206 bp, 与预期大小符合, 且无非特异扩增现象. 用双酶切所得片段, 连接到用相同的 Mlu I 和 Nhe I 所切的 pCAT 中经酶切鉴定结果正确. 表明 pCAT-CP 质粒构建成功(图1).



Lane M: 15 000 DNA Ladder; Lane 1: pCAT-CP Mlu I /Nhe I cut; Lane 2: HBV core promoter PCR
图1 pCAT-CP 重组质粒的酶切鉴定.

2.2 pcDNA3.1(-)-CPN 重组质粒的酶切鉴定 利用自行设计的引物 P3/P4 成功扩增出羧肽酶N基因片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段约为 580 bp, 与预期大小符合, 且无非特异扩增现象. 用双酶切所得片段, 连接到用相同的 EcoR I 和 BamH I 所切的 pcDNA3.1(-)中经酶切鉴定结果正确. 表明 pcDNA3.1(-)-Carb 质粒构建成功(图2).



Lane M: 15 000 DNA ladder; Lane 1: pcDNA3.1(-)-CPN EcoR I / BamH I cut; Lane 2: CPN PCR
图2 pcDNA3.1(-)-CPN 重组质粒的酶切鉴定.

2.3 pcDNA3.1(-)-CPN 对 pCAT-CP 的激活作用 用脂质体法转染 NIH 3T3 细胞, 脂质体用量 6 μl . 培养 48 h 后, 进行 ELISA 检测. 氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达见表1, pCAT-CP 实验组酶的表达是 pCAT 的 3 倍, 而 pcDNA3.1(-)-CPN+pCAT-CP 实验 CAT 的表达是 pCAT-CP 的近 6 倍, 证明 CPN 对 HBV 核心启动子有激活作用.

表1 重组载体共转染 NIH 3T3 细胞氯霉素乙酰转移酶检测结果

质粒	CAT 值
pCAT	0.007
pCAT-CP+pcDNA3.1(-)	0.094
pCAT-CP	0.023
pCAT-CP+pcDNA3.1(-)-CPN	0.130

3 讨论

肝炎病毒感染所引起的一系列肝脏疾病, 发病机制非常复杂, 涉及到肝炎病毒与肝细胞大分子之间的复杂的相互作用^[1-3]. 乙型肝炎病毒是一种严重危害人类健康的致病因子. HBV 的感染除引起慢性乙型肝炎和肝硬化外, 还与肝癌的发生有密切关系^[4-7]. HBV 属嗜肝 DNA 病毒, 其基因组为 3.2 kb 部分双链的环状 DNA. 他的复制需要一个 RNA 中间物 - 前基因组 RNA, 经过反转录产生新的 DNA 分子^[8-10]. HBV 基因组的功能单位十分密集, 高度压缩, 重复利用. 目前已确定有四个主要的开放阅读框架, 分别负责编码核心抗原(pre-C/C)、核酸聚合酶(P)、表面抗原(pre-S/S)和 X 蛋白(X). 这些基因的表达受到顺式元件 - 启动子和增强子的调控^[11-13]. 目前在 HBV 基因组已发现并鉴定的顺式元件有四个启动子(C、X、SP I、SP II)、两个增强子(Enh I 和 Enh II)和糖皮质激素应答元件. 由于病毒的复制是病毒致病机制的重要环节, 病毒基因的表达与调控又是病毒复制研究的核心问题. 另外, 虽然 HBV 感染具有相对泛嗜性的特点, 但是却主要在肝细胞中进行复制, 引起肝脏的病变, 因而推测肝细胞中存在肝细胞特有的蛋白质因子与 DNA 结合, 控制 HBV DNA 复制表达. 因此通过研究与 HBV 基因的表达调控结合的肝细胞特异性蛋白质因子, 对于了解 HBV 的致病机制、HBV 与肝癌的关系以及对乙型肝炎和肝癌的预防和治疗均有重要意义.

核心启动子产生两个 3.5 kb RNA: 前 - 核心和前基因组 RNA. 前 - 核心 RNA 编码前核心蛋白和 e 抗原, 前基因组 RNA 不仅作为 mRNA 编码核心和聚合酶蛋白, 而且与病毒蛋白一起包埋入核衣壳, 作为模板逆转录. 前基因组 RNA 的表达调控在病毒复制周期中起着关键作用. 核心启动子分为两部分: 基本核心启动子和核心上游调节元件(CURS), 其上游为负性调节元件(NER, 1 616-1 621 nt), CURS 能激活邻近下游的 BCP.

真核细胞的基因表达调节虽然发生在多个水平上, 但是主要的还是转录水平和转录后水平上进行调节. 基因表达的调节又分为顺式(cis)调节和反式(trans)调节. 与转录活性有关的启动子结合的转录因子蛋白的结合与

调节尤其重要^[14]. Wolcke et al^[15]应用噬菌体表面展示技术对 DNA 甲基转移酶 M. TaqI 识别的 DNA 序列的结合蛋白进行了筛选. Cicchini et al^[16]以高度分化的以高度分化的 MMH E14 小鼠肝细胞癌细胞细作为来源构建了噬菌体 cDNA 表面展示文库, 研究 DNA- 蛋白之间的相互作用. 以肝脏中富有的转录因子蛋白肝细胞核因子 1 α (HNF1 α) 基因启动子 DNA 作为固相基质进行筛选, 以确定与之结合的蛋白序列.

在国内外我们首次利用噬菌体展示技术^[17-28], 以 DNA 为固相分子, 筛选肝细胞文库, 研究启动子结合蛋白. 获得了与 HBV 核心启动子结合的蛋白, 经同源性比较确定该蛋白与羧肽酶 N(CPN)高度同源, 同源性为 99%. CPN 是由两个 50 kD 小亚单位和两个 83 kD 大亚单位组成的锌指样金属蛋白酶^[29], 小亚单位包含蛋白酶的酶活性, 而糖基化的亚单位保护酶避免降解及从血流中滤过, 亚单位通过非共价键形成四聚体. CPN 由肝脏产生, 进入血流的激肽^[30]、血管舒张素^[30]、血小板因子^[31]这些有生物活性的多肽, 能被 CPN 分离其羧基末端的精氨酸和赖氨酸残基, 也可分离补体 C3a 和 C5a 羧基末端的精氨酸^[30]. 补体级联反应产生的 C3a 和 C5a 能诱导平滑肌舒张、血管舒张和白细胞趋化, 以及肥大细胞释放组胺, CPN 极大地减少 C3a 和 C5a 的生物学活性. CPN 基因 5' - 端的结构分析显示有与肝特异表达相关的转录因子结合位点, 对应三种不同蛋白的 9 个转录因子结合位点位于转录起始位点上游 916 bp. 这三种蛋白分别是肝细胞核因子 5 (HNF-5)、AP-2 和 CCAAT/ 增强子结合蛋白 (C/EBP). HNF-5 是肝特异转录因子, 在 5' - 端有 7 个识别位点. AP-2 在非肝组织表达, 作为抑制子. C/EBP 存在于肝和脂肪组织. 这些研究表明 CPN 局限于肝脏^[2], 而 Sato et al^[31]认为不仅在肝脏, 而且胃、肺、肠、脾、肾也有表达. 而我们的结果与此不完全一致, 为阐明二者结合的意义, 我们分别成功构建了 HBV 核心启动子的报告载体和羧肽酶的表达载体, 将二者共转染 NIH 3T3 细胞, 证明在体内羧肽酶 N 可以明显调节 HBV 核心启动子的表达. 此项实验结果为研究影响 HBV 复制机制开辟了新的思路和途径. 我们准备进一步研究二者在体外的结合特性.

4 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病的机制分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 3 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745
- 4 Yuh CH, Chang YL, Ting LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol* 1992;66:4073-4084
- 5 Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;21:1129-1133
- 6 Wright TL, Lau JY. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *Lancet* 1993;342:1340-1344

- 7 Ganem D. Oncogenic viruses. Of marmots and men. *Nature* 1990;347:230-232
- 8 Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 1987;56:651-693
- 9 Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980;21:801-809
- 10 Robinson WS, Miller RH, Marion PL. Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication. *Hepatology* 1987;7:645-735
- 11 Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol* 1993;1:221-228
- 12 Kaneko S, Miller RH. X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver. *J Virol* 1988;62:3979-3984
- 13 Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2513-2517
- 14 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
- 15 Wolcke J, Weinhold E. A DNA-binding peptide from a phage display library. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:1239-1242
- 16 Cicchini C, Ansuini H, Amicone L, Alonzi T, Nicosia A, Cortese R, Tripodi M, Luzzago A. Searching for DNA-protein interactions by Lambda phage display. *J Mol Biol* 2002;322:697-706
- 17 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315-1317
- 18 Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-318
- 19 McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552-554
- 20 董菁, 施双双, 王业东, 钟彦伟, 王刚, 王琳. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-323
- 21 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130-133
- 22 钟彦伟, 成军, 施双双, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2001;9:217-219
- 23 成军, 钟彦伟, 施双双, 夏小兵, 王刚, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白人源单链可变区抗体的可溶性表达. 中国病毒学 2001;16:220-223
- 24 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 中国公共卫生 2002;18:153-154
- 25 Levin Y, Skidgel RA, Erdos EG. Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I). *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4618-4622
- 26 Belew M, Gerdin B, Lindeberg G, Porath J, Saldeen T, Wallin R. Structure-activity relationships of vasoactive peptides derived from fibrin or fibrinogen degraded by plasmin. *Biochim Biophys Acta* 1980;621:169-178
- 27 Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest* 1970;49:2427-2436
- 28 Grange T, Roux J, Rigaud G, Pictet R. Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic Acids Res* 1991;19:131-139
- 29 Li L, Liao WS. An upstream repressor element that contributes to hepatocyte-specific expression of the rat serum amyloid A1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:395-403
- 30 Ren Y, Reddy SA, Liao WS. Purification and identification of a tissue-specific repressor involved in serum amyloid A1 gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:37154-37160
- 31 Sato T, Miwa T, Akatsu H, Matsukawa N, Obata K, Okada N, Campbell W, Okada H. Pro-carboxypeptidase R is an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not. *J Immunol* 2000;165:1053-1058

丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系

张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽

张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽, 中国医科大学第二临床学院传染科 辽宁省沈阳市 110003

张琳, 女, 1967-06-12 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 1990 年大连医学院本科毕业, 1997 年中国医科大学硕士研究生毕业, 讲师. 主要从事病毒性肝炎治疗方面的研究.

项目负责人: 张琳, 110003, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第二临床学院传染科. liaiminzh@163.com

电话: 024-83956981

收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-26

Mutations in nonstructural 5A gene of hepatitis C virus and its response to interferon alfa

Lin Zhang, Gui-Zhen Zhao, Li-Lan Shi, Li Cao

Lin Zhang, Gui-Zhen Zhao, Li-Lan Shi, Li Cao, Department of Infectious Disease, The Second Clinical College, China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Lin Zhang, Department of Infectious Disease, The Second Clinical College, China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110003, Liaoning Province, China. liaiminzh@163.com

Received: 2002-11-29 Accepted: 2002-12-26

Abstract

AIM: To investigate the relationship between NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ sequences and response to interferon therapy, and whether there is an IFN sensitivity determining region(ISDR) in the region of NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈.

METHODS: We analyzed 11 patients with chronic HCV 1b infection who had received interferon alfa therapy for six months. Pretreatment serum samples were analyzed. The amino acid sequence of NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ was determined by direct sequencing of the HCV genome amplified by the polymerase chain reaction.

RESULTS: Among the 11 patients, only 1 was intermediate type, all the others were wild type. 2 of wild type patients showed complete response. Others were nonresponders. There was no significant difference in nucleotide and amino acid sequences between the two groups. The nucleotide and amino acid sequences changed after IFN treatment in one nonresponder.

CONCLUSION: The NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ region was highly conservative. In Chinese patients with chronic HCV 1b infection, there was no correlation between response to interferon and mutations in the NS5A gene. HCV quasispecies changed after IFN therapy.

Zhang L, Zhao GZ, Shi LL, Cao L. Mutations in nonstructural 5A gene of hepatitis C virus and its response to interferon alfa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1135-1138

摘要

目的: 探讨HCV1b型慢性丙型肝炎患者HCV NS5A基因变异与干扰素(IFN)疗效的关系, NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈片断是否存在干扰素敏感决定区(ISDR).

方法: 留取慢性丙型肝炎患者干扰素治疗前血清, 应用 RT-PCR 法扩增 NS5A 基因片段, 用直接测序法进行核苷酸及氨基酸序列测定.

结果: 11 例 HCV1b 型患者中 1 例为中间型, 其余为野生型. 2 例表现为完全应答, 均为野生型, 9 例为无应答. 两组之间核苷酸及氨基酸序列无显著差异. 对 1 例患者的动态观察发现, 干扰素治疗后其核苷酸及氨基酸序列均有所变化, 改变了其在基因树中的位置.

结论: HCV1b 型 NS5A 基因变异与干扰素疗效无关, NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ 区高度保守. 未证实存在 ISDR. 干扰素治疗可引起 HCV 准种改变.

张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽. 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1135-1138

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1135.asp>

0 引言

由于 HCV 基因组具有高度变异性^[1-4], 使其感染后极易慢性化^[5-8]. 目前丙型肝炎患者临床尚无切实有效的治疗方法, 干扰素仍是唯一可以抑制病毒复制、改善患者生化和组织学指标的药物治疗^[9,10]. 但干扰素治疗应答率低、副作用大、费用昂贵, 因此在治疗前进行疗效预测, 成为近年研究的热点. 在影响干扰素疗效的众多因素中, 基因型 1b 型 HCV 感染被认为是导致干扰素疗效低下的主要因素^[11-14]. 我国大部分患者为此种基因型^[15,16]. 但即使均为 1b 型感染者, 对干扰素治疗的结果可截然不同. 日本学者 Enomoto et al 发现, 1b 型患者 HCV NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ 区氨基酸序列与干扰素疗效密切相关, 与 HCV-J 相比, 突变型(氨基酸变异 ≥ 4 个)对干扰素敏感, 中间型(氨基酸变异 1-3 个)和野生型不敏感, 因而把 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ 区称作干扰素敏感决定区^[17-20]. 但在欧美一些国家的研究中, 却未证实 ISDR 的存在^[21-25]. 我们对沈阳地区 11 例应用干扰素治疗的 1b 型慢性丙型肝炎患者进行了 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ 区核苷酸及氨基酸序列测定, 以进一步探讨 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ 基因变异与干扰素疗效的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 应用干扰素治疗的慢性丙型肝炎患者共12例,男8例,女3例;年龄23-45岁.治疗方案:IFN- α 3 MU, 3次/wk,共24 wk.疗效判定:应答组 治疗结束时,ALT正常,HCV RNA阴转,并持续至6 mo以上.否则为无应答组.

1.2 方法 HCV RNA提取采用异硫氰酸胍-酚-氯仿提取法.血清50 μ L,分别加入异硫氰酸胍200 μ L,氯仿/异戊醇50 μ L,振荡混匀,13 000 r/min离心,10 min,取水相100 μ L,加等量异丙醇,混匀,13 000 r/min离心,10 min,弃上清,控干残留液体,加750 mL/L乙醇200 μ L洗涤,13 000 r/min离心,5 min,弃上清,真空抽干,65 $^{\circ}$ C 20 min备用. NS5A基因片段扩增采用巢式逆转录聚合酶链反应法.引物序列:外引物1:5'-TTGGCCAGCTCTTCAGCTAGC-3'(核苷酸位置6921-6936);外引物2:5'-CCAGGACTCTAGCAGTGGAC-3'(核苷酸位置7 211-7 232);内引物1:5'-TCAGCTAGCCAATTGTCTGC-3'(核苷酸位置6 933-6 952);内引物2:5'-CAGTGGAGGGTTGTAGTCTG-3'(核苷酸位置7 200-7 220).逆转录及第一轮PCR扩增,10 \times buffer 3 μ L, dNTP 3 μ L, MgCl₂ 1.56 μ L, Taq酶2 U, AMV3U, Rnasin20U, 外引物120 pmol (1 μ L), 外引物220 pmol (1 μ L), 水19 μ L, 总反应体积30 μ L. 37 $^{\circ}$ C 30 min 逆转录之后进入PCR扩增,反应条件为94 $^{\circ}$ C 30 s 预变性,94 $^{\circ}$ C 45 s, 50 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共35个循环,终延伸300 s. 第二轮PCR扩增:取第一轮扩增产物5 μ L, 10 \times buffer 3 μ L, dNTP 3 μ L, MgCl₂ 1.56 μ L, Taq酶2U, 内引物120 pmol (1 μ L), 内引物220 pmol (1 μ L), 水15 μ L, 总反应体积30 μ L. 反应条件与第一轮相同.取第二轮PCR产物5 μ L进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳,片段大小在573 bp左右为阳性结果. NS5A区核苷酸及氨基酸序列测定 采用直接测序法.由上海联合基因公司完成.结果应用Biledit软件进行分析. HCV基因分型 采用直接测序法.依据NS5A区核苷酸序列进行分型.

2 结果

2.1 HCV 基因分型 在12例慢性丙型肝炎患者中,11例为HCV1b型,1例为HCV1c型,其中5-1, 5-2, 5-3分别为5号患者治疗前、治疗后3mo, 6mo HCV在基因树中的位置(图1).

2.2 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈区核苷酸序列分析 11例1b型患者中3、4号患者为应答者,余为无应答者,两组之间核苷酸变异数无显著差异($t=0.86$, $P>0.05$).与HCV-J相比,变异数未超过10%,且多为同义突变,表明NS5A区高度保守(表1).

2.3 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈区氨基酸序列变异与干扰素疗效的关系 按照Enomoto的分型方法,11例1b型患者1例为中间型,余均为野生型,未见突变型. NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈区氨基

酸序列变异与干扰素疗效无关(图2).

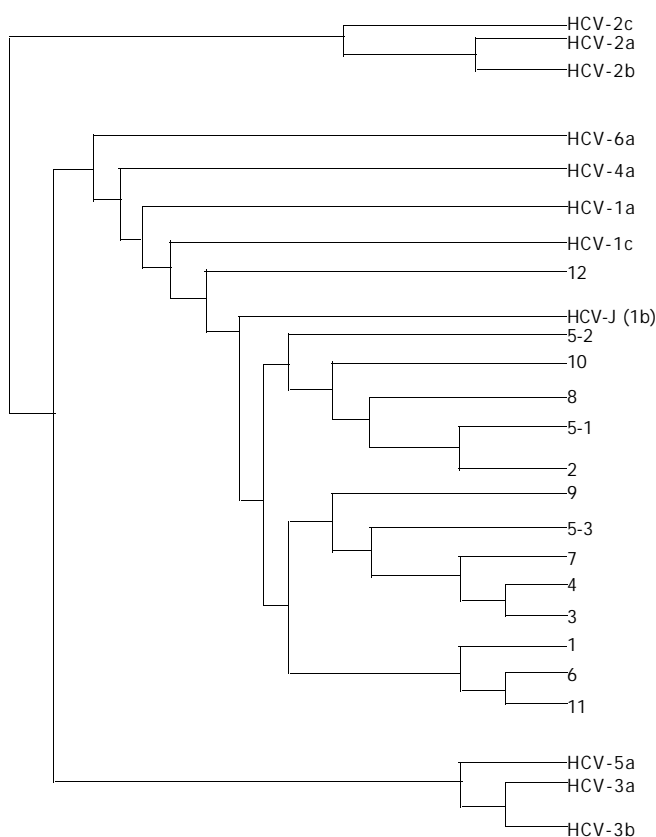


图1 12例患者的基因分型.

表1 患者NS5A核苷酸序列与HCV-J的比较

编号	核苷酸变异数	核苷酸变异率(%)
1	9	5.2
2	10	5.8
3	10	5.8
4	9	5.2
5	13	7.6
6	8	4.7
7	8	4.7
8	15	8.8
9	11	6.4
10	9	5.2
11	9	5.2

	2209	2248	完全应答
HCV-J	PSLKATCTTHVSPDADLIEANLLWRQEMGGNITRVESEN		
1	-----		NO
2	-----		NO
3	-----		YES
4	-----		YES
5	-----		NO
6	-----		NO
7	-----A-----		NO
8	-----		NO
9	-----		NO
10	-----		NO
11	-----		NO

图2 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈区氨基酸序列变异与干扰素疗效关系.

2.4 干扰素治疗对 NS5A 基因变异的影响 对 5 号患者的动态观察发现, 干扰素治疗后 NS5A 基因发生了变异, 导致其在基因树中位置改变(图 1 中 5-1, 5-2, 5-3), 即引起了其准种的改变, 并未导致基因型的变化. 核苷酸变异大多为同义突变. 氨基酸变异情况见图 3.

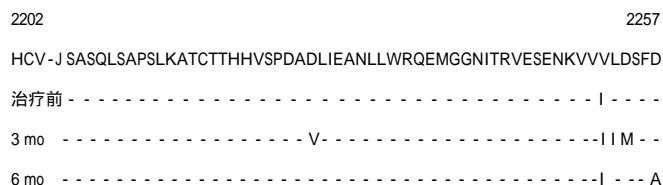


图 3 干扰素治疗前后 NS5A 氨基酸序列变化.

3 讨论

慢性丙型肝炎患者对干扰素治疗的持续应答率(ALT 正常 HCV RNA 阴转持续至治疗结束至少 6 mo 以上)较低, 仅 10-20%^[26-28], 而 1b 型则更低. 如何在治疗前对疗效进行有效的预测, 具有重要的临床意义. 近年在对 1b 型 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ 位氨基酸变异是否与干扰素疗效有关的问题上研究结果不尽一致, 日本学者认为 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ 位氨基酸序列可以对干扰素治疗进行疗效预测, 此区域被其称作干扰素敏感决定区(ISDR), 但欧美一些国家的研究却得到相反的结论. 我们的研究发现: 11 例 1b 型患者按 Enomoto 的分型 10 例为野生型, 1 例为中间型, 未见突变型. 2 例应答者和 9 例无应答者之间核苷酸及氨基酸序列无显著差异, 说明 NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ 位氨基酸变异与干扰素疗效之间无确切关系; 11 例患者核苷酸与氨基酸序列同 HCV-J^[29]相比, 变异较少, 且多为同义突变, 表明 NS5A 区高度保守, 从另一方面说明以 NS5A 基因变异来判定与干扰素疗效的关系, 意义不大. Chayama et al^[30]也发现: NS5A 区很少出现氨基酸替换, 不能对干扰素治疗结果进行预测. 我们的结果与我国学者段学章、唐振亚 et al 的研究结果相一致^[31,32]. 因而, 干扰素敏感决定区可能不适用于中国患者. 应选择其他方法对 1b 型患者进行干扰素疗效预测.

我们对其中 1 例无应答者进行了核苷酸及氨基酸序列的动态观察, 发现干扰素治疗后, NS5A 区核苷酸及氨基酸序列均发生了变化, 治疗 6 mo 时病毒在基因树中的位置发生了较明显的改变, 说明干扰素治疗对病毒序列有选择作用, 产生了新的优势株, 即引起了其准种的改变. 这也从一个方面说明了 1b 型 HCV 抵抗 IFN 的机制.

由于本研究病例数较少, 且无突变型患者, 因此不能从另一方面证实突变型对干扰素治疗是否有效. 而 Enomoto 的报道中, 则有较多的突变型患者, 可能与 1b 型 HCV 感染具有地区性特点有关. 导致两种不同研究结果的原因有待进一步研究明确.

4 参考文献

1 Chen S, Wang YM. Genetic evolution of structural region of

- hepatitis C virus in primary infection. *World J Gastroenterol* 2002;8:686-693
- 2 Zhu LX, Liu J, Li YC, Kong YY, Staib C, Sutter G, Wang Y, Li GD. Full-length core sequence dependent complex-type glycosylation of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *World J Gastroenterol* 2002; 8:499-504
- 3 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significances. *World J Gastroenterol* 1999; 5:547-549
- 4 Mullan B, Kenny-Walsh E, Collins JK, Shanahan F, Fanning LJ. Inferred hepatitis C virus quasispecies diversity is influenced by choice of DNA polymerase in reverse transcriptase-polymerase chain reactions. *Anal Biochem* 2001;289:137-146
- 5 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
- 6 Ambrosch A, Konig W. Characteristics of the hepatitis C virus and viral predictors of therapeutic response. *Med Klin* 1999;94:626-632
- 7 Meier V, Mihm S, Braun Wietzke P, Ramadori G. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? *World J Gastroenterol* 2001;7:228-234
- 8 Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL, Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6:805-811
- 9 Gong GZ, Lai LY, Jiang YF, He Y, Su XS. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy. *World J Gastroenterol* 2003;9:291-294
- 10 Polyak SJ, Gerotto M. The molecular basis for responsiveness to anti-viral therapy in hepatitis C. *Forum* 2000;10:46-58
- 11 Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. *Princess Takamatsu Symp* 1995;25:75-91
- 12 Hino K, Yamaguchi Y, Fujiwara D, Katoh Y, Korenaga M, Okazaki M, Okuda M, Okita K. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study. *J Viral Hepat* 2000;7:36-42
- 13 Gitnick G. Hepatitis C: controversies, strategies and challenges. *Eur J Surg Suppl* 1998;582:65-70
- 14 Hu KQ, Vierling JM, Redeker AG. Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001;8:1-18
- 15 Wang Y, Okamoto H, Tsuda F, Nagayama R, Tao QM, Mishiho S. Prevalence, genotypes, and an isolate(HC-C2) of hepatitis C virus in Chinese patients with liver disease. *J Med Virol* 1993;40:254-260
- 16 唐小平, 吴婉芬, 袁小珍. 丙型肝炎病毒基因分型及其与疾病程度、感染途径和干扰素疗效的关系. *中华微生物学和免疫学杂志* 1997;2:92-95
- 17 Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995;96: 224-230
- 18 Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77-81
- 19 Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997;25:745-749
- 20 Murashima S, Ide T, Miyajima I, Kumashiro R, Ueno T, Sakisaka S, Sata M. Mutations in the NS5A gene predict response to interferon therapy in Japanese patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Scand J Infect Dis* 1999;31:27-32
- 21 Zeuzem S, Lee JH, Roth WK. Mutations in the nonstructural protein 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 1997;25:740-744

- 22 Odeberg J, Yun Z, Sonnerborg A, Weiland O, Lundeberg J. Variation in the hepatitis C virus NS5a region in relation to hypervariable region 1 heterogeneity during interferon treatment. *J Med Virol* 1998;56:33-38
- 23 Khorsi H, Csatalein S, Wyseur A, Izopet J, Canva V, Rombout A, Capron D, Capron JP, Lunel F, Stuyver L, Duverlie G. Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A2209-2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon- α therapy in French patients. *J Hepatol* 1997;27:72-77
- 24 Gerotto M, Dal Pero F, Pontisso P, Noventa F, Gatta A, Alberti A. Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon. *Gastroenterology* 2000; 119:1649-1655
- 25 Noursbaum J, Polyak SJ, Ray SC, Sullivan DG, Larson AM, Carithers RL, Gretch DR. Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J Virol* 2000;74:9028-9038
- 26 Noursbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Br  chet C. Hepatitis C virus type 1b(II) infection in France and Italy. *Ann Inter Med* 1995;122:161-168
- 27 Booth JC, Foster GR, Kumar U, Galassini R, Goldin RD, Brown JL, Thomas HC. Chronic hepatitis C virus infection: predictive value of genotype and level of viraemia on disease progression and response to interferon α . *Gut* 1995;36:427-432
- 28 Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994;344:1475-147
- 29 Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9524-9528
- 30 Chayama K, Suzuki F, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Takahashi N, Kinoshita M, Kumada H. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 2000;32:1138-1144
- 31 段学章, 朱传琳, 程云, 赵军, 李伯安, 季伟. 丙型肝炎病毒 1b 型 NS5A 区基因结构变异与 α 干扰素治疗效果的研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 1999;4:368-370
- 32 唐振亚, Kock J, Moradpour D, 杨东亮, 郝连杰, Blum HE. 慢性丙型肝炎患者干扰素敏感决定区突变的意义. *中华肝脏病杂志* 1999;1:57

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

• 封面故事 •

溃疡性结肠炎的基础和临床研究

1 项目负责人

江学良, 男, 1967-08-26 生, 山东省安丘市人, 汉族, 医学博士, 科技部科技期刊评审专家, 中英国际炎症性肠病研究中心及济南军区总医院消化内镜中心负责人, 济南军区优秀青年科技干部, 世界消化大会和世界华人消化大会共同秘书长, 《Inflammatory Bowel Disease》、《世界华人消化杂志》、《中华腹部疾病杂志》等 8 家杂志常务编委和编委. 编著《溃疡性结肠炎的现代诊疗与进展》等专著 2 部. 在《World Journal of Gastroenterology》等杂志发表论文 50 篇, 5 篇被美国 SCI 收录. 主要研究方向为溃疡性结肠炎, 获军队及省部级科技成果奖 6 项. 应邀在世界消化大会、世界华人消化大会等作《中国溃疡性结肠炎研究》的大会报告. 在国内建立了溃疡性结肠炎研究协作中心, 并与英国牛津大学合作成立了中英国际炎症性肠病中心.

2 项目来源

中英国际合作课题(CU200201).

山东省卫生厅课题(No.2001CA2EFB2).

济南军区重点课题(9802).

3 课题介绍

采用复合法建立了大鼠溃疡性结肠炎模型; 建立了在体大鼠结肠压力的检测方法; 研究了溃疡性结肠炎患者分子免疫学发病机制, 特别对血小板活化、黏附分子表达、细胞凋亡及多药抗性变化作了深入探讨; 分析了中国溃疡性结肠炎发病特点, 提出了在分型基础上, 进行个体化规范化治疗的建议, 即根据不同类型的溃疡性结肠炎采取不同的治疗策略和方案. 对初发型患者经治疗达到临床完全缓解后, 可停药观察, 暂不维持治疗; 对慢性反复发作型患者则强调维持治疗的重要性; 对伴血小板活化及高凝状态的慢性持续型患者, 须进行抗凝治疗而不要因患者有便血症状应用传统的促凝药物止血; 对伴有多药抗性表达的激素抵抗型重度溃疡性结肠炎则适宜尽早手术等新观点.

4 发表论文

该课题已经在《Inflammatory Bowel Disease》、《World Journal of Gastroenterology》、《世界华人消化杂志》、《消化病诊断和治疗》、《中华微生物和免疫学杂志》、《中华消化内镜》、《中医杂志》等发表论文 40 篇, 其中 5 篇被 SCI 收录.

5 获奖情况

该课题已经获得中国人民解放军科技进步奖 2 项.

6 学术著作

由江学良编著的《溃疡性结肠炎现代诊疗与进展》一书年内正式出版. 这是国内第一部专门论述溃疡性结肠炎的专著, 具有全面、实用、新颖的特点. 全书分为序篇、诊疗篇、药物篇、基础篇、中医篇、患者篇 6 部分, 其中诊疗篇为本书的重点, 详细介绍了国内外主要诊疗标准及其优缺点, 中国溃疡性结肠炎的发病特点, 各型溃疡性结肠炎的治疗建议与讨论. 国际炎症性肠病研究泰斗, 美国芝加哥大学 94 岁高龄的 J.B.Kirsner 教授担任本书顾问, 并在阅读书稿后写信评价: “您在溃疡性结肠炎方面的经验对美国来说也是非常宝贵的”.

7 国内合作

成立了溃疡性结肠炎研究协作中心.

8 国际合作

与英国牛津大学合作成立了中英国际炎症性肠病中心.

9 封面图片

图 1 江学良博士; 图 2 溃疡性结肠炎活动期肠镜图像; 图 3 溃疡性结肠炎伴假息肉形成.

10 通讯地址

江学良 250031, 山东省济南市师范路 25 号, 济南军区总医院消化科. chfjxl@jn-public.sd.cninfo.net

电话: 05318381896

汉族人 IL - 12b 和 IL - 10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性

李永纲, 刘明旭, 王福生, 金 磊, 洪卫国

李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国, 中国人民解放军解放军第 302 医院传染病研究所生物工程室 北京市 100039
李永纲, 男, 1964-11-24 生, 天津市人, 汉族. 1989 年第四军医大学毕业, 2002 年军事医学科学院硕士研究生毕业, 主治医师, 主要从事传染病的临床及研究工作.
北京市自然科学基金重点资助课题, No.7011005
项目负责人: 王福生, 100039, 北京市, 中国人民解放军解放军第 302 医院传染病研究所生物工程室. fswang @public.bta.net.cn
电话: 010-66933332 传真: 01063831870
收稿日期: 2002-06-20 接受日期: 2002-07-05

Genetic polymorphisms in IL-10 and IL-12b allele promoter regions in Chinese patients of Han nationality with HBV infection

Yong-Gang Li, Ming-Xu Liu, Fu-Sheng Wang, Lei Jin, Wei-Guo Hong

Yong-Gang Li, Ming-Xu Liu, Fu-Sheng Wang, Lei Jin, Wei-Guo Hong, Division of Bioengineering, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039 China
Supported by the Natural Science Foundation of Beijing, No.7011005
Correspondence to: Dr. Fu-Sheng Wang, Division of Bioengineering, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. fswang @public.bta.net.cn
Received: 2002-06-20 Accepted: 2002-07-05

Abstract

AIM: To investigate the association of genetic susceptibility to hepatitis B virus infection and disease progression with the allelic polymorphisms of IL-10 and IL-12b promoter regions in Chinese Han population.

METHODS: Two groups of indigenous Chinese subjects (314 subjects in total) were recruited in this study. Group 1 included 104 unrelated patients with chronic hepatitis B virus infection and 76 unrelated healthy donors. Group 2 contained 134 related subjects from seven HBV-infected pedigrees of Han ethnic origin. Total genomic DNA samples were purified from the 1.5 ml of peripheral blood of all participated individuals by using the QIAgen purification DNA kit. Genotyping of IL10-5' A and IL12-5' C alleles was performed by means of PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) and further proved by direct DNA sequencing. All data were statistically analyzed by using SAS software.

RESULTS: IL10-5' A mutant frequency in unrelated healthy subjects was 41.9 % compared with 42.1 % in unrelated HBV-infected patients, while IL12-5' C mutant frequency was 64.6 % and 55.8 % among healthy individuals and HBV-infected patients, respectively. No significant difference was found among the unrelated healthy individuals and unrelated HBV-infected patients. In related individuals from

the seven HBV-infected pedigrees, the mutant frequency of IL12-5' C allele was found to be identical to that in unrelated healthy and HBV-infected patients, but the mutant frequency of IL10-5' A allele (19.5 %) was significantly different from that (42.0 %) in unrelated group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The polymorphisms of IL10-5' A and IL12-5' C allele promoter regions were not correlated with hepatitis B virus infection and disease progression among unrelated subjects, but there was a significantly lower mutant frequency of IL10-5' A allele among related subjects.

Li YG, Liu MX, Wang FS, Jin L, Hong WG. Genetic polymorphisms in IL-10 and IL-12b allele promoter regions in Chinese patients of Han nationality with HBV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1139-1143

摘要

目的: 我国是一个乙型肝炎大国, 乙型肝炎感染及其转归显然有人种、人群差异. 本研究对我国汉族人群中乙型肝炎病毒(hepatitis virus B, HBV)感染和发病与白介素 - 12 p40 (interleukin - 12 p40, IL - 12b)、白介素 - 10(interleukin - 10, IL - 10)启动子区基因多态性之间的关系进行了探讨.

方法: 利用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性分析 (restricted enzyme - fragment length polymorphisms, PCR - RFLP) 的方法对非相关人群的健康人群与 HBV 感染患者 (轻、中度慢性肝炎、重度慢性肝炎) 和 HBV 感染家系中的 HBV 携带者、既往 HBV 感染者、健康人群的 IL - 12b, IL - 10 启动子区 - 540C、- 592A (IL 10 - 5' A, IL 12 - 5' C) 单碱基多态性(SNP)进行了分析, 并且对两个突变位点进行了基因测序. 使用 SAS 统计软件进行统计分析.

结果: IL 10 - 5' A、IL 12 - 5' C 在非相关人群中的分布符合 Hardy - Weinberg 平衡. 非相关人群 IL 10 - 5' A、IL 12 - 5' C 突变等位基因在 HBV 患者中的频率近似于健康人群 (IL 10 - 5' A, HBV 患者 42.08 %, 健康人 41.9 %, $P > 0.05$; IL 12 - 5' C, HBV 患者 55.8 %, 健康人 64.6 %, $P > 0.05$). IL 10 - 5' A 与 IL 12 - 5' C 基因分布在慢性肝炎 (轻中) 和慢性肝炎 (重) 两组无显著性差异 ($P > 0.05$). 提示 IL 10 - 5' A, IL 12 - 5' C 单碱基多态性(SNP)对乙型肝炎病情轻中无影响; HBV 感染家系中 IL 10 - 5' A, IL 12 - 5' C 单碱基多态性在携带者、健康人群以及既往感染者三组间均匀分布, IL 12 - 5' C 突变频率与非相关人群相似 (非相关人群 - 540T 55.3 %, 相关人群 - 540T 55.9 %); IL 10 - 5' A

突变频率与非相关人群有显著性差异(非相关人群 -592C 42.0 %, 相关人群 -592C 19.5 %, $P < 0.01$).

结论: IL10-5' A 突变比 IL12-5' C 突变在 HBV 感染家系中可能起到更重要的作用, 或影响相关人群对 HBV 的易感性.

李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国. 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1139-1143

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1139.asp>

0 引言

免疫应答有关的细胞因子基因的多态性可能对 HBV 感染的结局产生一定的影响^[1]. 当细胞因子 IL-12 水平较低时, 预先应用 rIL-12 治疗可能有助于提高干扰素治疗的应答率^[2]. 乙型肝炎患者的血清 IL-10, IL-12 水平与病情的轻重密切相关^[3-6]. IL-10 对于 IL-12 的调控是抑制分泌. 不同种族体内细胞因子水平是不同的, 个体间细胞因子的分泌量不同受其基因启动子区基因多态性的影响^[7-9]. 我们探讨了 IL-12 p40 启动子区 -540C 单核苷酸突变(SNP)位点即 IL-12 p40C → A(IL12-5' C) 和 IL-10 启动子区 -592A SNP 位点即 IL-10-592A → C(IL10-5' A) 与乙型肝炎发病及易感性的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 根据 2000 年全国传染病与寄生虫病学会讨论修订的“病毒性肝炎防治方案”试行标准, 我们将患者组分为慢性肝炎(轻中度)、慢性肝炎(重度)组. 我院诊断明确的乙型肝炎住院患者 104 例, 血清 HBsAg 检查均阳性, 男 84 例, 女 20 例, 年龄 24-73(46±12)岁. 慢性肝炎(轻中度)75 例, 慢性肝炎(重度)29 例. 随机挑选我院健康体检人员, 乙型肝炎病毒血清标志阴性者 76 例. 采集了 7 个家系的外周血全血标本共 134 份, 分别来自我国河南、河北、山东、山西. 男 75 份, 女 59 份, 都是汉族, 年龄在 1-83(平均为 33±19)岁. 由于血缘关系的存在故称之为相关人群. 以上所有人均为汉族.

1.2 方法 基因组 DNA 提取采用 QIAGEN 公司的基因组 DNA 提取试剂盒, 自外周血 200 μl 中分离 DNA 作为 PCR 模板, 具体步骤见参考文献[10]. 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism PCR-RFLP)IL12-5' C PCR-RFLP 检测引物: 扩增 IL-12 p40 启动子区域包含 -540 位点的上、下游引物分别为 5' -CAGACTTACCA TGCTGAGAAA 3' 对应于 -502 ~ -52 3nt, 21 mer)及 5' AGTGGGAATACCTCAGCGTAA 3' (对应于 -758 ~ -779 nt, 20 mer), 扩增产物长度 286 bp; PCR 反应扩增体系为 25 μL, 含 4 × 2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL, 12.5 μmol/L 上、下游引物各 1 μL, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.3 μL, 基因组 DNA 1.0 μL. PCR 条件为 94 °C 5 min 变性, 然后再 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s,

30 个循环, 72 °C 10 min; RFLP 酶切体系为 10 μL, buffer 4 2.5 μL, BSA 0.1 μL, Hha I 限制性内切酶 0.2 μL, 双蒸水 2.7 μL, PCR 产物 6 μL, 37 °C 水浴 2 h 后, 酶切产物以 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果(表 1). IL10-5' A PCR-RFLP 检测引物: 扩增 IL-10 启动子区域包含 -592 位点的上、下游引物分别为 5' -TACTCTTACCC ACTTCCCCC-3' (对应于 -719 ~ -699nt, 20 mer)及 5' -GGGGACCCAATTATTTCTCA 3' (对应于 -402 ~ -422 nt, 20 mer), 扩增产物长度 314 bp. PCR 反应扩增体系为 25 μL, 含 4 × 2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL, MgCl₂ 1.0 μL, 上、下游引物各 1.0 μL, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.3 μL, 基因组 DNA 1.0 μL. PCR 条件为 94 °C 5 min 变性, 然后再 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 33 个循环, 72 °C 10 min; RFLP 酶切体系 10 μL, buffer C 1.0 M I, BSA 0.1 μL RsaI 限制性内切酶 0.2 μL, 双蒸水 1.7 μL, PCR 产物 7 μL, 37 °C 水浴 3 h 后, 酶切产物以 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果(表 1).

表 1 IL12-5' C 和 IL10-5' A 基因型与 PCR-RFLP 电泳结果

突变位点	wt/wt	wt/mt	mt/mt
	246 bp	286 bp	286 bp
IL12-5' C	40 bp	246 bp	
	185 bp	314 bp	314 bp
		40 bp	
IL10-5' A	129 bp	185 bp	
		129 bp	

wt: 野生型; mt: 突变型.

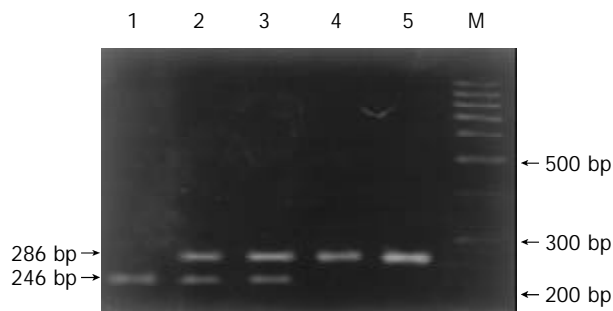
统计学处理 在本组中国汉族人中见 IL10-5' A 基因型, 组间频率比较采用 R×C 表 χ^2 检验或 Fisher 确切检验, 并检验等位基因在群体、性别上的分布是否符合 Hardy Weinberg 平衡定律. 数据处理均 SAS 软件处理.

2 结果

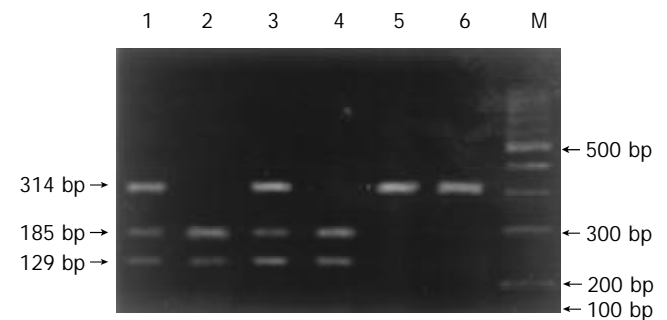
2.1 慢性乙型肝炎 IL10-5' A, IL12-5' C 的等位基因频率 我们发现在中国汉族(非相关的)健康人及 HBV 患者中 IL-10 启动子区 -592A → C 突变是普遍存在的, 大约有 46.6 % 的人发生 -592A → C 的突变即 IL10-5' A 基因突变频率, 部分个体发生纯合突变 (-592C/C, 14.9 %). 经检验符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$). 健康人群 IL10-5' A 基因突变频率、基因型频率与 HBV 患者的相似($P > 0.05$, 表 2). 慢性肝炎(轻中)、慢性肝炎(重)2 组 IL10-5' A 基因突变频率无显著性差异(图 1). 在非相关人群中, 通过比较健康人及 HBV 患者中 IL12-5' C 等位基因分布特点, 发现 IL12-5' C → T 突变是普遍存在的. 我国汉族人群 53.3 % 存在 -540C → T 的突变即 IL12-5' C 基因突变频率, 其中突变型纯合子 (-540 T/T) 频率占 25.7 %. 健康人及 HBV 患者的 IL12-5' C

基因型及基因突变频率(表2). 经检验符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$). 慢性肝炎(轻中)、慢性肝炎(重)2 组

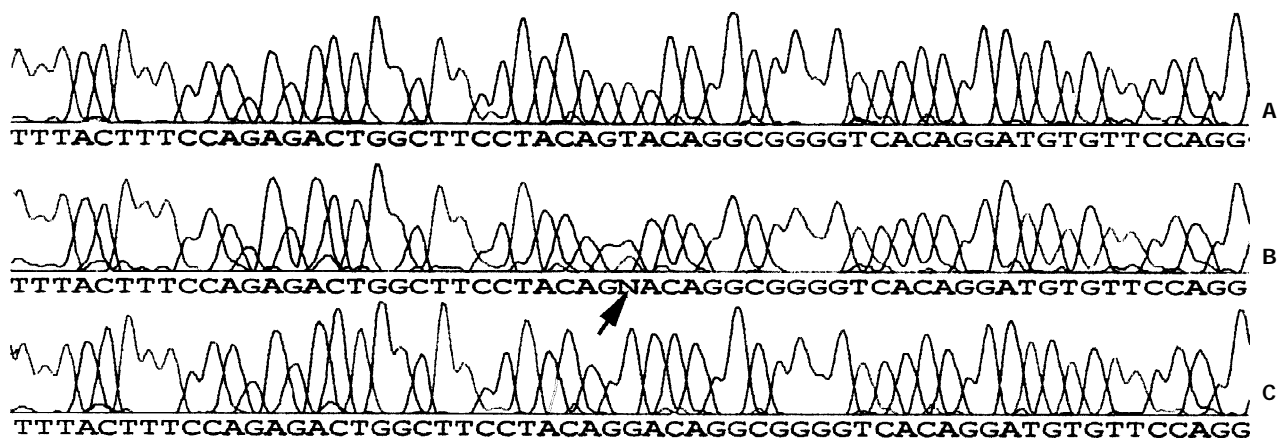
IL12-5' C 基因突变频率比较, 无显著性差异; 健康人群 IL12-5' C 突变频率与乙型肝炎患者的相似($P > 0.05$, 图2).



1: 野生型纯和子(C/C); 2, 3: 突变型杂合子(C/T); 4, 5: 突变型纯合子(T/T); M: 分子质量标准
图1 IL-12 PCR-RFLP 产物的琼脂糖电泳照片.



2, 4: 野生型纯和子(A/A); 1, 3: 突变型杂合子(A/C); 5, 6: 突变型纯合子(C/C); M: 分子质量标准
图2 IL-10 PCR-RFLP 产物的琼脂糖电泳照片.



A 纯合野生型; B 杂合型; C 纯合突变型. 箭头所指为 SNP 位点, 其对应位置的上图为 T 即正链的 A; 下图为 G 即正链 C.
图3 IL12-5' C PCR 产物测序结果.

表2 慢性乙型肝炎 IL10-5' A、IL10-5' C 基因型及突变频率

分组	n	基因型频率			突变频率
		wt/wt	wt/mt	mt/mt	
IL10-5' A 慢性肝炎(轻中)	75	23 (30.7)	38 (50.7)	14 (18.7)	44.0
慢性肝炎(重)	26	9 (39.1)	15 (59.7)	2 (7.7)	36.5
健康人群	68	20 (29.4)	39 (57.4)	9 (13.2)	41.9
IL10-5' C 慢性肝 (轻中)	66	8 (12.1)	41 (62.1)	17 (25.8)	56.8
慢性肝炎(重)	29	5 (17.2)	17 (59.2)	7 (24.1)	53.5
健康人群	76	13 (17.1)	43 (56.6)	20 (26.3)	64.6

$P > 0.05$.

表3 IL10-5' A、IL12-5' C 基因型在 HBV 感染家系中的分布

分组	n	基因型			基因频率
		wt/wt	wt/mt	mt/mt	
IL10-5' A HBV 携带者	20	13 (65.0)	7 (35.0)		19.6
既往感染者	28	18 (64.2)	9 (32.1)	1 (3.6)	19.6
健康人群	80	50 (62.5)	28 (35.0)	2 (2.5)	20.0
IL12-5' C HBV 携带者	19	3 (15.7)	11 (57.9)	5 (26.3)	55.5
既往感染者	28	2 (17.2)	21 (59.6)	5 (24.2)	55.4
健康人群	81	16 (17.1)	39 (56.6)	26 (26.3)	56.2

表4 相关人群非相关人群基因型分布情况

分组		n	基因型(%)			突变频率
			wt/wt	wt/mt	mt/mt	
IL10-5' A	非相关人群	169	52 (30.8)	92 (54.4)	25 (14.8)	42.0
	相关人群	128	81 (63.3)	44 (34.4)	3 (2.3)	19.5 ^b
IL12-5' C	非相关人群	171	26 (15.2)	101 (59.1)	44 (25.7)	55.3
	相关人群	128	21 (16.4)	71 (55.5)	36 (28.1)	55.9

^bP < 0.01 vs 非血缘相关人群.

为了证实酶切结果,我们分别对 IL10-5' A、IL12-5' C PCR 产物做 DNA 测序,结果证实 IL10-5' A、IL12-5' C 突变正确(图 3). IL10-5' A 测序略.

2.2 相关家系人群 HBV 感染者的 IL10-5' A、IL12-5' C 基因型 对 7 个家系的外周血全血标本共 134 份进行了研究. 采用 R × C 表双向无序 χ^2 检验, 研究 IL10-5' A、IL12-5' C 基因型在 HBV 携带者(HbsAg 阳性)、既往 HBV 感染者(HbsAg 阴性、抗-HbcAb 阳性)和健康人群之间的分布无显著型差异(P > 0.05, 表 3); 而相关人群与非相关人群 IL10-5' A 基因型相差显著; IL12-5' C 基因型两组间无显著性差异(表 4).

3 讨论

我国是一个肝炎大国, HBV 感染和发病具有如下特点: (1)同一种病毒(HBV)感染, 不同的个体所产生的结局不同^[11-17]; (2)同一种病毒, 不同人群产生的易感性不同^[18-21]; (3)同一种抗 HBV 药物, 在不同个体产生的疗效反应不同^[22-27]; (4)同一种 HBV 疫苗, 不同的个体产生预防效果有差别^[28-32]. 仔细分析 HBV 感染和发病的特点, 我们发现宿主遗传因素重要作用, 在一定意义上说机体的遗传基因可能是影响乙型肝炎的发生、发展、疗效和预后最主要的因素^[15-23].

我们的结果发现, IL10-5' A, IL12-5' C 在人群中的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡. 非相关人群 IL10-5' A, IL12-5' C 突变等位基因在 HBV 患者中的频率近似于健康人群(IL10-5' A, HBV 患者 42.1%, 健康人 41.9%, P > 0.05; IL12-5' C, HBV 患者 55.8%, 健康人 54.6%, P > 0.05). IL10-5' A 与 IL12-5' C 基因分布在慢性肝炎(轻中)和慢性肝炎(重)两组无显著性差异(P > 0.05), IL10-5' A, IL12-5' C SNP 可能单独对病毒性肝炎病情无影响; HBV 感染家系中 IL10-5' A, IL12-5' C SNP 在携带者、健康人群以及既往感染者三组间均匀分布(P > 0.05), IL12-5' C 突变频率相关人群(-540T 55.9%)与非相关人群(-540T 55.3%)相似(P > 0.05), 相关人群 IL10-5' A 突变频率(-592C 19.5%)与非相关人群(-592C 42.0%)有显著性差异(P < 0.01), 表示 IL10-5' A 突变比 IL12-5' C 突变在 HBV 感染家系中可能起到更重要的作用, 影响相关人群对 HBV 的易感性.

4 参考文献

- 1 Tambur AR, Ortel JW, Ben-Ari Z, Shabtai E, Klein T, Michowiz R, Tur-Kaspa R, Mor E. Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients. *Transplantation* 2001;71:1475-1480
- 2 Yu LC, Gu CH. Mutation of hepatitis B virus and its association with liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:978-979
- 3 Wang PZ, Zhang ZW, Zhou YX, Bai XF. Quantitative PCR detection of HBV DNA in patients with chronic hepatitis B and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:755-758
- 4 Huang QM, Liu HY, Yao ZG, Li YQ, Hong Y. Detection of serum IL-10 and IFN- γ in patients with hepatitis B and their significances. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Ganbing Zazhi* 2000;10:15-17
- 5 Du DW, Zhou YX, Feng ZH, Yao ZQ, Li GY. Immune responses to interleukin 12 and hepatitis B gene vaccine in H2 d mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:128-130
- 6 Li WB, Yao ZQ, Zhou YX, Feng ZH. Studies on immunization with HBV gene vaccine plus HBsAg protein in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:188-190
- 7 Fan XG, Liu EH, Li CH, Wang ZC, Luo LX, Tan DM, Hu GL. Detection of interleukin in hepatitis C infections. *Zhonghua Shiyen He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2000;14:145-148
- 8 Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RGJ, Huizinga TWJ, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:3915-3922
- 9 Wood NA, Keen LJ, Tilley LA, Bidwell JL. Determination of cytokine regulatory haplotypes by induced heteroduplex analysis of DNA. *J Immunol Methods* 2001;249:191-198
- 10 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
- 11 Wang FS, Jiang JD, Jin L, Liu MX. Comparison of efficient identification of the HIV-1 associated CCR5 gene polymorphism in genomic DNA purified by different extraction means from Chinese individuals. *J Chin AIDS/STD Prev Cont* 2000;6:5-8
- 12 Cacciola I, Cerenzia G, Pollicino T, Squadrito G, Castellana S, Zanetti AR, Mieli-Vergani G, Raimondo G. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus (HBV) and outcome of perinatal HBV infection. *J Hepatol* 2002;36:426-432
- 13 Starkel P, Horsmans Y, Geubel A, Ciccirelli O, Goubau P, Rahier J, Lerut J. Favorable outcome of orthotopic liver transplantation in a patient with subacute liver failure due to the emergence of a hepatitis B YMDD escape mutant virus. *J Hepatol* 2001;35:679-681
- 14 Chan HL, Tsang SW, Liew CT, Tse CH, Wong ML, Ching JY, Leung NW, Tam JS, Sung JJ. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:406-412
- 15 Zheng B, Woo PC, Ng M, Tsoi H, Wong L, Yuen K. A crucial role of macrophages in the immune to oral DNA vaccination against B virus in a murine model. *Vaccine* 2002;20:140-147
- 16 Luisa B, Alfredo A. Patter of hepatocellular carcinoma development in hepatitis B virus related cirrhosis. *Antiviral Research*

- 2001;52:199-207
- 17 Meir S, Orr B, Gilad D, Israel BD, Yosef S. Hepatitis B virus Px interacts with HBXAP, a PHD finger protein to coactivate transcription. *The J Biol Chem* 2002;277:9982-9988
- 18 Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope(M) protein of frequent and predominant hepatitis B variants. *Virology* 2002;292:44-58
- 19 Levy M, Safadi R, Zylber-Katz E, Granit L, Caraco Y. Impairment of the metabolism of dipyrone in asymptomatic carriers of the hepatitis-B virus does not occur in raped acetylators. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:461-465
- 20 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral research* 2001;52:99-111
- 21 Martin RB, Stephan G, Maura D, Hans W, Jorg P. Structural and functional heterogeneity of naturally occurring hepatitis B virus variants. *Antiviral Redearch* 2001;52:125-138
- 22 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114
- 23 Brunetto MR, Oliveri F, Coco B, Leandro G, Colombatto P, Gorin JM, Bonino F. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. *J Hepatol* 2002;36:263-270
- 24 Andreas R, Michael B, Tilman H, Hans W. Antiviral activity of interferon- α agaist hepatitis B virus can be studied in non-heptic cells and is independent of MxA. *The J Biol Chem* 2002;277:7645-7647
- 25 Zollner B, Schafer P, Feucht HH, Schroter M, Petersen J, Laufs R. Correlation of hepatitis B virus load with loss of e antigen and emerging drug-resistant variants during lamivudine therapy. *J Med Virol* 2001;65:659-663
- 26 Pieter H, Robert A, Hubert GM, Pieter EZ, Solko WS. Acute exacerbation of chronic hepatitis Bvirus infection after withdrawal of lanivudine therapy. *Hepatology* 2000;32:635-639
- 27 Joseph T, Linda E-S, Georgia D, Kristy E, Hui Z. Reduced antigenicity of the hepatitis Bvirus HbsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* 2002;293:305-313
- 28 Jody LB, Leon G, Stephen L, Don G. Activation of a nonclassical NKTCcell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 2002;16:583-594
- 29 Weiss P. Safe vaccination against hepatitis B virus and discontinuation of hepatitis B immune globulin treatment in a liver transplanted patient. *Transpl Proceed* 2000;32:712-713
- 30 Christopher L, Wills-Karp KM. Complement and IL-12: yin and yang. *Microbes Infection* 2001;3:109-119
- 31 Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberh ML. Prostaglandin E (2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001;97:3466-3469
- 32 Cappiello MG, Sutterwala FS, Trinchieri G, Mosser DM, Ma X. Suppression of IL-12 transcription in macrophages following Fc receptor ligation. *Immunology* 2001;4498-4506

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

• 病例报告 •

成人不典型郎格罕组织细胞增生症 1 例

王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生

王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生, 中国人民解放军总医院消化科北京市 100853
项目负责人: 杨云生, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院消化科.
电话: 010-66937231
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-25

王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生. 成人不典型郎格罕组织细胞增生症 1 例. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1143

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1143.asp>

1 病例报告

患者女性, 50 岁, 因黄疸及皮肤黄色瘤 1 年半于 2000-04 入院. 追溯病史发现自 1986 年起出现多饮、多尿, 化验血糖及肾功能正常, CT 检查垂体未发现异常, 予氢氯噻嗪治疗后尿量由 4 000-5 000 mL/d 减少为 2 000-3 000 mL/d. 1998-11 出现皮肤瘙痒、黄疸, 伴低热, 腹部 CT 检查显示肝内胆管扩张, 1999-03 在外院行胆总管探查术, 术中从右肝管取出泥沙样结石, 胆管壁病理检查示炎性改变, 最后诊断为胆结石. 术后黄疸继续加重, 并出现全身多发黄色小结节. 入院查体: 重度黄疸, 面部、四肢和腹部(包括手术瘢痕处)见黄色至棕黑色的倾向融合的片状丘疹及小结节. 腹软, 肝脾均肿大, 质地中等, 无明显压痛. 化验总胆红素 359.6 $\mu\text{mol/L}$, 直接胆红素 183.9 $\mu\text{mol/L}$, 血甘油三酯及总胆固醇增高, 尿比重正常. 胸部 CT 检查提示肺间质纤维化, 头颅及盆腔 X 线检查、蝶鞍部磁共振检查未见异常. 肝穿活检及皮肤活检病理检查可见大量具有肾形细胞核的特殊组织细胞, 进一步行免疫组化染色 S-100 阳性, 电镜检查发现网球拍样的 Birbeck 颗粒. 胃镜及支气管镜检查见食管、胃、喉、气管及支气管内多发黄色小结节,

均取活检, 病理结果同上. 确诊为郎格罕组织细胞增生症, 给予泼尼松和依托泊甙的 2 个疗程的联合化疗效果不佳. 随访结果: 1 a 后此例因肝功能衰竭死亡.

2 讨论

郎格罕组织细胞增生症(langerhans cell histiocytosis, LCH)旧称组织细胞增生症 X(histiocytosis X), 是一种罕见病, 年发病率为百万分之 0.5-5.4, 多发生在 10 岁以下的儿童. 最常累及的器官为骨骼, 特别是颅骨, 其次为皮肤、肺、肝、脾、淋巴结和下丘脑-垂体. 此病例为中年起病, 有多器官受累, 但未发现常见的骨损害. LCH 常分为三种亚型: Letterer-Siwe 病, Hand-Schüller-Christian 病和骨嗜酸性肉芽肿. Letterer-Siwe 病为急性弥漫性, 发展快; Hand-Schüller-Christian 病为慢性进行性疾病, 病变为多发性, 主要累及骨骼; 骨嗜酸性肉芽肿为良性局限性组织细胞增生. 此病例不具备上述任何一种的典型表现, 其主要表现为梗阻性黄疸及皮肤黄色瘤, 故需与原发胆汁性肝硬化相鉴别, 化验血抗线粒体抗体及肝穿活检已经排除之. 此病例逆行胰胆管造影检查显示肝内多发胆管狭窄, 故其黄疸的原因以硬化性胆管炎、继发性胆汁性肝硬化的可能性大^[1,2]. 部分 LCH 患者呈良性过程, 可自行缓解; 部分患者呈恶性过程, 目前主张对广泛型 LCH 行全身化疗.

3 参考文献

- 1 Hadzic N, Pritchard J, Webb D, Portmann B, Heaton ND, Rela M, Dhawan A, Baker AJ, Mieli-Vergani G. Recurrence of Langerhans cell histiocytosis in the graft after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 2000;70:815-819
- 2 Kim M, Lyu C, Jin Y, Yoo H. Langerhans' cell histiocytosis as a cause of periportal abnormal signal intensity on MRI. *Abdom Imaging* 1999;24:373-377

肝外胆管癌组织 BAG-1 与 BAD 表达与凋亡调控的原位定量研究

闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李 青, 胡沛臻, 王文亮

闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮, 中国人民解放军第四军医大学西京医院病理科 陕西省西安市 710033

闫庆国, 男, 1968-08-20 生, 安徽省霍山县人, 汉族. 1992 年第四军医大学本科毕业, 2000 年第四军医大学博士研究生毕业, 讲师. 主要从事肿瘤的分子病理研究.

国家自然科学基金资助课题, No.39270744

项目负责人: 王文亮, 710033, 陕西省西安市长乐西路 169 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院病理科. wlwang@fmmu.edu.cn

电话: 029-3375497 传真: 029-3224161

收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-03-25

In situ quantitative study of BAG-1 and BAD in extrahepatic cholangiocarcinoma

Qing-Guo Yan, Jian-Guo Shi, Gao-Sheng Huang, Chuan-Shan Zhang, Qing Li, Pei-Zhen Hu, Wen-Liang Wang

Qing-Guo Yan, Jian-Guo Shi, Gao-Sheng Huang, Chuan-Shan Zhang, Qing Li, Pei-Zhen Hu, Wen-Liang Wang, Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation, No. 39270744

Correspondence to: Wen-Liang Wang, Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, No.169 Changle West Road, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. wlwang@fmmu.edu.cn
Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-25

Abstract

AIM: To detect the expression of apoptosis related proteins BAG-1 and BAD and to investigate their functions of apoptosis modulation and relations to tumor differentiation in extrahepatic cholangiocarcinoma.

METHODS: Quantitative *in situ* methods of DAKO Envision™ Systems immunohistochemistry in combination with computer-assisted image analysis and apoptotic cells counting were used to observe the expression levels of BAG-1 and BAD and the apoptosis indexes in 42 cases of extrahepatic cholangiocarcinoma.

RESULTS: The expression levels of BAG-1 and BAD were measured with average absorbance (A) derived from the quantitative image analysis. Among 24, 13 and 5 cases of well, moderately and poorly differentiated extrahepatic cholangiocarcinomas, the average A of BAG-1 was respectively 0.068 ± 0.037 , 0.112 ± 0.057 and 0.152 ± 0.062 , of BAD was respectively 0.079 ± 0.053 , 0.138 ± 0.058 and 0.165 ± 0.061 , and the apoptotic indexes examined in the hematoxylin-and-eosin-stained specimens were respectively 1.1 ± 0.5 , 1.7 ± 0.3 and 3.5 ± 1.3 . The expression levels of BAG-1 and BAD and the apoptotic indexes were increased obviously from well, moderately to poorly differentiated extrahepatic cholangiocarcinoma ($P < 0.05$). The expression level of BAD was correlated to the apoptotic indexes ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Expressions of BAG-1 and BAD and apoptosis indexes were all associated with differentiation of extrahepatic cholangiocarcinoma. BAG-1 and BAD may take part in the apoptosis modulation of the tumor.

Yan QG, Shi JG, Huang GS, Zhang CS, Li Q, Hu PZ, Wang WL. *In situ* quantitative study of BAG-1 and BAD in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1144-1147

摘要

目的:检测凋亡相关蛋白BAG-1与BAD在肝外胆管癌中的表达,探讨BAG-1与BAD在肝外胆管癌细胞凋亡调控中的作用以及与胆管癌分化的关系.

方法:采用免疫组织化学方法(DAKO EnVision™ Systems),结合计算机图像分析系统与凋亡细胞计数,在组织原位定量检测42例肝外胆管癌的凋亡状况及BAG-1与BAD蛋白的表达水平.

结果:在24例高分化、13例中分化和5例低分化的肝外胆管癌中,免疫组化定量检测显示BAG-1阳性染色的平均吸光度值分别为 0.068 ± 0.037 , 0.112 ± 0.057 和 0.152 ± 0.062 ; BAD 阳性染色的平均吸光度值分别为 0.079 ± 0.053 , 0.138 ± 0.058 和 0.165 ± 0.061 , HE 染色计数典型凋亡细胞的指数分别为 1.1 ± 0.5 , 1.7 ± 0.3 和 3.5 ± 1.3 . BAG-1、BAD 的表达水平及凋亡指数在高、中、低分化的肝外胆管癌中逐级增加($P < 0.05$), 凋亡指数与BAD的表达呈正相关($P < 0.01$),表明凋亡相关的BAG-1和BAD蛋白的表达与肝外胆管癌的分化程度有关,且二者可能参与了其凋亡的调控.

结论:在肝外胆管癌中,凋亡相关蛋白BAG-1和BAD的表达及凋亡指数与肿瘤的分化有关. BAG-1和BAD均有可能参与其凋亡调控.

闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮. 肝外胆管癌组织 BAG-1 与 BAD 表达与凋亡调控的原位定量研究. 世界华人消化杂志 2003; 11(8):1144-1147

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1144.asp>

0 引言

胆管癌(cholangiocarcinoma)可分为肝内和肝外胆管癌,前者又称肝内胆管细胞癌,与肝细胞肝癌合称为原发性肝癌,有关的凋亡研究已经较为深入^[1-4],而对肝外胆管癌的凋亡研究则相对薄弱;特别是肝外胆管癌在我

国的发病率呈上升趋势, 因此加强对其凋亡调控的研究, 在我国尤其具有重要意义. 目前已知有多种凋亡相关因子参与胆管癌的细胞凋亡调控^[5-13], 其中 Bcl-2 家族的成员发挥重要作用^[12,13]. BAG-1 和 BAD 是 Bcl-2 家族中相对较晚发现的凋亡调控分子, 具有多种生物学作用^[14-25], 其在肝外胆管癌中的表达及其意义, 目前尚不清楚. 我们应用免疫组化技术结合计算机图像分析和凋亡细胞计数, 检测了肝外胆管癌中细胞凋亡状况及 BAG-1 与 BAD 的表达, 探讨其表达与肝外胆管癌凋亡及分化的关系, 为胆管癌的凋亡机制研究提供一定的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 肝外胆管癌 42 例为西京医院外科手术标本, 其中高分化胆管癌 24 例, 中分化 13 例, 低分化 5 例. 标本均经 40 g/L 中性甲醛固定, 石蜡包埋, HE 染色, 病理诊断证实. 兔抗人 BAG-1, BAD 多克隆抗体购自博士德公司, DAKO EnVision™ Systems (k4001) 免疫组化检测试剂盒购自 DAKO 公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测 石蜡切片常规脱蜡至水, 30 mL/L H₂O₂ 甲醇封闭内源性过氧化物酶活性, RT 30 min; 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液中(pH 6.0), 微波修复抗原; 3 g/L BSA 封闭非特异性背景, 37 °C 30 min; 加兔抗人 BAG-1, BAD 多克隆抗体(1:50), 4 °C 过夜; 37 °C 复温 1 h; 加 DAKO EnVision™ Systems 试剂, 37 °C 30 min; 以上各步骤间均用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 缓冲液洗, 5 min×3; DAB 呈色, 苏木精衬染, 脱水、透明, 中性树脂封片, 镜下观察. 同时设立已知阳性对照、空白对照及正常未免疫兔血清替代对照. 免疫组化结果的定量分析采用 CMIA007 真彩色医学图像计算机分析系统, 对每例组织切片随机选取 5 个视野, 阳性标本选取阳性细胞区域, 通过显微摄像系统将选取的视野送入计算机, 分别进行真彩色图像分析, 取平均吸光度值作为该组织切片的免疫组织化学染色强度定量指标^[26]. 每次测量前均以空白对照切片为标准重新调节光源以达到统一的空白阈值.

1.2.2 凋亡细胞计数 参照 Higaki et al (Am J Pathol 1996; 149:429)的方法, 在 HE 染色组织中根据形态学特征识别典型凋亡细胞, 计算凋亡指数 AI. HE 切片中凋亡细胞的形态特征为单个的细胞收缩变小, 与周围组织分离; 胞质均匀粉染, 弱嗜伊红; 核固缩或碎裂; 周围无炎细胞反应. 在 400× 视野下任取 10 个视野, 用目镜网格测微计数每个视野中的凋亡细胞数和癌细胞数, 然后计算出每例平均凋亡细胞数(Σ 1)和癌细胞数(Σ 2), 最后用公式计算出平均每例 AI. 公式为: $AI = [\Sigma 1 / \Sigma 2] \times 100\%$.

2 结果

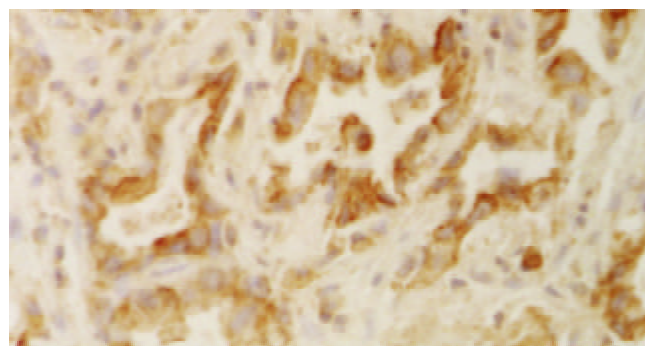
免疫组化检测 BAG-1 和 BAD 的阳性信号为棕黄色颗粒

状, 主要位于细胞质, 其中 BAG-1 可以出现少量胞核着色, 阳性细胞在瘤组织中弥漫性分布(图 1). 在高、中、低分化肝外胆管癌中, BAG-1 和 BAD 的阳性检出率均随肿瘤分化的降低而增高, 图像定量分析结果表明高、中分化与中、低分化胆管癌之间 BAG-1 和 BAD 的表达水平存在显著性差异(分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 说明 BAG-1 和 BAD 的阳性表达与组织分化程度相关, 组织分化程度高, BAG-1, BAD 表达阳性信号弱; 组织分化程度低, BAG-1, BAD 表达阳性信号强. 在检测 BAG-1, BAD 的表达情况同时, 我们还在 HE 染色切片中检测了肝外胆管癌的凋亡指数 AI, 结果表明在高、中、低分化胆管癌中 AI 随肿瘤的分化降低而增高($P < 0.01$). 相关分析显示肝外胆管癌的凋亡指数与 BAD 的表达水平间呈正相关($r = 0.561$, $P < 0.01$, 表 1).

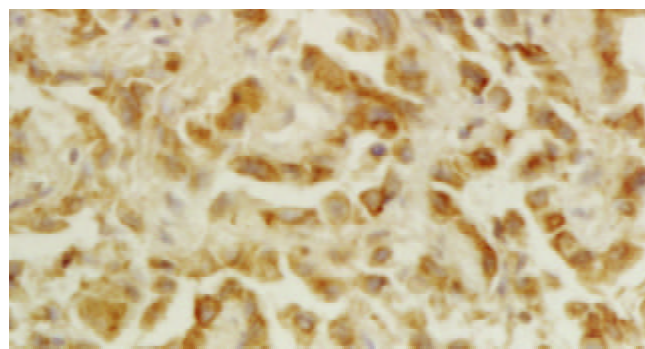
表 1 肝外胆管癌中的 AI 及 BAG-1 和 BAD 在癌组织中的表达

组别	n	AI(%)	BAG-1 positive				BAD positive			
			n	Rate(%)	A($\bar{x} \pm s$)	n	Rate(%)	A($\bar{x} \pm s$)	n	Rate(%)
高分化	24	1.1±0.5	10	41.7	0.068±0.037	11	45.8	0.079±0.053		
中分化	13	1.7±0.3 ^b	7	53.8	0.112±0.057 ^b	8	61.5	0.138±0.058 ^b		
低分化	5	3.5±1.3 ^b	3	60.0	0.152±0.062 ^a	4	80.0	0.165±0.061 ^a		

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, 低分化 vs 中分化, 中分化 vs 高分化 (t test)



A: BAG-1



B: BAD

图 1 肝外胆管癌中 BAG-1 和 BAD 的表达与分布, DAKO EnVision™ Systems 法 ×400.

3 讨论

BCL-2 家族成员在细胞凋亡调控中占据特殊的地位,

在多种肿瘤中都具有重要的作用^[27-30]. BAG-1 (BCL-2 athanogene-1)最初克隆时发现他是一种 BCL-2 结合的抗凋亡分子, 为 BCL-2 家族成员之一, 其后研究表明他是一种多功能蛋白^[14-21], 它具有拮抗 PDGF 和 HGF 介导的凋亡作用, 可与肝细胞生长因子受体结合形成复合物, 诱导凋亡后此复合物迅速增加; 其次, BAG-1 还可以与 RAF-1 激酶、SIAH-1、类固醇激素受体、调节分子伴侣 HSP70 等多种蛋白发生作用; 此外, BAG-1 蛋白还具有与细胞骨架蛋白作用, 促进肿瘤细胞迁移的功能. 但凋亡调控作用仍是其诸多功能中最为重要的. BAD 是首先从鼠的 cDNA 文库克隆鉴定出的促凋亡基因, 其后又克隆出人的同源基因, 他属于 BCL-2 家族成员. 双杂交和序列分析显示 BAD 与 BCL-2 和 BCL-xL 结合, 具有促进凋亡作用, 故名 BAD (BCL-xL/BCL-2-associated death promoter), 他存在 BCL-2 家族成员 BH-3 同源结构域和序列, 这是 BAD 与 BCL-2 家族蛋白结合所必须的^[24,25]. BAG-1 和 BAD 作为调控细胞凋亡的重要成员, 其在肿瘤中的研究一直受到重视. 暨往的研究发现多种凋亡相关蛋白在胆管癌中的表达都与肿瘤的分化存在一定的关系, BAG-1 和 BAD 是否在肝外胆管癌中也有表达, 其表达水平与凋亡状况及肿瘤分化间有无关系, 值得探讨.

BAG-1 在大部分正常人体组织表达很弱或不表达, 但在大多数肿瘤细胞系, 如白血病、乳腺癌、前列腺癌、直肠癌等均有表达, 表明 BAG-1 表达与肿瘤的恶性转化密切相关. BAG-1 在各种肿瘤中的表达具有不同的意义. Townsend et al^[17]研究发现 160 例乳腺癌中 92 % BAG-1 免疫组化阳性; Turner et al^[18]发现 BAG-1 在乳腺癌中表达较正常乳腺增强, 且有意义的是表达强者长期生存率高和无转移生存时间长. Rorke et al^[19]则发现 BAG-1 表达与非小细胞肺癌的预后有关, 胞质强阳性者预后较好. Shindoh et al^[20]发现在鳞状细胞癌中转移的病例较未转移者表达高, 在高级别的较低级别的表达高. 本实验中 BAG-1 在高中低分化的肝外胆管癌中的表达阳性率和定量检测的表达水平逐渐增强, 表明细胞分化越低, BAG-1 的表达越趋于增强, 此结果与乳腺癌^[17,18]和鳞状细胞癌^[20]中的情况相似, 这可能由于较低分化的肿瘤恶性程度较高, 相应的抗凋亡机制也有所增强, 因此抗凋亡蛋白的表达较强. 在较低分化的胆管癌中细胞凋亡指数较高, 而抗凋亡蛋白 BAG-1 的表达较强, 这似乎是矛盾的, 但实际上凋亡调控是一个复杂的网络, 细胞凋亡是众多抗凋亡和促凋亡蛋白表达产物综合作用的结果.

BAD 在多种肿瘤中的表达及其作用的研究已有较多报道. 例如, Ichinose et al^[22]发现 BAD 蛋白磷酸化后失活, 失活后的 BAD 可加剧胶质母细胞瘤和前列腺癌的恶性转化. Kohler et al^[23]则发现 BAX 和 BAD 的高表达与急性白血病的预后不良相关, 可以作为一个预后指标. 在 BCL-2 和 BCL-xL 过表达的情况下, BAD 可直接诱导凋亡, 具有治疗意义^[24]; 在直肠癌组织中 BAD 与

BCL-2 的异二聚体减少有助于癌的进展, 促凋亡的 BAX 和 BAD 与抗凋亡的 BCL-2 和 BCL-xL 竞争性形成二聚体调节凋亡^[25]. 本研究中 BAD 在肝外胆管癌中的表达阳性率及定量检测的表达水平呈现出肿瘤分化越低表达越强的特征, 而 BAD 作为一种促凋亡蛋白, 其表达产物发挥促凋亡作用, 这与在较低分化的肝外胆管癌中肿瘤细胞的凋亡指数也逐渐增多是一致的.

4 参考文献

- 1 Tannapfel A, Wittekind C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Arch* 2002;440:345-352
- 2 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 3 Shan CM, Li J. Study of apoptosis in human liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:247-252
- 4 Wang BY. Apoptosis and liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:425-427
- 5 Li ZY, Zou SQ. Fas counterattack in cholangiocarcinoma: a mechanism for immune evasion in human hilar cholangiocarcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:860-863
- 6 Okuda K, Nakanuma Y, Miyazaki M. Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 2: molecular pathology and treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1056-1063
- 7 Ahn EY, Pan G, Vickers SM, McDonald JM. IFN-gamma upregulates apoptosis-related molecules and enhances Fas-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 2002;100:445-451
- 8 Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, Bronk SF, Gores GJ. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2002;35:552-559
- 9 Kanno N, Glaser S, Chowdhury U, Phinizz JL, Baiocchi L, Francis H, LeSage G, Alpini G. Gastrin inhibits cholangiocarcinoma growth through increased apoptosis by activation of Ca²⁺-dependent protein kinase C- α . *J Hepatol* 2001;34:284-291
- 10 Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul N, Ubol S, Chaisuriya P, Sirisinha S. TNF- α induces caspase 3 (CPP 32) dependent apoptosis in human cholangiocarcinoma cell line. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31:167-170
- 11 Fan XG. A new candidate for apoptosis-trail. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:84-85
- 12 Okaro AC, Deery AR, Hutchins RR, Davidson BR. The expression of antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 in benign, dysplastic, and malignant biliary epithelium. *J Clin Pathol* 2001;54:927-932
- 13 Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Monden M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Matsuura N. Bcl-2 expression in cholangiocellular carcinoma is inversely correlated with biologically aggressive phenotypes. *Oncology* 2000;59:63-67
- 14 Lin J, Hutchinson L, Gaston SM, Raab G, Freeman MR. BAG-1 is a novel cytoplasmic binding partner of the membrane form of heparin-binding EGF-like growth factor: a unique role for proHB-EGF in cell survival regulation. *J Biol Chem* 2001;276:30127-30132
- 15 Cutress RI, Townsend PA, Brimmell M, Bateman AC, Hague A, Packham G. BAG-1 expression and function in human cancer. *Br J Cancer* 2002;87:834-839
- 16 Hague A, Packham G, Huntley S, Shefford K, Eveson JW. Deregulated BAG-1 protein expression in human oral squamous cell carcinomas and lymph node metastases. *J Pathol* 2002;197:60-71
- 17 Townsend PA, Dublin E, Hart IR, Kao RH, Hanby AM, Cutress RI, Poulson R, Ryder K, Barnes DM, Packham G. BAG-1 expression in human breast cancer: interrelationship between BAG-1 RNA, protein, HSC70 expression and clinico-pathological data. *J Pathol* 2002;197:51-59
- 18 Turner BC, Krajewski S, Krajewska M, Takayama S, Gumbs AA, Carter D, Rebbeck TR, Haffty BG, Reed JC. BAG-1: a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:992-1000
- 19 Rorke S, Murphy S, Khalifa M, Chernenko G, Tang SC. Prognostic significance of BAG-1 expression in nonsmall cell lung

- cancer. *Int J Cancer* 2001;95:317-322
- 20 Shindoh M, Adachi M, Higashino F, Yasuda M, Hida K, Nishioka T, Ono M, Takayama S, Reed JC, Imai K, Totsuka Y, Kohgo T. BAG-1 expression correlates highly with the malignant potential in early lesions (T1 and T2) of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2000; 36: 444-449
 - 21 Tang SC. BAG-1, an anti-apoptotic tumour marker. *IUBMB Life* 2002;53:99-105
 - 22 Ichinose M, Liu XH, Hagihara N, Youle RJ. Extracellular BAD fused to toxin transport domains induces apoptosis. *Cancer Res* 2002;62:1433-1438
 - 23 Kohler T, Schill C, Deininger MW, Krah R, Borchert S, Hasenclever D, Leiblein S, Wagner O, Niederwieser D. High BAD and Bax mRNA expression correlate with negative outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 2002;16:22-29
 - 24 Schimmer AD, Hedley DW, Pham NA, Chow S, Minden MD. BAD induces apoptosis in cells over-expressing Bcl-2 or Bcl-xL without loss of mitochondrial membrane potential. *Leuk Lymphoma* 2001;42:429-443
 - 25 Hattori T, Ookawa N, Fujita R, Fukuchi K. Heterodimerization of Bcl-2 and Bcl-X(L) with Bax and BAD in colorectal cancer. *Acta Oncol* 2000;39:495-500
 - 26 Esteve FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA, Smith TL, Chin DM, Liang SY, Pusztai L, Buzdar AU, Bacus SS. Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res* 2001;7:171-177
 - 27 Hou L, Li Y, Jia YH, Wang B, Xin Y, Ling MY, L S. Molecular mechanism about lymphogenous metastasis of hepatocarcinoma cells in mice. *World J Gastroenterol* 2001;7:532-536
 - 28 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
 - 29 Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1059-1062
 - 30 Okaro AC, Fennell DA, Corbo M, Davidson BR, Cotter FE. Pk11195, a mitochondrial benzodiazepine receptor antagonist, reduces apoptosis threshold in Bcl-X(L) and Mcl-1 expressing human cholangiocarcinoma cells. *Gut* 2002;51:556-561

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

• 病例报告 •

慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变 1 例

张文瑾, 王晓峰, 赵景民

张文瑾, 王晓峰, 赵景民, 中国人民解放军 302 医院 北京市 100039
项目负责人: 张文瑾, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军 302 医院. weizm@rol.cn.net
电话: 010-66933718
收稿日期: 2003-04-08 接受日期: 2003-05-17

摘要

报告 1 例慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变. 临床上与 Gilbert 综合征较难鉴别. 通过病理检查可以看到肝组织色素沉着较弥散, 并同时伴有炎症损伤改变, 附图片 1 张. 提示治疗上应积极去除病因, 进行适当护肝治疗.

张文瑾, 王晓峰, 赵景民. 慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变 1 例. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1147

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1147.asp>

1 病例报告

患者, 男, 49 岁. 主因反复乏力、纳差 8 a, 伴右上腹隐痛 6 a, 于 2002-03-05 入院. 患者自 1994 年感乏力纳差, 未行诊治. 1996 年上述症状加重伴右上腹隐痛, 曾化验 ALT 正常, TBIL/DBIL 32.5/8.6 $\mu\text{mol/L}$, 仍未行诊治, 2002-02-25 协和医院查 ALT 正常, TBIL/DBIL 54.4/9.2 $\mu\text{mol/L}$, 为进一步诊治入本院. 患者 1988-1994 年期间, 每天平均饮酒 50 g. 入院查体: T 36 $^{\circ}\text{C}$, P 68 次/min, R 18 次/min, BP 15.7/9.2 KPa, 神志清, 精神可, 巩膜可疑黄染, 肝脾无肿大及触叩痛. 化验: ALT 23 U/L, AST 24 U/L, A/G 1.83, TBIL/DBIL 25.5/5.5 $\mu\text{mol/L}$, ALP 25 U/L, GGT 24 U/L, 甲、乙、丙、丁、戊等多种肝炎病毒指标均阴性. B 超示轻度脂肪肝. 临床诊断酒精性脂肪肝. 肝脏穿刺组织学显示肝小叶 III 带肝细胞轻度大小泡混合性脂肪变性, 区域性肝细胞水样变性, 可见不典型 Mallory 小体, 肝细胞毛细胆管侧可见细的黄褐色色素颗粒沉着; 肝窦周单个核细胞数目增多, 可见单个核细胞及分叶核白细胞(图 1); 汇管区炎症不明显, 无明显扩大, 小叶界板尚完整, 小叶内肝细胞偶见点灶状坏死. 免疫组化 (LSAB 法) HBsAg、HBcAg、HCV NS₃ 及 NS₅ 均为阴性. 病理诊断: 肝细胞轻度脂肪变性, 轻度炎反应, 考虑为酒精性肝损伤轻度, 伴 Gilbert 综合征样改变. 该患者经严格戒酒, 应用善复、熊胆胶囊治疗后症状明显改善, 近半年来多次复查肝功能

示 ALT 正常, TBIL 持续低于 30 $\mu\text{mol/L}$.

2 讨论

酒精性肝损伤临床上较易见到, 多表现为酒精性脂肪肝, 酒精性肝炎, 酒精性肝硬化三种形式. 此例患者有长期大量饮酒史, 自 1996 年以来血清胆红素升高(以间接胆红素增高为主), 多次检查除外病毒感染, B 超示脂肪肝, 临床诊断酒精性脂肪肝, 肝脏组织学示: 肝细胞轻度脂肪变性, 轻度炎反应, 伴 Gilbert 综合征样改变.

Gilbert 综合征系先天性非溶血性胆红素代谢缺陷疾病之一, 也是临床上最常见的一种家族性黄疸, 以血中非结合胆红素增高为主要特点. 可在感染饮酒等诱因下发病. 发病机制与肝细胞缺乏葡萄糖醛酸转移酶; 肝细胞膜摄取非结合胆红素能力下降; 非结合胆红素附着于白蛋白的分离障碍等有关. 组织学上观察色素沉着集中于毛细胆管周围, 肝组织无明显炎症损伤改变, 预后良好, 无需治疗.

此例酒精性肝损伤所致 Gilbert 综合征样改变, 是由慢性损伤逐渐形成, 肝组织病理发现色素沉着较弥散, 并同时伴有炎症损伤改变, 治疗上应积极去除病因, 进行适当护肝治疗.

一般情况下, 酒精性肝病患者呈现直接胆红素升高为主的肝细胞性黄疸, 而以间接胆红素升高为主的 Gilbert 综合征样黄疸尚少见. 我们检索了近 20 a 有关文献, 未见有类似报道. 因此, 对于临床诊断困难的患者, 积极进行组织学检查, 结合临床及血液生化学检查, 将对患者的诊断治疗及预后提供更加准确的依据.

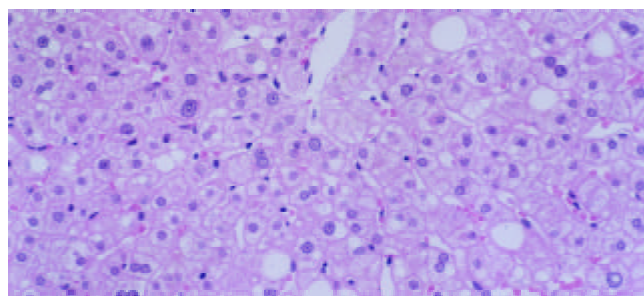


图 1 肝细胞轻度大小泡混合性脂肪变性, 窦周炎细胞浸润, 中央静脉周围肝细胞内可见细色素沉积(HE×200).

牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡

李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国

李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 上海第二医科大学附属瑞金医院感染科 上海市 200025
李定国, 上海第二医科大学附属新华医院消化科 上海市 200092
李光明, 男, 1968-09-02 生, 江西进贤县人, 1992 年江西医学院本科毕业, 2002-07 上海第二医科大学硕士毕业, 现为上海第二医科大学博士研究生, 主治医师. 主要从事肝病研究.
项目负责人: 谢青, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学附属瑞金医院感染科. xieqing@sh163.net
电话: 021-64311242
收稿日期: 2002-10-18 接受日期: 2002-11-16

Taurodeoxycholic acid induced apoptosis via mitochondrial injury in HepG2 cells

Guang-Ming Li, Qing Xie, Xia-Qiu Zhou, Hong Yu, Qing Guo, Dan Liao, Ding-Guo Li

Guang-Ming Li, Qing Xie, Xia-Qiu Zhou, Hong Yu, Qing Guo, Dan Liao, Department of Infectious Disease, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China
Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China
Correspondence to: Dr. Qing Xie, Department of Infectious Disease, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China. xieqing@sh163.net
Received: 2002-10-18 Accepted: 2002-11-16

Abstract

AIM: To investigate the molecular mechanism of HepG2 cell apoptosis induced by Taurodeoxycholic acid (TDCA).

METHODS: Morphologic evaluations of apoptosis were performed by HE staining and electro-microscope. DNA fragment was detected by electrophoresis on 1.5 % agarose gel. Apoptosis rate was measured by flow cytometry using PI probe. After incubation of HepG2 cell with TDCA, the release of cytochrome C from mitochondria into cytosol was determined by Western blot analysis, and the activities of Caspase-8,9,3 were evaluated by chromometry.

RESULTS: Incubation of HepG2 cells with 400 $\mu\text{mol/L}$ TDCA for 12 h induced significant cell apoptosis. Flow cytometry analysis showed that apoptosis rate was $50.4 \pm 2.2\%$ following TDCA incubation. The release of cytochrome C from mitochondria to cytosol in a time-dependent pattern was demonstrated during the development of apoptosis with subsequent activation of Caspase-9 and 3 obviously, while the activation of Caspase-8 was slightly involved in this apoptotic pathway.

CONCLUSION: TDCA can induce cell apoptosis mainly through initiating the release of cytochrome C from mitochondria to cytosol and the subsequent activation of procaspase-9.

Li GM, Xie Q, Zhou XQ, Yu H, Guo Q, Liao D, Li DG. Taurodeoxycholic acid induced apoptosis via mitochondrial injury in HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1148-1151

摘要

目的: 探讨牛磺酸脱氧胆酸(TDCA)诱导HepG2细胞凋亡的分子机制。

方法: 应用HE染色、电镜和DNA电泳对细胞凋亡定性; 应用流式细胞仪对细胞凋亡定量; 检测TDCA诱导HepG2细胞凋亡过程中, 线粒体细胞色素C释放及凋亡特异性蛋白酶 Caspase-3、8、9 活性的变化。

结果: TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h 可诱导显著 HepG2 细胞凋亡, 凋亡率为 $50.4 \pm 2.2\%$; TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中, 线粒体细胞色素 C 释放呈时间依赖性增加, 同时伴有 Caspase-9、3 蛋白酶活性显著增高, Caspase-8 活性仅轻度增高。

结论: 启动线粒体细胞色素C释放及随后激活Caspase-9途径, 可能是 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡的主要机制。

李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国. 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1148-1151
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1148.asp>

0 引言

胆汁淤积是一种常见的病理过程, 可由肝内外胆管狭窄、阻塞, 胆汁酸分泌模式改变及长期胃肠外营养等多种原因引起. 疏水性胆汁酸在肝内积聚一直被认为是胆汁淤积性肝病患者肝损伤的主要原因^[1]. 疏水性胆汁酸具有“去垢性”, 可引起肝细胞坏死. 然而, 大量肝活检资料发现, 在大多数胆汁淤积症中, 明显的肝细胞坏死并不多见^[1-5]. 近来报道, 在胆汁淤积性肝病中, 存在明显的肝细胞凋亡现象^[6-9]. 疏水性胆汁酸诱导肝细胞凋亡的确切机制尚未完全阐明, 牛磺酸脱氧胆酸(TDCA)是一种生理性疏水性胆汁酸, 胆汁淤积时其在肝内浓度显著增高. 我们从分子水平探讨了TDCA诱导HepG2细胞凋亡的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞购自中科院上海细胞研究所. RPMI 1640 培养基购自 GIBCO 公司, 培养板和培养皿为 Nunclon 公司产品, 牛磺酸脱氧胆酸(Taurodeoxycholic acid; TDCA)和蛋白酶 K 均为 Sigma 公司产品, 小鼠细胞色素 C 单克隆抗体购自 Pharmingen 公司, Caspase-9 分析试剂盒购自 Chemicon International Inc; Caspase-3 分析试剂盒购自 Medical Biological Laboratories CO, LTD

(MBL); Caspase-8 分析试剂盒购自 Clontech Laboratories Inc; 胰蛋白酶, RNA 酶和羊抗小鼠免疫球蛋白购自深圳晶美生物公司, 新生小牛血清购于杭州四季青公司.

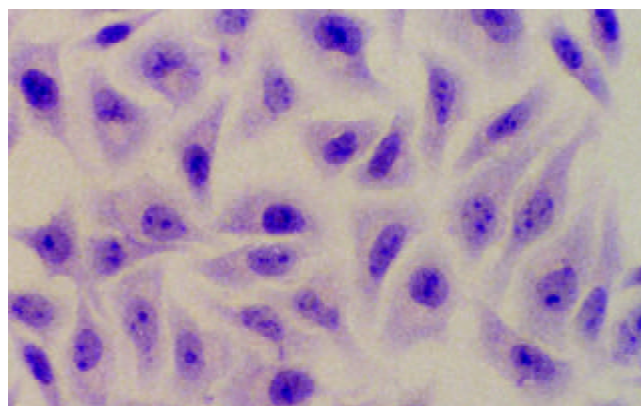
1.2 方法 HepG2 细胞用 RPMI1640 培养基(每 1 000 mL 含 RPMI1640 培养基干粉 10.4 g, Hepes 3.57 g, NaHCO_3 2.0-2.2 g, 青霉素 0.0 625 g, 链霉素 0.1 g) 置 37 °C, 5 % CO_2 培养箱 (NAPCO Series 5 400 CO_2 培养箱) 培养, 细胞贴壁 85-90 % 时, 用 EDTA- 胰酶(每 1 000 ml 含 EDTANa_2 0.2 g, Trypsin 2.5 g, NaCl 8 g, KCl 0.4 g, NaHCO_3 0.58 g, Dextrose 1g) 消化, 以台盼兰拒染试验测定细胞活率, 细胞活率 90 % 以上, 进行传代. 以不同剂量 TDCA 与 HepG2 细胞孵育, 发现 TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h 可诱导显著 HepG2 细胞凋亡. 将消化的 HepG2 细胞接种到预先置有无菌盖玻片 3.5 cm 培养皿中, 6 h 细胞贴壁后, 换新鲜培养液并加入 TDCA, 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$, 孵育 12 h, 弃培养皿上清液, 以 PBS 漂洗一次后, 加 40 g/L 甲醛 1 mL 固定 30 min, 然后取盖玻片进行脱水、染色, 透明、封片观察细胞形态变化. 将待检 10 cm 培养皿中培养基弃掉, 加入电镜固定液覆盖培养皿底, 放 4 °C 固定 4 h, 再将细胞刮下, 1 500 r/min, 离心 10 min, 送检. 将培养细胞消化、离心、转移到 1.5 mL eppendorf 管, 加细胞裂解液 450 μL (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mg/L 蛋白酶 K, 10 g/L SDS), 混匀, 置 37 °C 水浴箱过夜, 以等体积苯酚氯仿抽提. 加 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠, 2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA, 置 -20 °C, 2 h, 再以 14 000 r/min, 4 °C, 离心 20 min, 弃上清, 加含 RNA 酶 TE (RNase 终浓度为 20 mg/L) 50 μL 溶解 DNA, 取样品 10 μL 于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳(75 V, 1 h)紫外灯下观察, 并拍照. 贴壁细胞经胰酶消化后, 以 1 500 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 加入 PBS 悬浮洗涤一次, 离心, 弃上清, 加柠檬酸固定液 2 mL, 室温静置 30 min, 进行碘化丙啶染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡. 收集 TDCA 诱导 6, 9, 12 h 三个时间点的待检细胞 2×10^6 悬浮于 100 μL 预冷细胞裂解液中, 冰上孵育 10 min, 13 000 r/min, 离心 5 min. 将上清液(含胞质抽提物)转移到另一个洁净 1.5 mL 离心管, 置于冰上. 按说明书在标准比色管中依次加入反应缓冲液、双蒸水、胞质抽提物, 最后加入底物. 置 37 °C 恒温箱孵育 2 h. 比色计中读出 Caspase-9 和 Caspase-3 检测样本在 405 nm 的数值; Caspase-8 在 505 nm 的数值. 收集 2×10^6 待检细胞加冷 PBS 2 mL 于细胞沉淀, 混匀, 2 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 加入含蛋白酶抑制剂的三倍体积的细胞胞质抽提缓冲液(Sucrose 250 mmol/L; HEPES (pH 7.5) 20 mmol/L; KCl 10 mmol/L; MgCl_2 1.5 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; EGTA 1 mmol/L; Dithiothreitol 1 mmol/L), 冰上孵育 30 min, 玻璃匀浆器匀浆, 匀浆液用 750 g, 4 °C, 离心 10 min, 吸取上清液, 以 4 °C, 12 000 g 离心 30 min, 收集上清液于另一无菌塑料离心管. 用 BCA 检测法测定标本

中蛋白质含量. 取 20 μg 蛋白质于 12 % SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 1 h 后, 转移到硝酸纤维素薄膜上, 加入含 50 g/L 低脂奶粉的 PBST(磷酸缓冲液 + 1 g/L 吐温 -20) 封闭液 20 mL 室温下振荡 2 h. 再将膜放入另一干净容器内, 加入含 5 % 低脂奶粉的小鼠抗细胞色素 C 单克隆抗体(1 : 1 000)的新鲜孵育液, 4 °C 轻轻振荡过夜, 弃一抗孵育液, 用 PBST 室温下漂洗, 将膜再转移到另一干净容器内, 加入含辣根过氧化物酶标记的抗免疫球蛋白(1 : 2 000)封闭液, 室温下振荡孵育 2 h, 取膜, 以 PBST 室温下漂洗. 最后用增强化学发光法显示检测蛋白质条带.

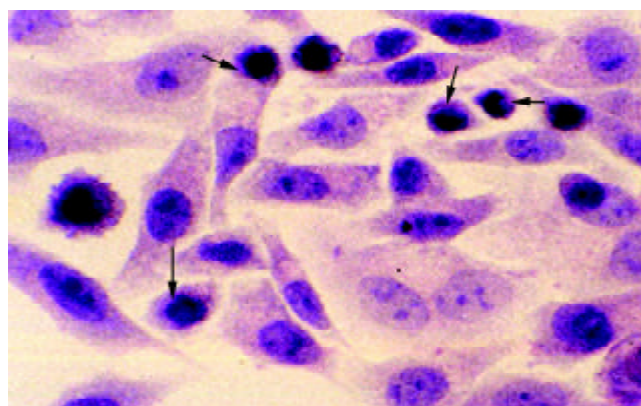
统计学处理 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Statpal 软件包分析.

2 结果

2.1 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡 细胞爬片固定后经 HE 染色显示, TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h, 可见明显的凋亡细胞(图 1). 电镜主要是对细胞核进行观察, 从亚细胞结构上证实细胞凋亡的存在, 核致密化是凋亡最具特征性的变化, TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h, 可见典型的凋亡细胞核改变(图 2). TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 与 HepG2 细胞孵育 12 h 可诱导显著的细胞凋亡, 流式细胞仪检测细胞凋亡率为 $50.4 \pm 2.2 \%$, 与对照组($2.1 \pm 0.2 \%$) 相比具有显著性差异($t = 36.1$, $P = 0.0008$).

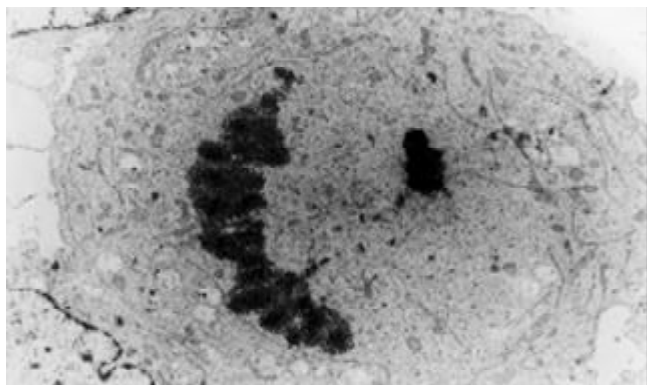


A: 对照组.



B: TDCA 组 细胞明显皱缩、呈圆形或不规则形, 核染色质致密、边缘, 呈蓝黑色等凋亡形态.

图 1 凋亡细胞形态学改变 HE $\times 40$



A: 对照组.

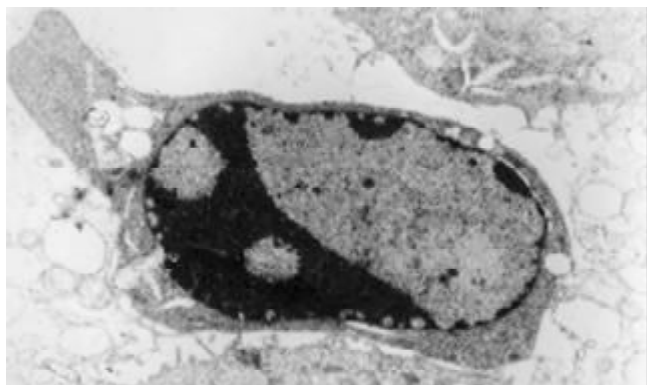
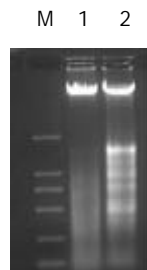
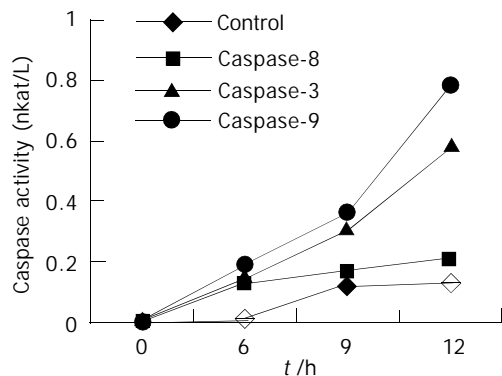
B: TDCA 组典型的凋亡小体结构.
图2 凋亡细胞核的形态改变 EM $\times 5\,000$.M: Marker; 1: Control; 2: TDCA
图3 DNA凝胶电泳显示: TDCA 组, 可见明显的 DNA Ladder.

图4 Caspase 蛋白酶活性.

2.2 细胞凋亡的生物化学检测 DNA Ladder 是凋亡在生化方面最重要、也是最具特征性的表现之一. 细胞经 TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 12 h, 通过凝胶电泳证实有明显的 DNA Ladder (图3). 在 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡

过程中, Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3 蛋白酶活性呈时间依赖性增高, 以 Caspase-9 和 Caspase-3 增高显著, 12 h 活性最高 ($t_9=13.0$, $P=0.0059$; $t_3=16.88$, $P=0.0035$), 与对照相比, Caspase-8 活性仅轻度增高 ($t=1.94$, $P=0.1917$, 图4). 在 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中, 采用免疫印迹法在细胞胞质内检测到细胞色素 C, 并且发现线粒体释放细胞色素 C 呈时间依赖性增加, 12h 最明显(图5).

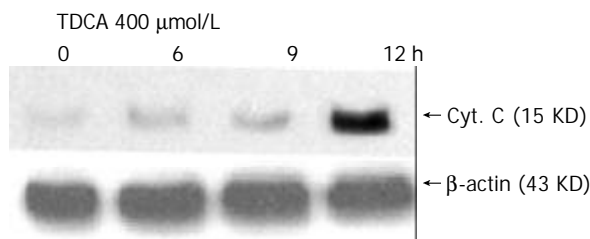


图5 TDCA 对线粒体细胞色素 C 释放的作用(免疫印迹法).

3 讨论

大量研究表明疏水性胆汁酸在体内外均可诱导肝细胞凋亡, 且诱导细胞凋亡的浓度明显低于其引起细胞坏死的浓度. 事实上, 在大多数胆汁淤积症中, 疏水性胆汁酸诱导肝细胞凋亡比其引起肝细胞坏死更多见^[4, 9-12]. 凋亡是一种细胞死亡方式, 我们从形态学及生化学方面证实 TDCA 400 $\mu\text{mol/L}$ 与 HepG2 细胞孵育 12 h 可诱导显著的细胞凋亡^[13], 表现为细胞皱缩、变圆、贴壁不牢固, 核染色质致密、边聚、凋亡小体形成及 DNA 凝胶电泳呈现凋亡所特有的 DNA Ladder; 经流式细胞仪检测死亡率为 50.4 %.

细胞色素 C 释放被认为是凋亡过程中的关键事件^[14-18]. 线粒体细胞色素 C 可通过调控细胞能量代谢决定受刺激细胞是发生凋亡还是坏死. 细胞色素 C 从线粒体易位到胞质是凋亡特异性蛋白酶 procaspase-9 活化的前提^[19-21]. 在 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中, 我们应用免疫印迹法检测到有细胞色素 C 从线粒体释放到胞质, 且发现线粒体细胞色素 C 释放呈时间依赖性增加, 12 h 最明显, 与细胞凋亡在 12h 显著增高一致; 表明 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡与线粒体细胞色素 C 释放显著相关, 提示胆汁淤积性肝病中, 肝细胞损伤可能与疏水性胆汁酸损伤线粒体膜, 引起细胞色素 C 释放介导肝细胞凋亡有关.

Caspase 是一类半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶, 目前已发现 14 种, 分启动 Caspase, 如 Caspase-8, 9, 和效应 Caspase, 如 Caspase-3, 7 两类; 分别参与凋亡的启动和执行过程, 他们的活化是凋亡过程中的关键事件. 不同的细胞凋亡途径, 可活化不同的启动 Caspase^[22-30]. Caspase-8 主要参与死亡受体 (TNF、FasL) 介导细胞凋亡的途径^[31-33], 而 Caspase-9 主要参与由一些凋亡诱导剂诱导线粒体损伤介导细胞凋亡的途径^[34-38]. 在 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡过程中, 我们检测了三种 Caspase

蛋白酶活性, 三种 Caspase 蛋白酶活性均呈时间依赖性增高, 其中以 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白酶活性升高显著, Caspase-8 活性仅轻度增高. 表明 TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡可能主要是与通过损伤线粒体, 释放细胞色素 C, 从而活化 Caspase-9 途径启动的 Caspase 级联反应有关. TDCA 诱导 HepG2 细胞凋亡可能不依赖 Caspase-8 的活化.

4 参考文献

- 李光明, 谢青, 周霞秋. 熊去氧胆酸在慢性肝病中的应用及机制. *肝脏* 2002;7:59-61
- Floreani A, Guido M, Bortolami M, Della Zentil G, Venturi C, Pennelli N, Naccarato R. Relationship between apoptosis, tumour necrosis factor, and cell proliferation in chronic cholestasis. *Dig Liver Dis* 2001;33:570-575
- 任可, 徐灿, 金震东, 李兆申. 胆汁淤积性肝病发病的分子学进展. *世界华人消化杂志* 2001;9:811-814
- Kaplowitz N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. *Clin Liver Dis* 2000;4:1-23
- 潘勤, 李定国. 原发性胆汁性肝硬变的发病机制及药物治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:564-566
- Rodrigues CM, Steer CJ. Bile acids and hepatocyte apoptosis: living/leaving life in the Fas lane. *Gastroenterology* 1999;117:732-736
- 吕鹏, 罗和生, 余保平. 细胞凋亡与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2000;8:1157-1159
- 李新平, 毛鑫智. 雌激素以及胆酸负荷和胆汁流失对大鼠肝胆功能的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:1009-1012
- Kumar D, Tandon RK. Use of ursodeoxycholic acid in liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:3-14
- Rodrigues CM, Steer CJ. The therapeutic effects of ursodeoxycholic acid as an anti-apoptotic agent. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1243-1253
- Marziani M, Glaser SS, Alpini G, LeSage GD. Role of apoptosis in development of primary biliary cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2001;33:531-533
- Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprecht E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001;33:616-626
- 李光明, 谢青, 周霞秋, 廖丹. 牛磺酸脱氧胆酸诱导 HepG2 细胞凋亡及坏死的研究. *临床消化病杂志* 2002;14:252-255
- Chen Q, Gong B, Almasan A. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2000;7:227-233
- Jiang S, Cai J, Wallace DC, Jones DP. Cytochrome c-mediated apoptosis in cell lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved. *J Biol Chem* 1999;274:29905-29911
- Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondrial is inhibitable by Bcl-xL. *J Bio Chem* 1999; 274:2225-2333
- Nakagawa I, Nakata M, Kawabata S, Hamada S. Cytochrome c-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell Microbiol* 2001;3:395-405
- Gastman BR, Yin XM, Johnson DE, Wieckowski E, Wang GQ, Watkins SC, Rabinowich H. Tumor-induced apoptosis of T cells: amplification by a mitochondrial cascade. *Cancer Res* 2000;15:6811-6817
- Gottlieb RA. Role of mitochondria in apoptosis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000;10:231-239
- Rocha S, Soengas MS, Lowe SW, Glanzmann C, Fabbro D, Winterhalter K, Bodis S, Pruschy M, Rocha S, Soengas MS. Protein kinase C inhibitor and irradiation-induced apoptosis: relevance of the cytochrome c-mediated caspase-9 death pathway. *Cell Growth Differ* 2000;11:491-499
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144:281-292
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776
- Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:5053-5060
- Bossy-Wetzel E, Green DR. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem* 1999;274:17484-17490
- Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 2002;36:592-601
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403:98-103
- Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695-698
- Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002;7:335-345
- Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000;14:2035-2044
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001;11:526-534
- Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life* 2000;50:85-90
- 范学工. 一个新的凋亡分子 - trail. *世界华人消化杂志* 2000;8:84-85
- Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Devereaux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998;273:27084-27090
- Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 2000;275:31199-31203
- Reed JC, Kroemer G. Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ* 2000;7:1145
- Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790-2799
- Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan C, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome C release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Different* 1999;6:842-854
- Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 1998;4:165-178

肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控

陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立

陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所 重庆市 400038

陈平, 男, 1964年生, 四川省眉山市人, 汉族, 1997年第三军医大学肝胆外科博士研究生毕业. 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事肝胆外科、腹腔镜外科临床及肝再生的实验研究.

国家自然科学基金课题, No. 30070746

项目负责人: 陈平, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所. chenping@263.net
电话: 023-65318301-73078

收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-14

Changes of hepatocyte cell cycle after partial hepatectomy in cirrhotic rat liver

Ping Chen, Kun Li, Jia-Hong Dong, Ben-Li Han

Ping Chen, Kun Li, Jia-Hong Dong, Ben-Li Han, Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation, No. 30070746

Correspondence to: Dr. Ping Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038 China. chenping@263.net

Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-01-14

Abstract

AIM: To investigate the effects of cyclins and oncogene proteins on liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats.

METHODS: By employing immunohistochemistry and *in situ* hybridization, we observed the changes of liver cyclin A, D and oncogene proteins in the model of rat liver cirrhosis (CCL₄) after partial hepatectomy.

RESULTS: The expressions and distributions of hepatocyte cyclin A and D were similar, which were mainly in the cytoplasm and nuclei of the cells. Around the central veins, the expressions were high and early at about 6 h postoperation. During liver regeneration, the expressions of cyclin A and D mRNA were marked and locally distributed. Cyclin B and Rb proteins were distributed in the cytoplasm and nuclei of the cells. Cyclin B and Rb proteins had stronger expressions in the liver at 6-24 h after operation. P27 expressions occurred at 24 h after operation, and were most marked at 1 wk after operation. RB protein also showed stronger expressions.

CONCLUSION: Liver regeneration is dependent on a multi-pathway mechanism.

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL. Changes of hepatocyte cell cycle after partial hepatectomy in cirrhotic rat liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1152-1155

摘要

目的: 本实验通过检测肝硬化大鼠肝部分切除术动物模型肝

组织内细胞周期蛋白(Cyclin)A、B和D的表达以及癌基因调节蛋白的变化, 研究 Cyclin 及其癌基因调节蛋白在肝细胞再生中的作用.

方法: 采用CCL₄制作大鼠肝硬模型, 切除大鼠肝脏的左叶和中叶. 采用免疫组化和原位杂交的方法, 观察大鼠肝脏 Cyclin A 和 Cyclin D 及相关因子变化.

结果: 术后肝细胞 Cyclin A 和 D mRNA 的表达和分布基本相似, 主要在胞质和胞核内. 在中央静脉等静脉血管的周围, 其阳性表达量高且表达出现时间早, 在术后 6 h 已有明显的表达出现. 在肝细胞再生过程中, Cyclin A 和 D mRNA 的表达明显, 呈局灶样分布. Cyclin B 和 Rb 蛋白主要分布在细胞核和胞质内, 在术后 6-24 h, Cyclin B 和 Rb 在肝细胞有较强的阳性表达. P27 的表达在术后 24 h 开始出现, 术后 1 wk 最显著, RB 蛋白也呈现较强的阳性表达.

结论: 肝细胞再生机制可能是通过多种途径共同作用的结果.

陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立. 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1152-1155

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1152.asp>

0 引言

肝硬状态下行肝部分切除术后肝细胞再生的机制, 目前尚不清楚^[1-3]. 虽经几十年的努力, 肝细胞再生是如何启动的, 又是如何中止的, 肝细胞再生过程主要受何种因素的影响等问题, 目前尚无很好的答案^[4,5]. 我们通过检测肝硬化大鼠肝部分切除术后肝组织内细胞周期蛋白(Cyclin)A、B和D的表达以及癌基因调节蛋白的变化, 研究 Cyclin 及其癌基因调节蛋白在肝细胞再生中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 P27 单克隆抗体(兔抗血清)由美国的 Sherr 教授赠送. Cyclin D cDNA 质粒: 由丹麦 Tygstrup 教授赠送. Cyclin A cDNA 质粒: 由法国 Patrizia Paterlini 教授赠送. Cyclin B 单克隆抗体(兔抗血清): 由美国 Ruderman 博士赠送. RB 单克隆抗体由北京中山生物技术有限公司提供.

1.2 方法 健康、♂ Wistar 大鼠, 质量 220-250 g, 皮下注射 CCL₄ 油溶液(600 ml/L)加口服乙醇的方法制作肝硬模型, 在动物稳定 1 wk 后进行实验^[6]. 肝部分切除采用乙醚麻醉, 腹部正中切口, 切除大鼠肝脏的左叶和中叶, 切除量占全肝的 70%. 手术后大鼠自由进食、饮水.

观察点为术后 6, 24, 48, 72 h 和术后 1 wk. Cyclin A 和 D 探针的质粒 DNA 的提取采用 Promega 公司提供的试剂盒进行. Cyclin A 用 EcoR I, Cyclin D 用 Not I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 电泳凝胶中回收 DNA 片段采用原平公司生产的 DNA 回收试剂盒, 按使用说明书进行. 于 254 nm 波长的紫外灯下观察电泳结果. Cyclin A 和 D 探针的标记, 采用 Boehringer 公司地高辛标记试剂盒, 参照其说明书进行. 原位杂交采用常规的方法进行^[7,8]. 从液氮罐内取出冻存的肝组织标本, 在冰冻切片机上切片, 切片厚度为 5 μ m. 采用福建迈新的免疫组化试剂盒和 DAB 染剂, 加入抗大鼠 Cyclin B, Rb 和 P27 一抗. 凡切片内见细胞或细胞核呈棕黄色颗粒或染色, 视为阳性.

2 结果

2.1 肝细胞 Cyclin A 和 D 的变化 我们应用原位杂交技术观察肝硬化大鼠肝部分切除术后肝细胞 Cyclin A 和 D mRNA 的表达和分布基本相似, 主要在细胞的胞质内, 特别在中央静脉等静脉血管的周围, 其阳性表达量高且表达出现时间早, 在术后 6h 已有明显的表达出现. 正常组肝细胞 Cyclin A 和 D mRNA 的表达较低, 阳性反应不明显(图 1-3).

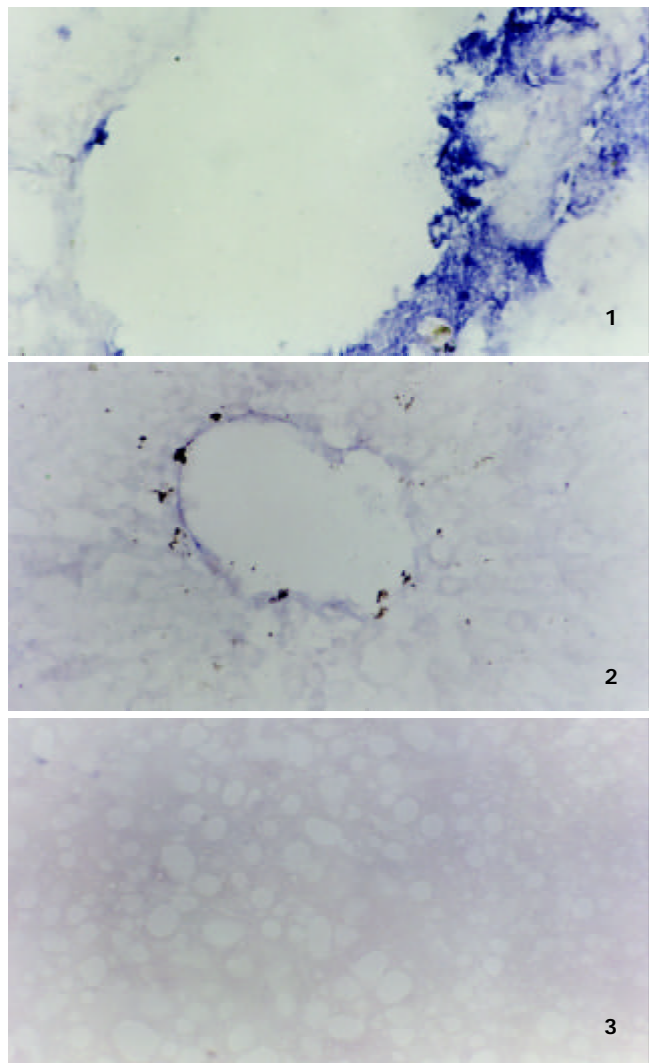


图 1 C-PH 组术后 6 h, cyclin D 在血管周围有明显表达. 原位杂交 $\times 200$.
图 2 C-PH 组术后 6 h, cyclin A 在血管周围有轻微表达. 原位杂交 $\times 200$.
图 3 原位杂交阴性对照 $\times 200$.

2.2 肝细胞 Cyclin B, Rb, P27 Cyclin B, Rb, P27 主要分布在细胞核和细胞质内, 在术后 6-24 h, Cyclin B 和 Rb 在肝细胞有较强的阳性表达. 而 RB 较强的阳性表达一致持续到术后 1 wk, 也就是说 RB 在肝细胞再生过程中一直都有较强的阳性表达. P27 的表达出现晚于前二者, 在术后 24h 点以后开始明显, 术后 1 wk 点最为显著. 在正常对照组, 肝细胞 Cyclin B, Rb, P27 未见阳性表达(图 4-6).

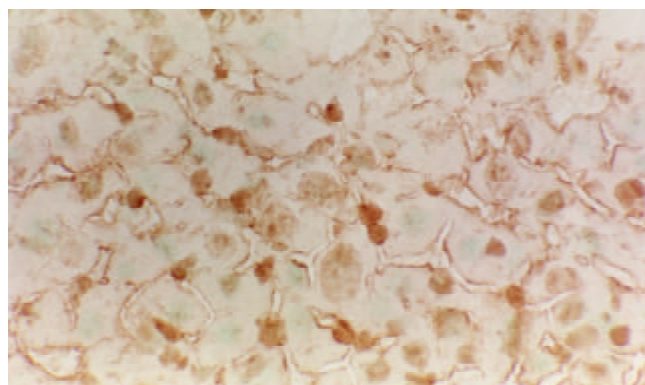


图 4 C-PH 组术后 48 h, cyclin B 在肝细胞表达明显. SP 染色, 甲基绿复染 $\times 400$.

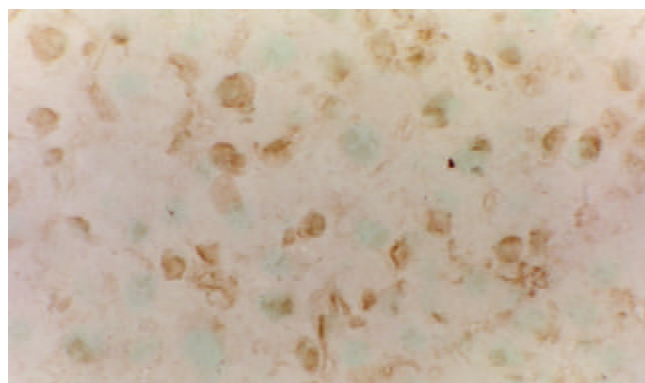


图 5 C-PH 组术后 1 wk, Rb 在肝细胞表达仍明显. SP 染色, 甲基绿复染 $\times 400$.

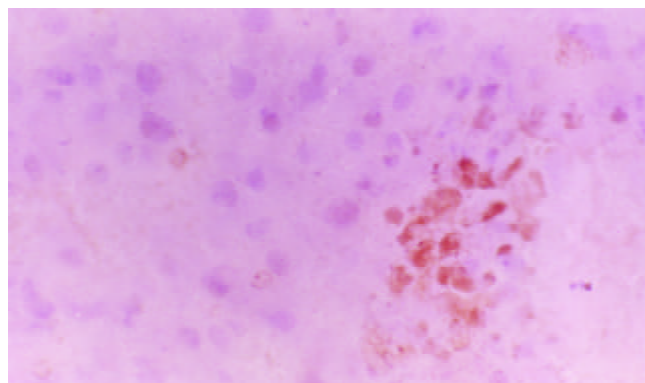


图 6 C-PH 组术后 24 h, P27 在肝细胞内开始出现表达. SP 染色, HE $\times 200$

3 讨论

生长激素、细胞因子和一些癌基因产物在细胞增生过程中发挥重要作用^[9-12]. 然而单纯应用细胞生长因子并不能很好促进肝细胞再生, 有时得到自相矛盾的结果^[13-15].

细胞再生有两个最关键的问题是 DNA 的复制和有丝分裂, 他们由 Cyclin 依赖激酶(CDKs)、Cyclin 调节亚基和 CDC-2 家族激酶控制^[16-19]. 在哺乳类动物的真核细胞中, Cyclin 有 5 种类型, 即 A、B、C、D 和 E 5 种类型. 他是细胞分裂周期基因的调节单位, 其含量在细胞的不同时期呈周期性的变化, 激活其相关蛋白激酶, 使之具有特定的蛋白激酶活性^[20]. G1 期是细胞分裂增生的关键时期. 在哺乳类动物的 G1 期, Cyclin (C, D 和 E) 表达的量 and 活性均为最大, 推动着 G1 期向 S 期发展, 而其中 Cyclin D 发挥着更为重要的作用^[21-23]. Cyclin A/B 分别在细胞周期的 S 后期和 M 期起作用, 推动细胞周期的进程^[24]. 在 70 % 的肝切除大鼠模型上, Cyclin D 的表达高于对照组 20 倍以上, 且先于 DNA 合成. 在 HGF 等细胞因子的刺激下, Cyclin D mRNA 的表达高于对照 3-5 倍. 细胞因子能刺激 Cyclin, 促使其发生变化, 因此 Sherr 也认为 Cyclin D 作为细胞因子的效应器^[25]. 我们结果显示, 术后肝细胞 Cyclin A 和 D mRNA 的表达和分布基本相似, 他们主要分布在细胞的胞质和胞核内. 在中央静脉等静脉血管的周围, 其阳性表达量高且表达出现时间早, 在术后 6 h 已有明显的表达出现. 在肝细胞再生过程中, 肝细胞 Cyclin A 和 D mRNA 的表达明显, 呈局灶样分布. 这些结果表明, Cyclin A 和 D 在肝细胞再生过程中发挥重要作用. 其肝细胞的增生很可能从中央静脉等静脉血管周围开始的. 我们同时观察了肝细胞 Cyclin B 和 Rb 蛋白, 主要分布在细胞核和细胞内, 在术后 6-24 h, Cyclin B 和 Rb 在肝细胞有较强的阳性表达. 而正常对照组 Cyclin B 和 Rb 蛋白肝细胞未见表达. 这些结果都提示 Cyclin B 和 Rb 蛋白参与肝细胞再生, 促进细胞周期的进程.

肝细胞再生中止具有相当的精确性, 行肝部分切除术后其肝细胞再生的中止均有其相似性^[26]. 当再生到术前肝脏重量的 10 % 的范围内时, 肝细胞生长就停止了, 这提示肝细胞内有一整套系统来管理肝细胞再生. 但目前对肝细胞再生中止的机制远未弄清. 阻止细胞周期进程的因素主要是 CKIs, 对哺乳类动物细胞起作用的是 P27、P21 和 P16^[27, 28]. P27、P21 和 P16 这 3 种 CKIs 阻止细胞周期进程的机制不一样, 其中最重要的是 P27, P27 的功能: 阻止 G1 期的进程; TGF- β 活化和细胞之间的接触抑制; P27 通过胞外信号的刺激, 如细胞因子 TGF- β 的刺激使 P27 活化. 当然细胞周期内在的变化也可活化 P27. TGF- β 能抑制肝细胞 DNA 的合成, 从而阻止肝细胞再生. 同时还发现 TGF- β 能活化 P27. 研究表明, 在肝细胞再生的后期(术后 72 h 点以后), TGF- β 出现较高表达, 在术后 1 wk 时, 其表达量仍然很高, 明显高于对照, 这样高表达的 TGF- β 完全有可能和有能力刺激 P27, 促使其活化. 我们免疫组化结果显示, P27 的表达出现较晚, 在术后 24 h 以后开始出现, 术后 1 wk 最为显著. 提示 P27 很可能是肝细胞再生中止的重要因素之一.

RB 蛋白是视网膜母细胞瘤蛋白抑制基因产物, 他的主要作用是中止细胞周期进程, 他能调控细胞周期关键点的基因表达^[29, 30]. 在细胞从 G1 期向 S 期转变时, 其表达水平非常高. Cyclin D 可使 RB 蛋白失活, 从而使细胞进入 S 期和进行 DNA 的复制. 也说明 Cyclin D 和 RB 的共同作用, 在细胞的增生和分化方面起重要的开关作用. 我们的结果显示, 肝硬变大鼠术后 1 wk 内肝细胞 RB 蛋白均呈现较强的阳性表达, 这支持以上的研究, 提示 RB 蛋白在肝细胞再生过程中起促进或抑制肝细胞增生的作用.

我们认为, 增生细胞在生长因子的刺激之下, 使 Cyclin D 和 A 在 G1 期适当的表达, 从而启动肝细胞再生. Cyclin D 同一些癌基因产物, 如 RB 等, 共同作用, 调节细胞周期的进程. 肝细胞通过 RB 蛋白的磷酸化和去磷酸化来影响 Cyclin 功能的活性, 同时肝细胞再生过程中, TGF- β 的高表达将促使肝细胞 P27 的活化, 抑制肝细胞再生. 因此肝细胞再生的中止的机制可能是通过多种途径共同作用的结果.

4 参考文献

- 1 Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):19-31
- 2 Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002;89:1089-1095
- 3 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66
- 4 Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroentero* 2001;48:556-562
- 5 Tilg H. Cytokines and liver diseases. *Can J Gastroenterol* 2001; 15:661-668
- 6 陈平, 李昆, 董家鸿. 肝硬变大鼠肝部分切除术动物模型的制作及评价. 第三军医大学学报 2002;24:488-490
- 7 蔡文琴. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 第 1 版. 成都: 四川科学技术出版社, 1994:406-432
- 8 J. 萨姆布鲁克, EF. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996:362-371
- 9 Diehl AM. Liver regeneration. *Front Biosci* 2002;7:301-314
- 10 Moriuchi A, Hirono S, Ido A, Ochiai T, Nakama T, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Additive and inhibitory effects of simultaneous treatment with growth factors on DNA synthesis through MAPK pathway and G1 cyclins in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:368-373
- 11 Trautwein C, Rakemann T, Malek NP, Plumpe J, Tiegs G, Manns MP. Concanavalin A-induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1998;101:1960-1969
- 12 Leu JI, Crissey MA, Craig LE, Taub R. Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP beta and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. *Mol Cell Biol* 2003; 23:1251-1259
- 13 Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaize D, Zanninelli G, Bilodeau M, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G. The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol* 1999;19: 6003-6011
- 14 Weglarz TC, Sandgren EP. Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12595-12600
- 15 Drixler TA, Vogten MJ, Ritchie ED, van Vroonhoven TJ, Gebbink MF, Voest EE, Borel Rinkes IH. Liver regeneration is an angiogenesis-associated phenomenon. *Ann Surg* 2002;236:703-711

- 16 Albrecht JH, Rieland BM, Nelsen CJ, Ahonen CL. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the liver: role of nuclear localization and p27 sequestration. *Am J Physiol* 1999;277(6 Pt 1): G1207-1216
- 17 Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13: 1501-1512
- 18 Jaumot M, Estanyol JM, Serratos J, Agell N, Bachs O. Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes. *Hepatology* 1999;29:385-395
- 19 Wang X, Kiyokawa H, Dennewitz MB, Costa RH. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16881-16886
- 20 Nelsen CJ, Hansen LK, Rickheim DG, Chen C, Stanley MW, Krek W, Albrecht JH. Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and skp2. *Oncogene* 2001;20:1825-1831
- 21 Rickheim DG, Nelsen CJ, Fassett JT, Timchenko NA, Hansen LK, Albrecht JH. Differential regulation of cyclins D1 and D3 in hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2002;36:30-38
- 22 Nelsen CJ, Rickheim DG, Timchenko NA, Stanley MW, Albrecht JH. Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo. *Cancer Res* 2001;61:8564-8568
- 23 Hansen LK, Albrecht JH. Regulation of the hepatocyte cell cycle by type I collagen matrix: role of cyclin D1. *J Cell Sci* 1999;112(Pt 17):2971-2981
- 24 Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, Taub R. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 1998;102:996-1007
- 25 Sherr CJ. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 2000-2001; 96:73-92
- 26 Nagy P, Bisgaard HC, Schnur J, Thorgeirsson SS. Studies on hepatic gene expression in different liver regenerative models. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:591-595
- 27 Albrecht JH, Poon RY, Ahonen CL, Rieland BM, Deng C, Crary GS. Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene* 1998;16:2141-2150
- 28 Morita T, Togo S, Kubota T, Kamimukai N, Nishizuka I, Kobayashi T, Ichikawa Y, Ishikawa T, Takahashi S, Matsuo K, Tomaru Y, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Shimada H. Mechanism of postoperative liver failure after excessive hepatectomy investigated using a cDNA microarray. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:352-359
- 29 Deguchi M, Shiraki K, Inoue H, Okano H, Ito T, Yamanaka T, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Furusaka A, Hisatomi H, Nakano T. Expression of survivin during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:59-64
- 30 Qu Z, Weiss JN, MacLellan WR. Regulation of the mammalian cell cycle: a model of the G1-to-S transition. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C349-364

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

• 消 息 •

世界胃肠病学杂志英文版获得 2003 - 2004 年 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*)申报的2002年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目,经专家评审,国家自然科学基金委员会委会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801).资助期限2年,2003 - 2004年,资助强度每年8万元。

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊,分别为天体物理学报(英),计算数学(英),理论物理通讯(英)中国物理快报(英),力学学报(英),分析化学,高等学校化学学报,化学学报,化学通报,中国化学工程学报(英),世界胃肠病学杂志(英),作物学报,中国农业科学,中国中西医结合杂志,中国药理学报(英),生物化学与生物物理学报,细胞研究(英),植物学报(英),大气科学进展(英),地球物理学报,地质学报(英),金属学报,稀土学报(英),材料科学技术(英),稀有金属材料与工程,电力系统自动化,计算机科学技术学报(英),管理科学学报,中国科学(中、英),科学通报(中、英)。

(世界胃肠病学杂志社2002-10-18)

苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝窦内皮细胞损伤的影响

仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛

仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008
仇毓东, 男, 1967-05-10 生, 江苏人, 汉族, 2000-07 第二军医大学博士研究生毕业, 副主任医师, 副教授, 主要从事肝脏移植及原发性肝癌的临床和基础研究。
江苏省中医药管理局资助项目, No. SZ 9902
项目负责人: 仇毓东, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. yudongqiu510@hotmail.com
电话: 025-3304616-11601 传真: 025-3317016
收稿日期: 2002-12-10 接受日期: 2003-01-08

Protective effect of matrine on sinusoidal endothelial cells of rat liver isograft

Yu-Dong Qiu, Xin-Hua Zhu, Ming-Ke Shi, Yi-Tao Ding

Yu-Dong Qiu, Xin-Hua Zhu, Ming-Ke Shi, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China.
Supported by the Traditional Chinese Medicine Administration Bureau of Jiangsu Province, No. SZ 9902
Correspondence to: Dr. Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@hotmail.com
Received: 2002-12-10 Accepted: 2003-01-08

Abstract

AIM: To investigate the protection effect of matrine on cold ischemia and reperfusion injury of sinusoidal endothelial cells (SEC) of liver isograft.

METHODS: Two hundred and twenty-four SD rats were randomly divided into four groups: untreated group, low-dose treated group, high-dose treated group and sham operation group. After 5 hours of cold preservation with Ringer's solution, orthotopic liver transplantation was performed. At 1 h, 2 h and 4 h time-points after reperfusion, 6 rats were killed in each group to collect the serum sample and the middle lobe of liver for detection, and the other 8 rats were raised to study the one week survival rate post-transplantation.

RESULTS: All recipients in control group died within 48 hours, mostly between 10 to 20 hours, and matrine treatment increased one week survival rate to 75 % in both treated groups. The level of Hyaluronic Acid (HA) and glutamate pyruvate transaminase (ALT) decreased significantly with matrine treatment. And the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) decreased significantly in both treated groups, and the pathological changes of SEC ameliorated.

CONCLUSION: Matrine can prevent SEC from cold ischemia and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation.

Qiu YD, Zhu XH, Shi MK, Ding YT. Protective effect of matrine on sinusoidal endothelial cells of rat liver isograft. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1156-1159

摘要

目的: 探讨苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝窦内皮细胞损伤的保护作用及其机制

方法: 本实验采用大鼠原位肝移植模型, 供肝保存 5 h, 224 只大鼠随机分为对照组、小剂量治疗组、大剂量治疗组和假手术组, 分别检测移植术后 1、2、4 h 血透明质酸(hyaluronic acid, HA)及肝组织细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的含量, 并观察肝血窦内皮细胞形态学、肝功能及各组大鼠术后 1 wk 生存率的改变。

结果: 与对照组比较, 两治疗组术后各时点的透明质酸和细胞间黏附分子-1 表达均显著降低, 肝血窦内皮细胞形态也发生改善, 且两治疗组大鼠术后肝功能和 1 wk 生存率显著提高, 而两治疗组间各指标比较均无显著差异。

结论: 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝血窦内皮细胞损伤具有保护作用。

仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛. 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝血窦内皮细胞损伤的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1156-1159

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1156.asp>

0 引言

移植肝脏冷保存再灌注损伤与原发移植肝无功能密切相关^[1], 但其具体作用机制尚未明确, 仍是当前临床肝移植工作中亟待解决的难题. 冷保存再灌注损伤可以导致肝窦内皮细胞变圆、脱落至肝窦腔内^[2], 研究结果表明肝窦内皮细胞损伤程度与移植肝功能有关^[3]. 目前, 人们普遍认为由氧自由基^[4]、枯否细胞激活^[5]或肝窦内炎性细胞聚集^[6]所介导的肝窦内皮细胞损伤和/或肝窦微循环障碍^[7]是冷保存相关的移植肝功能丧失的主要原因。

苦参碱为中药苦参提取的有效成分, 其基本结构为苦参次碱-15 酮, 具有抗炎抗氧化^[8]、免疫抑制^[9]、保肝^[10]等作用, 临床已广泛用于慢性肝病的治疗. 药理学研究尚未发现苦参碱有明显的毒副作用^[11]. 苦参碱能显著抑制枯否氏细胞激活, 降低血中肿瘤坏死因子和白介素-6 水平^[8], 这就表明苦参碱有可能对移植肝脏再灌注损伤有保护作用. 因此, 本实验采用大鼠原位肝移植模型, 研究苦参碱对供肝冷保存再灌注中肝窦内皮细胞损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂健康SD大鼠224只(购自南京军区总医院动物中心), 质量200-220 g, 随机分为对照组、小剂量治疗组、大剂量治疗组和假手术组。各组有大鼠32对(只)。大鼠原位肝移植模型参照改良Kamada法^[12]进行。各组供肝取出后均置于4℃林格氏液中保存5 h再植入受体。受体门静脉阻断时间不超过20 min。小剂量治疗组受体术前30 min腹腔注射苦参碱(购自广州明兴制药厂) 40 mg/kg; 大剂量治疗组术前30 min腹腔注射苦参碱80 mg/kg; 对照组同法注入生理盐水1 mL; 假手术组方法同肝移植受体的肝脏游离, 只是不作肝切除, 目的是进行正常对照, 以排除手术因素或肝动脉结扎对实验的影响。各组大鼠于再灌注后1、2、4和24 h分别取6只经下腔静脉取血4 mL, 离心(4℃, 3 000 r/min) 10 min后, 取上清置于-70℃冰箱保存待测。同时分别取肝中叶组织适量快速置于液氮中保存待测。

1.2 方法 各组分别取8只受体大鼠进行饲养, 观察1 wk存活率。取各组大鼠再灌注后4和24 h血清, 采用全自动生化分析仪测定谷丙转氨酶(ALT)。取各组大鼠再灌注后1、2和4 h血清, 采用透明质酸放射免疫分析测定盒(购于上海海洋医学生物技术中心)测定血清透明质酸(HA)浓度。再灌注后1 h、2 h和4 h分别处死大鼠后取肝中叶组织, OCT胶包埋后, 液氮冻存。冰冻切片4-8 μm, 室温放置30 min后, 入4℃丙酮固定10 min, PBS洗, 5 min × 3次, 30 mL/L过氧化氢孵育6 min后, PBS洗, 5 min × 2次, 下接常规免疫组化染色操作步骤。一抗采用Mouse-anti-rat CD54 (ICAM-1)单克隆抗体, MCA773 (购自英国Serotec公司), 稀释度为1:50。检测肝组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达。再灌注后4 h处死大鼠, 各取前叶肝组织经中性甲醛固定、石蜡包埋后切成4 μm薄片, HE染色, 光镜下观察肝脏组织的病理形态学变化。再灌注后4 h处死大鼠, 各取前叶1-2 mm见方肝组织放入4℃ 20 g/L戊二醛液中固定, 经锇酸后固定, 乙醇脱水, 环氧树脂Epon 618包埋, 用AO-E型超薄切片机超薄切片, 铅铀双染, 在JEM-1200EX型透射电镜下观察。

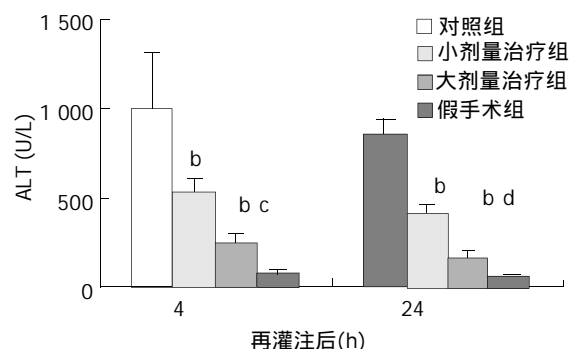
统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SAS软件方差分析snk(student-newman-keuls)法进行统计分析。

2 结果

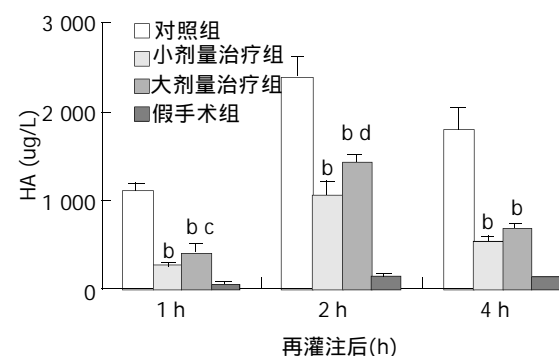
大鼠原位肝移植手术成功率约为95%, 但对照组8只大鼠都于术后48 h内死亡, 而两苦参碱治疗组大鼠术后的1 wk存活率均达到75%。与假手术组比较, 治疗组和对照组移植术后ALT值均升高。两治疗组术后4和24 h的ALT值均显著低于对照组($P < 0.01$, 图1), 且两治疗组间术后4和24 h的ALT值也有显著差异(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。

2.1 血清透明质酸 与假手术组比较, 治疗组和对照组移植术后各时间点HA值均升高, 且术后HA的高峰均

出现在术后2 h。两治疗组术后各时间点HA值均显著低于对照组($P < 0.01$, 图2), 且两治疗组间术后各时间点HA值也有显著差异(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。



^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, vs 小剂量治疗组
图1 大鼠原位肝移植术后血清ALT水平。



^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, vs 小剂量治疗组
图2 大鼠原位肝移植术后血清HA水平。

2.2 肝组织ICAM-1的表达 对照组术后1 h即可在肝窦内皮细胞表面、部分肝细胞及肝血窦内出现ICAM-1的表达, 至术后2和4 h更可见ICAM-1的强表达(图3)。两治疗组术后各时间点也出现了ICAM-1的表达, 但其表达均明显减弱, 且两组间表达程度未见明显差异(图4)。

2.3 肝组织病理学改变 与假手术组比较, 对照组和治疗组均可见肝血窦腔内淤血及炎性细胞浸润, 但对照组最严重, 两治疗组明显减轻; 对照组和治疗组均可见变圆、脱落至肝血窦腔内的内皮细胞, 其中对照组明显多于两治疗组(图5)。两治疗组肝窦内皮细胞形态学改变无明显差异(图6)。

2.4 肝血窦超微结构观察 假手术组大多数SEC形态和结构基本正常, 未见明显肿胀及凋亡细胞。对照组SEC明显肿胀, 核膜不规整, 可见核固缩、聚集、着边的凋亡SEC, 线粒体水肿、部分空泡化, 粗面内质网扩张, 可见髓鞘样结构。包膜部分断裂, 失去胞突, 内皮细胞向血窦腔内突出, 并可脱落入肝血窦腔内。血窦腔内可见大量中性粒细胞、淋巴细胞等浸润(图7)。小剂量治疗组SEC核膜稍显不规整, 伸展部变薄, 但覆盖完整。内皮细胞轻度水肿, 溶酶体增多, 粗面内质网无扩张, 吞饮小泡丰富, SEC损伤明显减轻。血窦腔内细胞浸润的程度和范围也明显轻于对照组(图8)。大剂量治疗组SEC损伤仍存在, 其超微结构改变与小剂量治疗组类似。

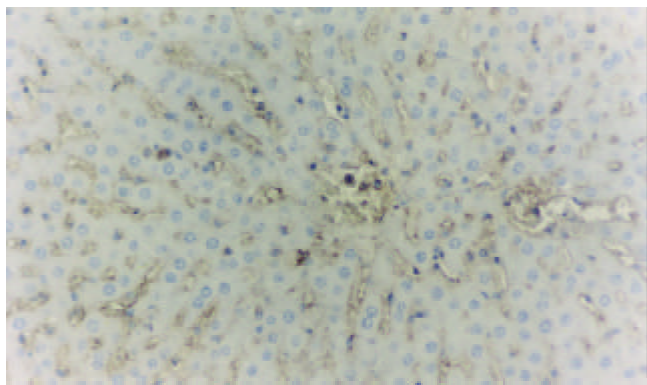


图3 对照组大鼠术后2 h SEC表面、部分肝细胞和肝血窦内出现ICAM-1强表达 $\times 200$.

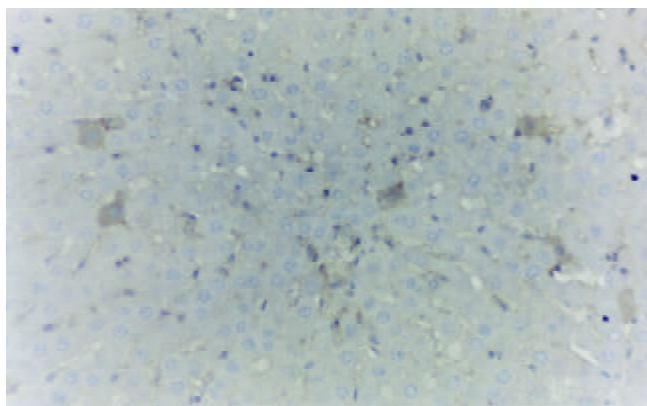


图4 小剂量苦参碱治疗组大鼠术后2 h ICAM-1表达明显减弱 $\times 200$.

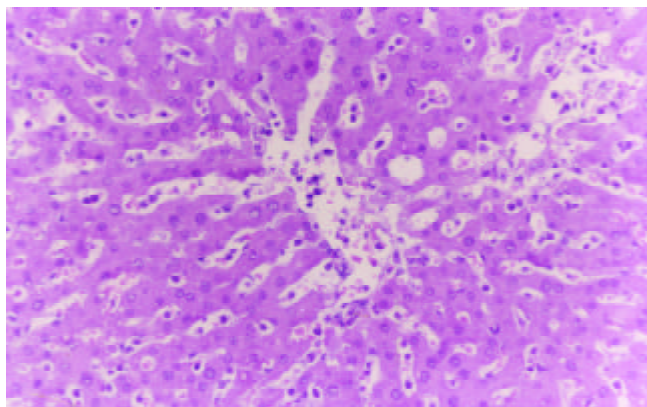


图5 对照组大鼠术后4 h肝窦内淤血、炎性细胞浸润及SEC肿胀脱落 HE $\times 200$.

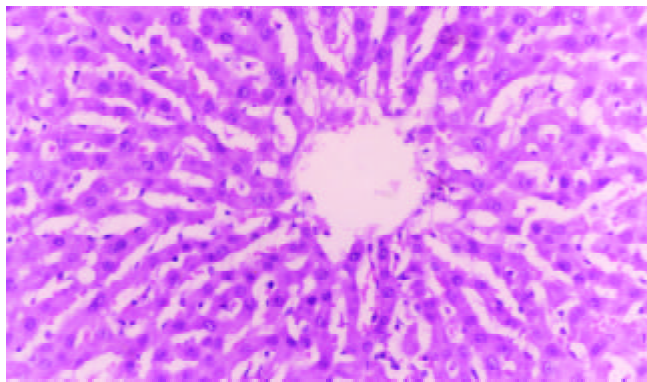


图6 小剂量苦参碱治疗组大鼠术后4 h SEC基本恢复正常 HE $\times 200$.

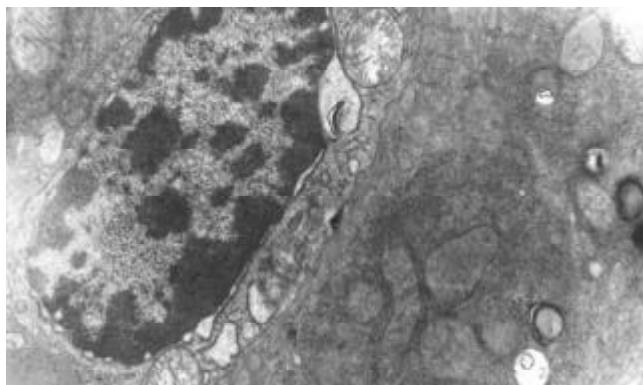


图7 对照组大鼠术后4 h SEC EM $\times 12\,000$.

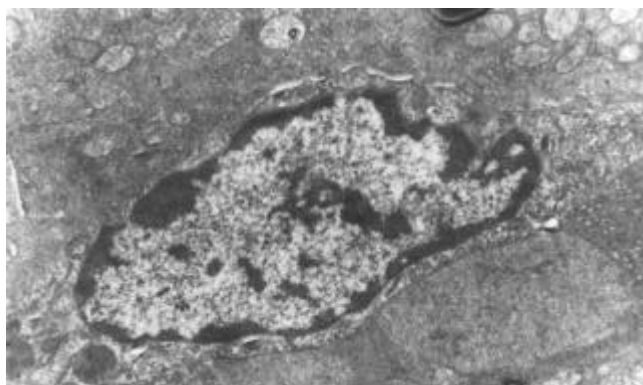


图8 小剂量苦参碱治疗组大鼠术后4 h EM $\times 6\,000$.

3 讨论

有关肝移植冷缺血再灌注损伤机制的研究很多, 其中微循环再灌注障碍日益受到重视. 其发生的主要原因有: (1)肝血窦内皮细胞对冷热缺血均比肝细胞敏感, 早期即可能出现不可逆损伤, 同样, 在再灌注期内皮细胞比肝细胞早发生致死性损伤, 再灌注后内皮细胞出现肿胀、死亡及脱落, 阻塞血窦^[13]; (2)再灌注后粒细胞黏附、聚积及毒性作用^[14]; (3)血小板激活因子大量生成^[15], 内皮细胞脱落后其下组织暴露引起血小板黏附, 血管内凝血, 产生血栓; (4)内皮素大量生成^[16], 而NO产生减少, 使SEC收缩, 循环阻力增加. 本实验结果提示, 肝血窦内皮细胞损伤及顺应性改变可致肝血窦阻塞, 再灌注障碍, 从而使肝组织细胞仍处于缺血状态, 损伤进一步加重发展. 因此, 在肝移植缺血再灌注损伤过程中, 保护内皮细胞和保护肝细胞同样重要, 这对于防止移植肝脏微循环障碍, 术后发生“无复流”等现象, 最终导致原发性移植肝无功能具有重要临床意义. 由于供肝保存在4℃林格液中的安全时限为2-4 h^[17], 为探讨苦参碱对肝窦内皮细胞冷缺血再灌注损伤是否有保护作用, 我们在实验中采用将供肝于移植术前置于4℃平衡液中保存5 h, 再移植入受体的大鼠原位肝移植模型. 实验结果表明苦参碱对移植肝脏有明显的保护作用, 能显著的改善大鼠肝功能和移植术后1 wk存活率.

SEC上有HA特异性的受体, 可通过胞吞方式摄取和降解HA. 故当SEC损伤时, 其对内源性HA摄取量

降低, 血清 HA 浓度也就相应上升. 实验结果表明两苦参碱治疗组术后各时间点的 HA 浓度都显著低于对照组, 但是增加苦参碱剂量并不能增强其对 SEC 的保护作用, 这与张俊平 et al^[18]的研究结果一致. 苦参碱对移植肝脏保存再灌注损伤的保护作用机制目前尚未明确. 最近移植肝脏微循环再灌注障碍日益受到重视. 肝脏缺血再灌注后, 枯否细胞激活并且释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α 等炎症因子^[19], 从而激活 SEC 和肝细胞在其细胞表面表达 ICAM-1 及释放粒细胞激活因子(例如白介素-1和血小板活化因子等), 从而诱导中性粒细胞表面产生淋巴细胞功能相关性抗原(lymphocyte-function-associated antigen-1, LFA-1)^[20]. 这样, 中性粒细胞通过与 ICAM-1 及白细胞激活因子的黏附, 在肝窦腔内形成聚集, 导致相应部位的微循环障碍. 本实验结果表明苦参碱能显著降低肝窦内皮细胞表面 ICAM-1 的表达和炎症细胞在肝窦腔内的聚集, 从而减轻再灌注导致的微循环障碍. 此外, 多项研究均表明苦参碱能有效抑制枯否细胞激活及释放 TNF- α 、白介素-1(interleukin-1, IL-1)和白介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎症因子^[18, 21].

苦参碱可以通过抑制枯否细胞激活及 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症性细胞因子的释放, 减少粒细胞与 SEC 的黏附, 从而减轻 SEC 的损伤, 改善移植肝脏微循环. 苦参碱作为药物的单体成分, 其化学结构、药代动力学、药效学及药理作用机制明确, 副作用很小, 并已制备出多种剂型供临床选用, 临床应用前景较广泛.

4 参考文献

- Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996;25:774-780
- Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998;28:281-285
- Schon MR, Kollmar O, Akkoc N, Matthes M, Wolf S, Schrem H, Tominaga M, Keech G, Neuhaus P. Cold ischemia affects sinusoidal endothelial cells while warm ischemia affects hepatocytes in liver transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30: 2318-2320
- Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG. Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat-an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 1992;54:199-204
- Brass CA, Roberts TG. Hepatic free radical production after cold storage: Kupffer cell-dependent and -independent mechanisms in rats. *Gastroenterology* 1995;108:167-1175
- Clavien PA, Harvey PR, Sanabria JR, Cywes R, Levy GA, Strasberg SM. Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver: mechanisms and effects. *Hepatology* 1993;17:131-142
- Imamura H, Brault A, Huet PM. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* 1997;25:664-671
- Lin W, Zhang JP, Hu ZL, Qian DH. Inhibitory effect of matrine on lipopolysacchride-induced tumor necrosis factor and interleukin-6 production from rat Kupffer cells. *Yaoxue Xuebao* 1997;32:93-96
- Liang P, Bo AH, Xue GP, Han R, Li HF, Xu YL. Study on the mechanism of matrine on immune liver injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:104-108
- Zhang JP, Zhang M, Zhou JP, Liu FT, Zhou B, Xiu WF, Guo C. Antifibrotic effects of matrine on in vitro and in vivo models of liver fibrosis in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22:183-186
- 叶明. 苦参碱注射液的药理研究. *广东医学* 1997;18:793
- 严以群, 杨甲梅, 王轩. 大鼠减体积性肝移植模型. *中华器官移植杂志* 1996;17:55-58
- Arai S, Mochida S, Ohno A, Ishikawa K, Matsui A, Arai M, Shibuya M, Fujiwara K. Decreased expression of receptors for vascular endothelial growth factor and sinusoidal endothelial cell damage in cold-preserved rat livers. *Transplant Proc* 1999; 31:2668-2672
- Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomis S. Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology* 1997; 26:113-120
- Cywes R, Mullen BJ, Stratis MA, Greig PD, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM. Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. *Transplantation* 1993;56:316-323
- Ishikawa T, Yamamoto Y, Takeuchi K. Relationship between peri and postoperative plasma concentration of endothelin-1 and liver dysfunction in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 1995;26:524-527
- Sumimoto R, Jamieson NV, Wake K, Kamada N. 24-hour rat liver preservation using UW solution and some simplified variants. *Transplantation* 1989;48:144-146
- Zhang JP, Lin W, Hu ZL, Qian DH. Inhibitory effect of matrine on lipopolysacchride-induced tumor necrosis factor and interleukin-6 production from rat Kupffer cells. *Acta Pharm Sin* 1997;32:93-96
- Carrick JB, Martins O Jr, Snider CC, Means ND, Enderson BL, Frame SB, Morris SA, Karlstad MD. The effect of LPS on cytokine synthesis and lung neutrophil influx after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Surg Res* 1997;68:16-23
- Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Shito M, Kawachi S, Kitajima M. Interleukin-1 receptor blockade attenuates oxygen-derived free radical production and microcirculatory disturbances in ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transplantation* 1997;63:143-148
- Hu ZL, Zhang JP, Wan MB, Yu XB, Lin W, Qian DH. Effect of matrine on mouse hepatitis and tumor necrosis factor production induced by propionibacterium acnes/lipopolysaccharides. *Acta Pharm Sin* 1996;31:662-665

犬肝动脉输注阿霉素联合血液灌流的研究

张志友, 张文怡, 钱绍诚

张志友, 天津医科大学内分泌研究所 天津市 300070
张文怡, 天津医科大学药理教研室 天津市 300070
钱绍诚, 天津市第三中心医院消化科 天津市 300170
张志友, 男, 1971-05-20 生, 天津市人, 汉族, 1994 年天津医科大学本科毕业, 1997 年天津医科大学硕士研究生毕业 助教 博士生 发表论文 4 篇.
天津市卫生局科技基金资助课题, No.95KY-GG7
项目负责人: 钱绍诚, 300170, 天津市河东区大桥道 78 号, 天津市第三中心医院消化科. zhangzhiyou@yahoo.com
电话: 022-24315150
收稿日期: 2000-03-14 接受日期: 2002-11-06

Hepatic artery infusion of adriamycin combined with hemoperfusion in dogs

Zhi-You Zhang, Wen-Yi Zhang, Shao-Chen Qian

Zhi-You Zhang, Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Wen-Yi Zhang, Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Shao-Chen Qian, Department of Gastroenterology, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Supported by the Fund of the Health Bureau of Tianjin, No.95KY-GG7
Correspondence to: Dr.Zhi-You Zhang, Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, 22 Qixiangtai Road, Heping District, Tianjin 300070, China. zhangzhiyou@yahoo.com
Received: 2000-03-14 Accepted: 2002-11-06

Abstract

AIM: To observe the concentration of circulating ADM and its side effects by hepatic artery infusion of Adriamycin (ADM) combined with hemoperfusion (HP).

METHODS: ADM was infused through the dogs' hepatic artery. At the same time, the femoral artery and femoral vein catheters were inserted and HP(NK-107 resin (HPI) and Japanese activated charcoal(HP II) as adsorbents) was performed. The concentration of circulating blood ADM was determined and blood routine, myocardial enzymes, liver and kidney function were observed.

RESULTS: The plasma concentration of ADM at 1 h, 2 h; 3 d and 14 d in HP I, II groups (89 ± 9 , 60 ± 15 , 21 ± 5 , 10 ± 2 ; 99 ± 14 , 61 ± 13 , 26 ± 5 , 12 ± 2 mg·L⁻¹) were decreased apparently as compared with the control group (312 ± 23 , 237 ± 12 , 116 ± 15 , 58 ± 8 mg·L⁻¹) ($P < 0.01$). After HP 24 h (0.9 ± 0.4 , 11.9 ± 6.4 , 1.0 ± 0.3 ; 1.1 ± 0.3 , 4.3 ± 3.7 , 1.9 ± 0.6 μkat·L⁻¹) and 72 h (0.9 ± 0.4 , 8.2 ± 4.5 , 0.8 ± 0.3 ; 1.1 ± 0.1 , 2.6 ± 2.3 , 2.7 ± 2.3 μkat·L⁻¹), myocardial enzymes (LDH, CPK-MB, α-HBDH) had no change ($P > 0.05$). But in control group, after HP 24 h (1.6 ± 0.2 , 23.9 ± 12.9 , 2.7 ± 0.3 μkat·L⁻¹), they began to increase ($P < 0.05$) and increased markedly after 72 h (3.1 ± 0.1 , 33.7 ± 10.4 , 8.5 ± 0.3 μkat·L⁻¹) ($P < 0.01$) as compared with before HP (0.8 ± 0.1 , 11.1 ± 10.7 , 1.4 ± 0.1 μkat·L⁻¹). Before and after HP, the peripheral WBC, RBC, Hb and Pt at 3, 7 and 14 d had no significant change ($P > 0.05$). But in the control group WBC, Pt, RBC and Hb were lower than before ($16.3 \pm 4.2 \times 10^9/L$, $131 \pm 38 \times 10^9/L$,

$5.9 \pm 1.6 \times 10^{12}/L$, 131 ± 28 g/L) at 7 d ($8.5 \pm 5.4 \times 10^9/L$, $77 \pm 35 \times 10^9/L$, $4.8 \pm 1.2 \times 10^{12}/L$, 94 ± 27 g/L) ($P < 0.05$) and much lower than before at 14 d ($6.2 \pm 4.4 \times 10^9/L$, $69 \pm 39 \times 10^9/L$, $5.2 \pm 1.6 \times 10^{12}/L$, 109 ± 28 g/L) ($P < 0.01$). Before and after HP, no obvious changes were found in liver function (ALT, AST and TBil) and kidney function (BUN and Cr) ($P > 0.05$).

CONCLUSION: ADM hepatic artery infusion combined with HP, using NK-107 resin and Japanese activated charcoal as adsorbents, can decrease the concentration of circulating blood ADM and its side effects.

Zhang ZY, Zhang WY, Qian SC. Hepatic artery infusion of adriamycin combined with hemoperfusion in dogs. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1160-1163

摘要

目的: 采用阿霉素肝动脉输注与血液灌流二者联合应用, 以 NK107 树脂, 日本活性炭作为黏附剂, 观察杂种犬外周循环血液中阿霉素浓度及其副作用.

方法: 采用杂种犬肝动脉输注阿霉素, 同时杂种犬股动、静脉插管以 NK107 树脂 (灌流组 I), 日本活性炭 (灌流组 II) 作为黏附剂进行血液灌流, 测定血中阿霉素浓度, 观察外周血象、心肌酶、肝、肾功能.

结果: 灌流组 I, II 在灌流 1 h, 2 h; 3 d, 14 d 血浆阿霉素浓度 (89 ± 9 , 60 ± 15 , 21 ± 5 , 10 ± 2 ; 99 ± 14 , 61 ± 13 , 26 ± 5 , 12 ± 2 mg·L⁻¹) 明显低于对照组 (312 ± 23 , 237 ± 12 , 116 ± 15 , 58 ± 8 mg·L⁻¹) ($P < 0.01$) 时; 心肌酶 (LDH, CPK-MB, α-HBDH) 在灌流 24 h (0.9 ± 0.4 , 11.9 ± 6.4 , 1.0 ± 0.3 ; 1.1 ± 0.3 , 4.3 ± 3.7 , 1.9 ± 0.6 μkat·L⁻¹), 72 h (0.9 ± 0.4 , 8.2 ± 4.5 , 0.8 ± 0.3 ; 1.1 ± 0.1 , 2.6 ± 2.3 , 2.7 ± 2.3 μkat·L⁻¹) 无显著性变化 ($P > 0.05$), 而对照组 24 h (1.6 ± 0.2 , 23.9 ± 12.9 , 2.7 ± 0.3 μkat·L⁻¹) 后高于灌流前 ($P < 0.05$), 72 h (3.1 ± 0.1 , 33.7 ± 10.4 , 8.5 ± 0.3 μkat·L⁻¹) 后明显高于灌流前 (0.8 ± 0.1 , 11.1 ± 10.7 , 1.4 ± 0.1 μkat·L⁻¹) ($P < 0.01$). 外周血白细胞 (WBC), 血小板 (Pt), 红细胞 (RBC), 血红蛋白 (Hb) 灌流后 3, 7, 14 d 灌流组无明显变化 ($P > 0.05$), 而对照组在第 7 天 ($8.5 \pm 5.4 \times 10^9/L$, $77 \pm 35 \times 10^9/L$, $4.8 \pm 1.2 \times 10^{12}/L$, 94 ± 27 g/L) 低于灌流前 ($16.3 \pm 4.2 \times 10^9/L$, $131 \pm 38 \times 10^9/L$, $5.9 \pm 1.6 \times 10^{12}/L$, 131 ± 28 g/L) ($P < 0.05$), 14 d ($6.2 \pm 4.4 \times 10^9/L$, $69 \pm 39 \times 10^9/L$, $5.2 \pm 1.6 \times 10^{12}/L$, 109 ± 28 g/L) 明显低于灌流前 ($P < 0.01$). 肝、肾功能在灌流前, 灌流后无显著变化 ($P > 0.05$).

结论: 以 NK107 树脂, 日本活性炭作为黏附剂, 肝动脉输注阿霉素与血液灌流二者联合应用能够减低外周血阿霉素浓度, 降低其副作用。

张志友, 张文怡, 钱绍诚. 犬肝动脉输注阿霉素联合血液灌流的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1160-1163

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1160.asp>

0 引言

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 国内患者 90 % 以上为晚期^[1]. 在晚期肝癌治疗中, 以介入疗法效果最好, 最常用^[2-18], 但为了提高抗癌疗效需要加大局部抗癌药物用量, 随之而来也会带来更大的副作用, 尤其是骨髓抑制^[19, 20]. 为达到使肝中药物浓度较高以更好的抑制或杀伤肿瘤细胞, 而同时减低外周药物浓度, 以达到减少外周药物副作用的目的, 需对溢出肝外的抗肿瘤药物予以清除. 血液灌流技术作为一种清除血中药物的方法已在临床应用, 但用于清除抗肿瘤药物的报道较少. 目前我们已在体外实验证实 NK107 树脂和日本活性炭两种黏附剂对阿霉素的黏附效果较好^[21], 为进一步深入研究我们以杂种犬为实验动物, 采用阿霉素肝动脉输注与血液灌流联合应用, 观察阿霉素血药浓度及其副作用以期临床治疗肝癌提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 杂种犬 9 只, 雌雄兼用 (天津市肝胆疾病研究所提供), 体重(14 ± 2) kg, 根据黏附剂的种类随机分成 3 组. 盐酸阿霉素标准品(浙江海门制药有限公司), 盐酸阿霉素(明治医药有限公司), 柔红霉素(意大利爱宝大药厂), 盐酸氯胺酮注射液(上海新冈制药厂), 复方泛影葡胺注射液(上海淮海制药厂), 肝素钠(天津市生物化学制药厂), 色谱纯甲醇(天津四友公司), 50 g/L 火棉胶, 冰醋酸, 无水醋酸钠(天津市化学试剂二厂) Beckman332 型高效液相色谱仪(美国 Beckman 公司), 色谱柱 μ Bondapak C18 (200 × 4 mm) (大连伊利特科学仪器有限公司), F-800 型血细胞计数仪(日本东亚公司), Cobasmira 自动生化分析仪(瑞典 Cobas 公司), X- 线机 (800MA) (日本岛津公司), 犬股动脉、股静脉插管、球囊导管及灌流管路(上海医疗诊断仪器厂), NK-107 树脂(南开大学提供), 日本活性炭(天津市肝胆疾病研究所提供)。

1.2 方法

1.2.1 血浆阿霉素的测定^[21, 22] 色谱条件 流动相: 甲醇: 0.01 mol·L⁻¹ 醋酸钠溶液: 冰醋酸 (体积比 70 : 30 : 1) 混合液 pH:8.6, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 灵敏度 0.1 Auts, 纸速 0.25 cm·min⁻¹, 室温. 取血浆 1.0 mL 加入内标液 (柔红霉素水溶液 200 mg·L⁻¹) 20 μ L, 加入氯仿: 甲醇(体积比 4 : 1)混合液 5.0 mL, 在液体快速混合器上震荡 5 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取全部氯仿层, 37 °C 氮气吹干, 残渣用 200 μ L 双蒸水

溶解, 进样 50 μ L. 阿霉素标准曲线的制备: 取空白血浆 1.0 mL 分别加入盐酸阿霉素, 使阿霉素的质量浓度分别为 50, 100, 200, 500, 750, 1 000, 2 000 mg·L⁻¹, 加入内标液 20 μ L (柔红霉素水溶液 200 mg·L⁻¹) 在上述样品处理与检测条件下以样品中阿霉素峰面积与内标峰面积的比值为横坐标(x), 样品中阿霉素浓度为纵坐标y(mg·L⁻¹)得直线回归方程: $y = -0.0859 + 3.5971x$ ($r = 0.9796$), 血浆阿霉素浓度在 0.05-2 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系。

1.2.2 杂种犬血液灌流黏附实验 将杂种犬 9 只根据灌流所用黏附剂不同, 随机分成 3 组 (每组 3 只). 血液灌流组 I (简称灌流组 I): 杂种犬经盐酸氯胺酮注射液(0.5 mL·kg⁻¹) 肌肉注射麻醉后, 于腹股沟处常规消毒, 行股动脉穿刺插入导丝, 在导丝致导下插入导管. X- ray 监视下将导管插入肝动脉. 同样, 在 X- ray 监视下, 行股静脉插管, 将带有球囊的导管插入肝静脉开口与右心房之间. 经导管给肝素 10 mg·kg⁻¹ 使之肝素化. 然后, 再经股静脉插入另一个非球囊导管至球囊导管下作为灌流流出道. 在灌流血泵下建立灌流通道, 体外循环血流方向: 股静脉非球囊导管 - 灌流泵 - 灌流装置(含 200 gNK-107 树脂) - 股静脉球囊导管 - 返回血液循环. 血液灌流组 II (简称灌流组 II): 除灌流装置内装有 200 g 日本活性炭 (火棉胶包膜) 外, 其余均与灌流组 I 相同. 对照组: 除灌流装置内无黏附剂外, 其余均与灌流组相同. 将股静脉球囊导管注入 760 g·L⁻¹ 复方泛影葡胺, 使球囊膨胀阻塞下腔静脉, 同时经肝动脉插管, 30 min 内缓慢注入盐酸阿霉素, 剂量为 5 mg·kg⁻¹, 稀释容量为生理盐水 50 mL. 输注的同时进行灌流, 流速为 200 mL·min⁻¹, 灌流 2 h, 测定指标: 血药浓度: 分别于灌流前、灌流后 1 h, 2 h; 3 d, 14 d 取血测血浆阿霉素浓度. 外周血象: 分别于灌流前、灌流后 3 d, 7 d, 14 d 取血测血常规. 心肌毒性: 分别于灌流前、灌流后 24, 72 h 取血测心肌酶. 肾功能: 分别于灌流前、灌流后 14 d 取血测 BUN、肌酐. 肝功能: 分别于灌流前、灌流后 14 d 取血测肝功能。

统计学处理 采用方差分析, t 检验方法及直线回归对数据进行处理. 结果以均数 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 血浆阿霉素 犬血液灌流中, 灌流组 I (NK-107 树脂), 灌流组 II (日本活性炭) 对阿霉素有较好的黏附性. 灌流 1, 2 h; 3, 14 d 血浆阿霉素浓度明显低于对照组 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 灌流犬血浆阿霉素浓度变化 ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$, mg·L⁻¹)

分组	1 h	2 h	3 d	14 d
灌流组 I	89 ± 9 ^b	60 ± 15 ^b	21 ± 5 ^b	10 ± 2 ^b
灌流组 II	99 ± 14 ^b	61 ± 13 ^b	26 ± 5 ^b	12 ± 2 ^b
对照组	312 ± 23	237 ± 12	116 ± 15	58 ± 8

^b $P < 0.01$, vs 对照组.

2.2 心肌酶 灌流组 I, 灌流组 II 在灌流 24, 72 h 心肌酶: 乳酸脱氢酶(LDH), 肌酸激酶(CPK-MB), α -羟丁酸(α -HBDH)无显著性变化($P > 0.05$). 而对照组在灌流 24 h 后, 心肌酶(LDH, CPK-MB, α -HBDH)高于灌流前($P < 0.05$), 72 h 后, 明显高于灌流前($P < 0.01$, 表 2).

2.3 血常规 灌流组 I, 灌流组 II 在血灌流后 3, 7, 14 d 外周血白细胞(WBC), 血小板(Pt), 红细胞(RBC), 血红蛋白(Hb)无明显变化($P > 0.05$). 对照组在灌流后 3 d 无明显变化($P > 0.05$), 而在第 7 天低于灌流前($P < 0.05$), 在灌流后 14 d 明显低于灌流前($P < 0.01$, 表 3).

2.4 肝肾功能 灌流组 I, 灌流组 II 在灌流前, 灌流后 14 d 肝功能: 丙氨酸氨基转移酶(ALT), 门冬氨酸氨基转移酶(AST), 总胆红素(TBIL)无显著差异($P > 0.05$). 而对照组在灌流前, 灌流后 14 d ALT, TBil 无显著变化($P > 0.05$), AST 较灌流前明显升高($P < 0.05$, 表 4). 灌流组 I, 灌流组 II 及对照组在灌流前, 后肾功能: 尿素氮(BUN), 肌酐(Cr)无显著变化($P > 0.05$, 表 4).

3 讨论

肝癌的营养供给绝大部分来源于肝动脉^[20, 23], 所以, 从肝动脉输注抗癌药物后, 肝组织血管内抗癌药物浓度高, 抗癌作用强^[24, 25]; 和从静脉注入抗癌药物比, 肝动脉注入后所引起的外周血管和其他组织器官内抗癌药物浓度低得多, 因而从肝动脉输注抗癌药物治疗肝癌的副作用又比从静脉输注抗癌药物轻的多, 且其疗效明显优于外周静脉化疗^[26-29]. 但肝动脉输注抗癌药物后, 仍有一些药物自肝静脉溢出至外周血及其他器官造成副作用, 如心肌毒性、骨髓抑制等, 进而影响其疗效. 我们通过犬肝动脉注入阿霉素的同时使用静脉血液灌流, 观察动脉输注抗癌药物后, 外周血中抗癌药物浓度及其副作用, 结果证明: 对照组的犬周围血中阿霉素浓度明显高于加入NK-107树脂及日本活性碳装置进行血液灌流的实验组, 且其外周血中WBC, RBC, Hb, Pt 明显降低, 心肌酶显著升高, 提示用阿霉素动脉输注治疗肝癌的同时进行装有NK-107树脂及日本活性碳装置

表 2 犬灌流前, 后心肌酶变化($n=3$, $\bar{x} \pm s$, $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$)

分组	LDH			CPK-MB			α -HBDH		
	0 h	24 h	72 h	0 h	24 h	72 h	0 h	24 h	72 h
灌流组 I	0.8±0.4	0.9±0.4	0.9±0.4	16.8±11.2	11.9±6.4	8.2±4.5	0.9±0.3	1.0±0.3	0.8±0.3
灌流组 II	1.0±0.3	1.1±0.3	1.1±0.1	9.7±9.3	4.3±3.7	2.6±2.3	1.4±0.5	1.9±0.6	2.7±2.3
对照组	0.8±0.1	1.6±0.2 ^a	3.1±0.1 ^b	11.1±10.7	23.9±12.9 ^a	33.7±10.4 ^b	1.4±0.1	2.7±0.3 ^a	8.5±0.3 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 灌流前.

表 3 犬灌流前, 后外周血 WBC, Pt, RBC, Hb 比较($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

分组	0 d				3 d				7 d				14 d			
	WBC Pt ×10 ⁹ ·L ⁻¹		RBC Hb ×10 ¹² ·L ⁻¹ g·L ⁻¹		WBC Pt ×10 ⁹ ·L ⁻¹		RBC Hb ×10 ¹² ·L ⁻¹ g·L ⁻¹		WBC Pt ×10 ⁹ ·L ⁻¹		RBC Hb ×10 ¹² ·L ⁻¹ g·L ⁻¹		WBC Pt ×10 ⁹ ·L ⁻¹		RBC Hb ×10 ¹² ·L ⁻¹ g·L ⁻¹	
灌流组 I	12.2±1.6	155±14	5.7±1.5	126±14	11.3±2.1	131±12	5.4±2.3	111±12	10.3±2.0	144±10	5.5±2.6	123±13	11.5±1.7	156±11	5.7±1.6	125±12
灌流组 II	15.5±3.5	141±38	5.7±2.4	115±7	12.8±1.9	126±26	5.0±1.2	100±9	13.6±2.1	136±28	5.5±2.4	108±24	14.7±2.3	142±27	5.6±2.3	118±33
对照组	16.3±4.2	131±38	5.9±1.6	131±28	13.6±2.1	136±29	5.5±2.7	108±49	8.5±5.4 ^a	77±35 ^a	4.8±1.2 ^a	94±27 ^a	6.2±4.4 ^b	69±39 ^b	5.2±1.6 ^b	109±28 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 灌流前

表 4 犬灌流前, 后肝, 肾功能比较($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

分组	ALT($\text{nkat} \cdot \text{L}^{-1}$)		AST($\text{nkat} \cdot \text{L}^{-1}$)		TBil($\text{nkat} \cdot \text{L}^{-1}$)		BUN($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)		Cr($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	0 d	14 d	0 d	14 d	0 d	14 d	0 d	14 d	0 d	14 d
灌流组 I	589±141	645±178	917±449	978±403	267±33	272±35	2.6±0.8	2.6±0.5	69±11	77±18
灌流组 II	733±333	789±386	817±335	845±187	256±19	278±10	2.4±0.7	3.2±0.7	64±7	67±20
对照组	322±54	411±123	417±232	2 473±284 ^a	233±33	283±17	2.7±1.1	4.1±0.5	39±21	59±16

^a $P < 0.05$, vs 灌流前.

进行静脉血液灌流. 对降低阿霉素的毒副作用有较好效果.

1980年以来, 国外学者逐步开展了血液净化技术与抗癌治疗的联合应用, 证明在抗癌药物外周血浓度减轻副作用方面起一定作用. 但报道较少, 需进一步深入研究. 抗癌药物的选择会直接影响抗癌疗效, 因此选择抗癌药物很关键. 自从 Olweny 应用阿霉素(adriamycin, ADM) 治疗肝癌有效以来, 被国内学者广泛应用^[30-35], 并被普遍认为是最有效的药物, 但是其化疗副作用严重限制了临床应用. 因此血液灌流降低外周血药浓度, 减少药物在肝外组织累积, 对于减轻阿霉素的毒性作用有重大意义. 我们证实: 杂种犬血液灌流中, 在灌流组 I, 灌流组 II 由于由肝静脉溢出的 ADM 被充分黏附, 从而进入体循环较少, 对外周产生的副作用会减低, 包括心肌毒性、骨髓抑制均低于对照组, 而肝肾功能两组无显著性差异, 对照组 AST 显著高于灌流前, 这是由于 AST 不仅存在于肝细胞中更主要存在于心肌细胞中, 由于对照组外周血阿霉素浓度较高, 对心肌细胞损伤所致. 因此可以认为灌流组及对照组对肝功能损伤轻微. 故我们认为阿霉素肝动脉输注与血液灌流二者联合应用, 能够减低外周血阿霉素浓度, 降低其毒副作用, 为临床对晚期肝癌的治疗提供了实验理论依据, 特别是开辟了一条降低抗癌药物毒副作用治疗晚期肝癌的新途径.

4 参考文献

- 1 汤钊猷. 中国肝癌临床研究进展. 华人消化杂志 1998;6:1013-1016
- 2 Fan J, Wu ZQ, Tang ZY, Zhou J, Qiu SJ, Ma ZC, Zhou XD, Ye SL. Multimodality treatment in hepatocellular carcinoma patients with tumor thrombi in portal vein. *World J Gastroenterol* 2001;7:28-32
- 3 Johnson PJ. Systemic chemotherapy of liver tumors. *Semin Surg Oncol* 2000;19:116-124
- 4 Fan J, Ten GJ, He SC, Guo JH, Yang DP, Wang GY. Arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:33-37
- 5 Li L, Yan LN, Chen XL, Lu WS, Xie XD, Wu YT. Hepatic adenylate energy charge levels in patients with hepatoma after hepatic artery embolization. *World J Gastroenterol* 1998;4:109-111
- 6 Li L, Wu PH, Li JQ, Zhang WZ, Lin HG, Zhang YQ. Segmental transcatheter arterial embolization for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:511-512
- 7 Sangro B, Rios R, Bilbao I, Belouqui O, Herrero JJ, Quiroga J, Prieto J. Efficacy and toxicity of intra-arterial cisplatin and etoposide for advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62:293-298
- 8 程剑华, 吴万垠, 刘伟胜, 常钢, 刘宇龙, 杨志刚, 李柳宁, 周红. 莪术油肝动脉灌注栓塞治疗原发性肝癌 17 例. 世界华人消化杂志 1999;7:92
- 9 李柳宁, 徐凯, 吴万垠, 朱迪盈, 罗海英, 汤湘江, 王峻松. 加味甘露消毒丹方对原发性肝癌介入治疗后毒副反应 34 例. 世界华人消化杂志 2000;8:483-484
- 10 贾雨辰, 田建明, 王振堂, 陈栋, 叶华, 刘崎, 杨继金, 孙飞, 林琳, 陆建平, 王飞, 程红岩. 肝癌万次介入治疗的回顾. 华人消化杂志 1998;6:2-3
- 11 Liu L, Jiang Z, Teng GJ, Song JZ, Zhang DS, Guo QM, Fang W, He SC, Guo JH. Clinical and experimental study on regional administration of phosphorus 32 glass microspheres in treating hepatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:492-505
- 12 Wu ZQ, Fan J, Qiu SJ, Zhou J, Tang ZY. The value of postoperative hepatic regional chemotherapy in prevention of recurrence after radical resection of primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:131-133
- 13 凌昌全, 陈吉吉, 朱德增, 俞超芹, 黄雪强, 翟笑枫, 万旭英, 李瑾,

- 陈坚, 沈峰, 杨广顺, 吴孟超. 中西医结合治疗中晚期原发性肝癌 313 例. 世界华人消化杂志 2001;9:114-115
- 14 Kemeny N, Fata F. Hepatic-arterial chemotherapy. *Lancet Oncol* 2001;2:418-428
- 15 卢云, 石景森. 肝动脉化疗栓塞术后死亡病例 31 例. 华人消化杂志 1998;6:6
- 16 Sithinamsuwan P, Piratvisuth T, Tanomkiat W, Apakupakul N, Tongyoo S. Review of 336 patients with hepatocellular carcinoma at songklanagarind hospital. *World J Gastroenterol* 2000;6:339-343
- 17 王红梅, 廖国清, 李虎城, 戴海峰, 解国清, 邹建军, 许红兵. 肝动脉灌注化疗 / 栓塞治疗中晚期肝癌 32 例. 世界华人消化杂志 1999;7:684
- 18 罗运权, 王义, 陈汉, 吴孟超. 术前肝动脉化疗栓塞对可切除肝癌患者术后生存率的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:468-469
- 19 Barnett KT, Malafa MP. Complications of hepatic artery infusion: a review of 4580 reported cases. *Int J Gastrointest Cancer* 2001;30:147-160
- 20 Ensminger WD. Intrahepatic arterial infusion of chemotherapy: pharmacologic principles. *Semin Oncol* 2002;29:119-125
- 21 张志友, 钱绍诚. NK107 树脂、日本活性炭对外周血中阿霉素黏附效果的实验研究. 天津医科大学学报 2000;6:6-9
- 22 张志友, 张文怡, 李宏伟, 钱绍诚. 反相高效液相色谱法检测组织中阿霉素含量的实验研究. 武警医学院学报 2000;9:37-40
- 23 Guo WP, Zhang HX, Wang ZM, Wang YQ, Ni DH, Li WX, Guan Y. DSA analysis of hepatic arteriovenous fistula concurrent with hepatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:872-876
- 24 陈江浩, 王执民, 吴道澄, 徐山淡, 陈海微, 文爱东. 肝动脉灌注阿霉素毫微粒在荷肝癌鼠体内的药物分布及药效研究. 华人消化杂志 1998;6:1048-1051
- 25 Tokairin Y, Maruyama M, Baba H, Yoshida T, Kure N, Nagahama T, Ebuchi M. Pharmacokinetics of "subselective" arterial infusion chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:1795-1798
- 26 Seno H, Ito K, Kojima K, Nakajima N, Chiba T. Efficacy of an implanted drug delivery system for advanced hepatocellular carcinoma using 5-fluorouracil, epirubicin and mitomycin C. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:811-816
- 27 Hwu WJ, Salem RR, Pollak J, Rosenblatt M, D' Andrea E, Leffert JJ, Faraone S, Marsh JC, Pizzorno G. A clinical-pharmacological evaluation of percutaneous isolated hepatic infusion of doxorubicin in patients with unresectable liver tumors. *Oncol Res* 1999;11:529-537
- 28 Sturgill MG, Brenner DE, August DA. Augmentation of hepatic doxorubicin extraction with extracorporeal filtration avoids the dose-dependent, nonlinear increase in AUC observed with systemic administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;41:193-200
- 29 刘宇虎, 钮振. 不同途径给表阿霉素及联用血液灌流的临床意义. 华人消化杂志 1998;6:510-513
- 30 毛华, 宋卫生, 赵敏芳, 袁爱力. TAE 加³²P 内照射治疗原发性肝癌肝血液动力学变化. 华人消化杂志 1999;7:87-88
- 31 Wang W, Qin SK, Chen BA, Chen HY. Experimental study on antitumor effect of arsenic trioxide in combination with cisplatin or doxorubicin on hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:702-705
- 32 Uotani H, Yamashita Y, Masuko Y, Shimoda M, Murakami A, Sakamoto T, Tazawa K, Tsukada K. A case of resection under the IVC-atrial venovenous bypass of a hepatoblastoma after intraarterial chemotherapy. *J Pediatr Surg* 1998;33:639-641
- 33 Ku Y, Tominaga M, Iwasaki T, Fukumoto T, Muramatsu S, Kusunoki N, Sugimoto T, Suzuki Y, Kuroda Y, Saitoh Y. Efficacy of repeated percutaneous isolated liver chemoperfusion in local control of unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1998;45:1961-1965
- 34 Tanaka K, Shimada H, Togo S, Takahashi T, Endo I, Sekido H, Yoshida T. Use of transcatheter arterial infusion of anticancer agents with lipiodol to prevent recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatic resection. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1083-1088
- 35 Link KH, Kornmann M, Butzer U, Leder G, Sunelaitis E, Pillasch J, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Beger HG. Thymidylate synthase quantitation and in vitro chemosensitivity testing predicts responses and survival of patients with isolated nonresectable liver tumors receiving hepatic arterial infusion chemotherapy. *Cancer* 2000;89:288-296

中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1基因的克隆与表达

刘双虎, 谭德明, 侯 珏, 胡国龄

刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄, 中南大学湘雅医院传染病科 湖南省长沙市 410008

刘双虎, 男, 1963-02-28, 湖南省攸县人, 汉族, 1986年中山医科大学本科毕业, 1995年湖南医科大学博士毕业, 副教授. 主要从事传染病的临床与基础研究, 主要研究方向为病毒性肝炎.

卫生部科研基金课题, No.98-1-120

项目负责人: 刘双虎, 410008, 湖南省长沙市湘雅路141号, 中南大学湘雅医院传染病科. liushuanghu@hotmail.com

电话: 0731-4327221 传真: 0731-4327332

收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-12-02

Cloning and expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) gene in Chinese

Shuang-Hu Liu, De-Ming Tan, Jue Hou, Guo-Ling Hu

Shuang-Hu Liu, De-Ming Tan, Jue Hou, Guo-Ling Hu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by Natural Science Foundation of the Ministry of Health of China, No.98-1-120

Correspondence to: Dr. Shuang-Hu Liu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. liushuanghu@hotmail.com

Received: 2002-11-19 Accepted: 2002-12-02

Abstract

AIM: To clone the Chinese gene of TIMP-1 and express the fusion protein MBP-TIMP-1.

METHODS: The fragment of TIMP-1 gene from the liver tissue of indigenous Hunan residents was amplified by RT-nest-PCR and it was cloned, sequenced by gene recombinations techniques. Fusion protein MBP-TIMP-1 was expressed in *E.coli*, analysed by SDS-PAGE and Western blot and purified by affinity chromatography.

RESULTS: The sequence of cloned Chinese TIMP-1 gene was 624 bp. It is homologous with the reported other human TIMP-1 gene sequence. Fusion protein MBP-TIMP-1 was 66 kd and is of the antigenicity of TIMP-1. The MBP-TIMP-1 was purified by affinity chromatography.

CONCLUSION: The Chinese gene of TIMP-1 was cloned and MBP-TIMP-1 was expressed and purified successfully *in vitro*. It may be useful to the diagnosis of liver fibrosis.

Liu SH, Tan DM, Hou J, Hu GL. Cloning and expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) gene in Chinese. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1164-1167

摘要

目的: 克隆和表达中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1; TIMP-1) 基因, 获

得具有抗原性的人TIMP-1蛋白.

方法: 用RT-nest-PCR扩增TIMP-1编码区基因片段, 用基因重组技术构建含该片段的重组质粒并进行序列分析. 在大肠杆菌 *E.coli* 中表达融合蛋白 MBP-TIMP-1, 用SDS-PAGE和Western-blot对重组蛋白进行分析鉴定, 并用亲和层析试剂盒纯化融合蛋白MBP-TIMP-1.

结果: 经核苷酸序列分析表明, 本研究克隆的中国人TIMP-1为624bp, 与报道的国外TIMP-1基因序列同源. 经SDS-PAGE和Western blot表明, 表达的融合蛋白MBP-TIMP-1分子质量为66 Ku, 具有TIMP-1的抗原性, 并可进行亲和层析纯化.

结论: 克隆了中国人TIMP-1基因, 表达和纯化了具有免疫原性的融合蛋白MBP-TIMP-1, 他将对于肝纤维化的诊断有一定作用.

刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄. 中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1基因的克隆与表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1164-1167

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1164.asp>

0 引言

慢性肝病是我国常见病及多发病^[1-3], 肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展的重要途径, 其机制十分复杂^[4-6]. 目前的研究结果认为肝细胞外基质(extracellular matrix; ECM)合成与降解的失衡, 导致ECM在肝脏内过度沉积是肝纤维化形成的主要机制^[7-9]. ECM的代谢受基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases; MMP)及TIMP的共同调节^[10]. 在慢性肝病患者的血清中, TIMP-1的含量随肝纤维化的进展而增加, 认为TIMP上升是机体降解胶原的能力下降, 肝硬化形成的标志^[11, 12]. 为了进一步研究TIMP-1的临床应用价值, 提高我国肝硬化的临床诊断水平, 我们利用基因工程技术, 克隆, 表达了中国人TIMP-1基因, 对其蛋白质进行抗原性分析, 将为进一步研究国产的血清TIMP-1诊断试剂盒奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 取自于我院外科肝叶切除术患者的肝组织, 提取总RNA, 经RT-nest-PCR扩增TIMP-1基因. PCR引物根据文献(Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 2407)报

告的TIMP-1序列合成. 外引物为(+)-5'-CCA GAG AGA CAC CAG AGA-3', (-)-5'-TGT GCA GGC TTC AGC TTC-3'; 内引物为(+)-5'-TTA GGA TCC ACC ATG GCC CCC TTT G-3'; (-)-5'-ACG AAG CTT GAT TCA GGC TAT CTG G-3'. 1.2 方法 应用TRIzol Reagent RNA 分离液(GIBCO BRL)提取肝组织总RNA, 用MMLV 逆转录酶(Promega)按试剂盒要求合成cDNA, 然后行Nest-PCR 扩增TIMP-1 基因, PCR 条件为:94 °C, 4 min → 94 °C, 1 min, 58 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, ×35 循环 → 72 °C, 5 min. 第1次PCR 与第2次PCR 条件相同. PCR 产物为648 bp, 经纯化后与PUC-T 质粒克隆载体(上海生工公司)连接, 转化于JM109 大肠杆菌, 经蓝/白筛选及质粒DNA 限制性内切酶片段分析获取含人TIMP-1 基因片段的重组质粒(PUC-TIMP-1), 对此重组质粒用ABI PRISM (TM)377XL DNA Sequencer 全自动测序仪(PE 公司)进行序列分析, 并与已报道的人与动物TIMP-1 的序列进行比较. 用限制酶BamH1 及Hind III 从重组质粒PUC-TIMP-1 中切出TIMP-1 基因片段, 将其克隆于表达载体PMAL-CRI 中麦芽糖结合蛋白(MBP)表达基因的下游, 转化入大肠杆菌, 经前述筛选方法取得含TIMP-1 基因片段的重组表达质粒PAML-TIMP-1 (PT-1)及其基因工程菌PMAL-TIMP-1/JM109 (PT-1/JM109), 将上述基因工程菌PT-1/JM109 过夜增生, 按1:50 的比例接种于LB 培养基500 ml, 继续培养到A₆₀₀ 为0.6 时加入IPTG 到终浓度为0.3 mmol/L, 诱导表达4 h, 收集细菌, 进行SDS-PAGE, 和Western blot 分析(一抗为兔抗人TIMP-1 IgG 抗体, 二抗为羊抗兔IgG 抗体, 二者均购于武汉博士德生物试剂公司)以确定其抗原性. 最后用IPTG 大量诱导增生的基因工程菌PT-1/JM109, 收集细菌, 菌体经超声波破碎后, 用Amyrose resin 层析试剂盒(new england biolabs, USA)对表达的融合蛋白进行亲和层析(按说明书进行), 纯化融合蛋白MBP-TIMP-1.

2 结果

2.1 人TIMP-1 基因片段的序列 我们克隆的人TIMP-1 基因片段, 经DNA 序列分析, 此克隆片段编码区序列为624 bp(图1). 与已报道的国外TIMP1 基因相比较, 长度相同, 变异不明显; 但与鼠, 羊的TIMP1 基因相比较, 差异较大(表1).

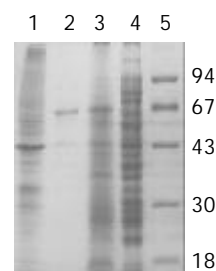
表1 中国人TIMP-1 基因片段核苷酸(nt)与推断氨基酸(aa)序列的比较 (%)

	人TIMP1 ^[13]	人TIMP1 ^[14]	鼠TIMP-1 ^[15]	羊TIMP-1 ^[16]
nt	99.35	99.67	72.81	80.86
aa	99.52	99.04	76.32	86.73

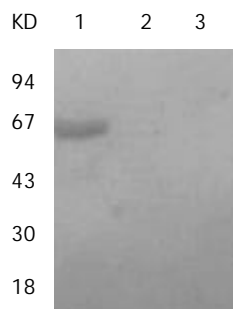
1	atggccccctt gagccccctgct tctggcatcctg ttgtgctgtg	48
	M A P F E P L A S G I L L L L W	
49	ctgatagccccc agcagggcctgc acctgtgtccct cccaccacag	96
	L I A P S R A C T C V P P H P Q	
97	acggccttctgc aattccgacctc gtcacaggggcc aagttcgtggg	144
	T A F C N S D L V I R A K F V G	
145	acaccagaagtc aaccagaccacc ttataccagcgt tatgagatcaag	192
	T P E V N Q T T L Y Q R Y E I K	
193	atgaccaagatg tataaagggttc caagccttaggg gatgccgtgac	240
	M T K M Y K G F Q A L G D A A D	
241	atccggttctgc tacacccccgcg atggagagtgtc tgcggatacttc	288
	I R F V Y T P A M E S V C G Y F	
289	cacaggtccac aaccgcagcgag gagtttctcatt gctgaaaaacta	336
	H R S H N R S E E F L I A G K L	
337	caggatggactc ttgcacatcacc acctgcagtttc gtgctccctgg	384
	Q D G L L H I T T C S F V A P W	
387	aacagcctgagc ttagctcagcgc cggggcttcacc aagacctacact	432
	N S L S L A Q R R G F T K T Y T	
433	gttgctgtgag gaatgcacagtg ttccctgttta tccatcccctgg	480
	V G C E E C T V F P C L S I P T	
481	aaactgcagagt ggcactcattgc ttgtggacggac cagctcctcaa	528
	K L Q S G T H C L W T D Q L L Q	
529	ggctctgaaaag ggcttcacgtcc cgtcaccttgcc tgcctgcctcgg	576
	G S E K G F Q S R H L A C L P R	
577	gagccagggtg tgcacctggcag tccctgcggtcc cagatagcctga	624
	E P G L C T W Q S L R S Q I A	

图1 中国人TIMP-1 基因片段的序列.

2.2 TIMP1 基因片段的体外表达 基因工程菌PT-1/JM109 在IPTG 的诱导下在体外进行了表达, 经SDS-PAGE 电泳后可以看到一条66 Ku 的浓蛋白带, 而在空载质粒菌PMAL/JM109 及单纯的JM109 泳道均无此蛋白带. 此蛋白带为MBP (42 Ku) 与TIMP-1 (24 Ku) 的融合蛋白MBP-TIMP-1, 大小约66 Ku. 此结果与预期的相符合. 在PMAL/JM109 泳道上, 可见42 Ku 的浓蛋白带, 此为MBP. 用Amyrose resin 层析试剂盒对表达的融合蛋白进行亲和层析, 得到了纯化的融合蛋白MBP-TIMP-1 (图2). 为了进一步证明66 Ku 蛋白含有TIMP-1, 进行了Western blot 分析, 结果表明66Ku 蛋白能与兔抗人TIMP-1 IgG 抗体起反应, 形成浓显色带, 而与MBP 无反应, 在空载质粒菌PMAL/JM109 及单纯的JM109 泳道均无显色带形成(图3).



1 PMAL/JM109; 2 纯化的融合蛋白MBP-TIMP-1; 3 PT-1/JM109; 4 JM109; 5 标准蛋白质分子量(94 Ku, 67 Ku, 43 Ku, 30 Ku, 18 Ku)
图2 表达产物的SDS-PAGE 分析.



1 PT-1/JM109; 2 PMAL/JM109; 3 JM109 标准蛋白质分子质量(94 Ku, 67 Ku, 43 Ku, 30 Ku, 18 Ku)

图3 表达产物的 Western blot 分析。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病的主要发展过程, 其机制比较复杂, 众多的细胞因子参与了肝纤维化和肝硬化形成过程的调节^[17-20], 但肝硬化形成最终与 ECM 的降解失衡, ECM 在肝脏中沉积有关^[21-24]. TIMP-1 是调节肝内 ECM 沉积的重要因素, 主要通过抑制 MMPs 对 ECM 的降解, 使 ECM 在肝脏内沉积增加, 也可通过抑制已活化的星状细胞的细胞凋亡, 使得星状细胞持续活化, 加剧了肝内的 ECM 形成和堆积, 促进了肝硬化的形成^[25, 26]. 尽管 Vaillant et al^[27] 未能观察到血清 TIMP-1 水平升高与曼氏血吸虫病患者肝纤维化进展的相互关系, 但很多研究发现在肝炎肝硬化患者的 TIMP-1 的水平均明显的高于无肝硬化的病毒性肝炎患者^[28-30]. 王泰龄 et al^[31] 发现与肝纤维化有关的血清标志, 包括 IV 型胶原、层连蛋白、透明质酸和 TIMP-1 等与肝组织的炎症活动度和肝纤维化呈正相关. 聂青和 et al 应用致敏红细胞固相吸附试验(solid-phase absorption to sensitized erythrocytes; SPASE)检测了肝炎肝硬化患者血清中 TIMP-1 的阳性率达 73.6%, 明显高于急性(16.4%)和慢性(33.3%)肝炎组. 在血清 TIMP-1 阳性的肝硬化患者的肝组织中的 TIMP-1 表达的阳性率达 100%. 说明 TIMP-1 的阳性与肝纤维化的进展有关, 对肝硬化患者 TIMP-1 是一种非常具有诊断价值的指标^[32, 33]. Walsh et al^[34] 研究了 43 例慢性丙型肝炎患者肝组织病理学改变与血浆 TIMP-1 的相互关系, 发现 TIMP-1 水平的升高与肝组织炎症活动度, 包括肝细胞坏死、门区炎症细胞浸润和纤维化程度呈正相关, 指出血浆 TIMP-1 正常者可排除晚期肝病; 而血浆 TIMP-1 升高对慢性肝病的进展期具有较大的诊断价值. Boeker et al^[35] 分析了不同血清肝纤维化标志的意义, 发现血清 TIMP-1 水平随慢性肝病的进展稳步递升, 对肝纤维化诊断的敏感性和特异性分别为 67% 和 88%, 对肝硬化诊断的敏感性近 100%, 特异性也高达 75%; 认为 TIMP-1 对肝硬化的诊断价值大于其他有关的血清酶学和血清白蛋白的检测。

由于 TIMP-1 对肝炎肝硬化的诊断价值得到了充分的肯定, 我们认为有必要克隆和表达 TIMP-1 基因, 让其为我们对肝硬化患者诊断服务, 提高肝硬化的临床诊断水平. 为此我们用 RT-nest-PCR 方法扩增了中国

人 TIMP-1 基因序列, 其长度为 624 bp. 与国外报道的 TIMP-1 基因序列相比较, 长度相等, 核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 99.35% 和 99.67%. 提示不同人种之间 TIMP-1 无明显差异. 与鼠, 羊等动物的 TIMP-1 基因序列相比较, 其同源性分别为 72.81% 和 80.86%, 提示 TIMP-1 基因序列存在一定的种属差异性。

我们将 TIMP-1 基因片段亚克隆到表达质粒 PMAL-CRI 表达 MBP 的基因下游, 在体外用大肠杆菌 JM109 经 IPTG 诱导表达了融合蛋白 MBP-TIMP-1, 经 SDS-PAGE 分析, 该蛋白分子量为 66 KD, 与预期的大小相符. 用 Amyrose resin 层析试剂盒对该融合蛋白进行亲和层析, 得到了纯化的融合蛋白 MBP-TIMP-1 (图 3). 为了证明 MBP-TIMP-1 具有一定的诊断价值, 我们用兔抗人 TIMP-1 IgG 抗体对此蛋白进行了 Western blot 分析, 结果表明 MBP-TIMP-1 可与兔抗人 TIMP-1 IgG 抗体起反应, 形成显色带, 而单纯的 MBP 及大肠杆菌菌体蛋白与兔抗人 TIMP-1 IgG 抗体不起反应, 无显色带形成 (图 4), 提示本研究表达的融合蛋白具有 TIMP-1 的抗原活性. 研究结果表明本研究成功克隆了人 TIMP-1 基因, 表达和纯化了具有 TIMP-1 抗原活性的融合蛋白 TIMP-1, 为进一步建立人 TIMP-1 诊断试剂盒奠定了基础. 我们将进一步研究应用 MBP-TIMP-1 融合蛋白检测 TIMP-1 的价值。

4 参考文献

- 辛绍杰, 张玲霞, 朱传琳, 胡谨华, 段学章, 张敏, 游绍莉, 胡良平, 皇甫玉珊, 赵志海, 赵景民, 毛远丽. 慢性病毒性肝炎临床与病理的诊断标准. 世界华人消化杂志 2001;9:726-727
- 周永兴. 隐匿性 HBV 感染是一个潜在的威胁. 世界华人消化杂志 2003;11:246-248
- 游晶, 庄林, 唐宝璋, 杨惠, 杨微波, 李武, 张宏丽, 张艳梅, 张禄, 严绍明. 干扰素联合胸腺肽治疗慢性乙型肝炎. 世界华人消化杂志 2001;9:388-391
- 吴君, 程明亮, 丁一生, 刘仁才, 李佳, 王万灵, 胡莲. 病毒性肝炎肝硬化危险因素 5 年追踪调查. 世界华人消化杂志 2000;8:1365-1367
- 白文元, 姚希贤, 冯丽英. 肝纤维化的研究现状. 世界华人消化杂志 2000;8:1267-1268
- Schneiderhan W, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Grunert A, Nussler A, Weidenbach H, Menke A, Schmid RM, Adler G, Bachem MG. Oxidized low-density lipoproteins bind to the scavenger receptor, CD36, of hepatic stellate cells and stimulate extracellular matrix synthesis. *Hepatology* 2001;34:729-737
- 周光德, 赵景民. 细胞外基质在肝内的代谢与肝纤维化的形成. 世界华人消化杂志 2002;10:57-59
- 刘成海, 李风华, 顾宏图, 胡义扬, 刘平, 刘成. γ -干扰素对大鼠二甲基亚硝胺肝纤维化肝脏胶原代谢的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:313-316
- 谢渭芬, 林勇. 细胞外基质降解与肝脏纤维化治疗. 世界华人消化杂志 2002;10:61-63
- 孟二红, 赵景民, 王松山, 刘旺霞, 刘平, 周光德, 张泰和. 基质金属蛋白酶在非酒精性脂肪性肝炎患者肝组织中的表达. 世界华人消化杂志 2002;10:1257-1260
- 崔立红, 叶剑雄. 细胞外基质在肝脏纤维化诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2002;10:60-61
- 谢玉梅, 聂青和, 周永兴, 程勇前, 康文臻. 地高辛素标记探针原位杂交技术检测肝硬化组织中 TIMPs mRNA. 世界华人消化杂志 2001;9:251-254
- Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG, Stricklin GP. Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2407-2411

- 14 Opbroek A, Kenney MC, Brown D. Characterization of a human corneal metalloproteinase inhibitor (TIMP-1). *Curr Eye Res* 1993;12:877-883
- 15 Okada A, Garnier JM, Vicaire S, Basset P. Cloning of the cDNA encoding rat tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) amino acid comparison with other TIMPs, and gene expression in rat tissues. *Gene* 1994;147:301-302
- 16 Smith GW, Goetz TL, Anthony RV, Smith MF. Molecular cloning of an ovine ovarian tissue inhibitor of metalloproteinases: ontogeny of messenger ribonucleic acid expression and in situ localization within preovulatory follicles and luteal tissue. *Endocrinology* 1994;134:344-352
- 17 刘芳, 刘金星, 曹治宸, 李兵顺, 赵彩彦, 孔丽, 甄真. 慢性肝病患者血清 TGF- β 1 与肝纤维化指标和肝组织病理的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:519-521
- 18 黄宇琦, 王宇, 高毅, 魏银燕, 李朝龙, 杨继震. α - 干扰素对大鼠肝纤维化间质胶原酶基因表达的调控. 世界华人消化杂志 2000;8:579-580
- 19 Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241-247
- 20 崔东来, 姚希贤. 肝纤维化的血清学检测. 世界华人消化杂志 2000;8:683-684
- 21 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases -1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):850-860
- 22 Sakaida I, Uchida K, Hironaka K, Okita K. Prolyl 4-hydroxylase inhibitor (HOE 077) prevents TIMP-1 gene expression in rat liver fibrosis. *J Gastroenterol* 1999;34:376-377
- 23 Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabbler AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, Urbanski SJ. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998;153:1895-1902
- 24 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 25 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076
- 26 宋刘来, 罗和生, 余保平. 肝细胞生长因子抗肝纤维化作用及对 MMP-1, TIMP-1 表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:209-213
- 27 Vaillant B, Chiamonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol* 2001;167:7017-7026
- 28 Boker KH, Pehle B, Steinmetz C, Breitenstein K, Bahr M, Lichtinghagen R. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver and serum/plasma in chronic active hepatitis C and HCV-induced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2000;47:812-819
- 29 Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Bahr M, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:239-247
- 30 Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M, Masuzawa M, Yoshihara H, Naito M, Miyamoto T, Inoue A, Asai A, Hijioka T, Fusamoto H, Kamada T. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol* 1997;26:574-583
- 31 Wang T, Wang B, Liu X. Correlation of serum markers with fibrosis staging in chronic viral hepatitis. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 1998;27:185-190
- 32 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:282-287
- 33 Nie Q, Zhou Y, Xie Y. Expression and significance of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 in serum and liver tissue of patients with liver cirrhosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:805-807
- 34 Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999;44:624-630
- 35 Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002;316:71-81

卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响

李 乾, 张桂英, 李新华, 徐美华

李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410008
湖南省卫生厅课题, No.Y 02-008
项目负责人: 张桂英, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 141 号, 中南大学湘雅医院消化内科. liqian0816@hotmail.com
电话: 0731-4327249
收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-12-07

Effects of captopril on expression of MMP-2, 3 and TIMP-2, 3 in rat hepatic fibrosis

Qian Li, Gui-Ying Zhang, Xin-Hua Li, Mei-Hua Xu

Qian Li, Gui-Ying Zhang, Xin-Hua Li, Mei-Hua Xu, Department of Digestion, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Correspondence to: Dr. Gui-Ying Zhang, Department of Digestion, Xiangya Hospital, Central South University, 141 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. liqian0816@hotmail.com
Received: 2002-11-19 Accepted: 2002-12-07

Abstract

AIM: To investigate the effects of captopril on the expression of MMP-2,3 and TIMP-2, 3 in rat hepatic fibrosis.

METHODS: Forty healthy Wistar rats were randomly divided into five groups: normal control group, experiment group A, experiment group B, captopril-prevention group, captopril-treatment group. Hepatic fibrosis models were induced in the latter 4 groups by a combination of several factors. Liver sections were stained by hematoxylin-eosin and Van Gieson to evaluate the degree of inflammation and hepatic fibrosis. Expression of MMP-2, 3 and TIMP-2, 3 in liver were assayed by immunohistochemistry.

RESULTS: There was significant difference between captopril-prevention group (1.33 ± 0.52) and experimental group A (2.17 ± 0.75) on histologic assessment of hepatic fibrosis, and between captopril-treated group (1.67 ± 0.82) and experimental group B (2.86 ± 0.69) ($P < 0.05$). The ratios of positive expression area of MMP-2 in captopril-prevention group and captopril-treatment group ($4.43 \pm 0.25\%$ and $3.21 \pm 0.16\%$, respectively) was smaller than in experimental group A and B ($8.20 \pm 0.24\%$ and $5.67 \pm 0.32\%$, respectively), ($P < 0.01$). Expression of MMP-3 in experimental group A and experimental group B ($1.54 \pm 0.36\%$ and $3.69 \pm 0.27\%$, respectively) was weaker than in captopril-prevention group and captopril-treated group ($4.25 \pm 0.37\%$ and $10.75 \pm 1.69\%$, respectively) ($P < 0.01$). Expression of TIMP-2 in captopril-prevention group ($2.16 \pm 0.17\%$) was weaker than in experimental group A ($3.61 \pm 0.46\%$) ($P < 0.01$); but TIMP-2 in captopril-treatment group ($7.87 \pm 0.59\%$) was stronger than in experimental group B ($6.68 \pm 0.52\%$) ($P < 0.01$).

Expression of TIMP-3 in captopril-prevention group and captopril-treatment group ($3.06 \pm 0.28\%$ and $5.35 \pm 0.34\%$, respectively) was weaker than in experimental group A and experimental group B ($4.13 \pm 0.29\%$ and $8.54 \pm 0.45\%$, respectively) ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Captopril could suppress expression of MMP-2, TIMP-3, and enhance the expression of MMP-3, which might be related with its anti-hepatic fibrosis activity.

Li Q, Zhang GY, Li XH, Xu MH. Effects of captopril on expression of MMP-2,3 and TIMP-2,3 in rat hepatic fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1168-1171

摘要

目的: 探讨卡托普利抗大鼠肝纤维化的作用及对 MMP-2, MMP-3, TIMP-2, TIMP-3 的表达影响。

方法: Wistar 大鼠 40 只随机分为正常对照组, 实验对照组 A、B, 卡托普利预防组、治疗组, 采用混合损害因素构建肝纤维化模型。行 HE 和 VG 染色, 判断炎症和肝纤维化程度。免疫组化检测 MMP-2, MMP-3, TIMP-2, TIMP-3 的表达。

结果: 实验对照组 A 平均肝纤维化积分值为 2.17 ± 0.75 、卡托普利预防组为 1.33 ± 0.52 ; 实验对照组 B 为 2.86 ± 0.69 、卡托普利治疗组为 1.67 ± 0.82 , 二者比较均 $P < 0.05$ 。实验对照组 A、卡托普利预防组的 MMP-2 阳性反应面积比分别为 $8.20 \pm 0.24\%$, $4.43 \pm 0.25\%$, 实验对照组 B、治疗组分别为 $5.67 \pm 0.32\%$, $3.21 \pm 0.16\%$, 二者比较均 $P < 0.01$; 实验对照组 A、卡托普利预防组 MMP-3 阳性反应面积比分别为 $1.54 \pm 0.36\%$, $4.25 \pm 0.37\%$, 实验对照组 B、治疗组分别为 $3.69 \pm 0.27\%$, $10.75 \pm 1.69\%$, 二者比较均 $P < 0.01$; 实验对照组 A、卡托普利预防组 TIMP-2 阳性反应面积比分别为 $3.61 \pm 0.46\%$, $2.16 \pm 0.17\%$, 实验对照组 B、治疗组分别为 $6.68 \pm 0.52\%$, $7.87 \pm 0.59\%$, 二者比较均 $P < 0.01$; 实验对照组 A、卡托普利预防组 TIMP-3 阳性反应面积比分别为 $4.13 \pm 0.29\%$, $3.06 \pm 0.28\%$, 实验对照组 B、治疗组分别为 $8.54 \pm 0.45\%$, $5.35 \pm 0.34\%$, 二者比较均 $P < 0.01$ 。

结论: 卡托普利可抑制 MMP-2, TIMP-3 蛋白表达, 增强 MMP-3 蛋白表达, 可能是其抗纤维化作用的机制之一。

李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华. 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1168-1171

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1168.asp>

0 引言

肝纤维化是一种或几种病因反复作用于肝脏, 组织发生修复反应导致细胞外基质(ECM)合成、降解与沉积平衡混乱而引起的病理过程, 其主要特征是 ECM 在肝脏的过度沉积. 卡托普利是一种血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI), 能够抑制血管紧张素 I 向血管紧张素 II 的转化, 早期主要用于抗高血压治疗, 在临床使用过程中逐渐发现其能够逆转心脏、肾脏、肝脏的纤维化^[1-5]. 但 ACEI 通过哪些环节起作用? 是否与 ECM 合成与降解过程中起主要作用的基质金属蛋白酶(MMPs)和基质金属蛋白酶组织抑制物(TIMPs)有关? 目前国内外未见报道. 我们通过 ACEI 处理大鼠肝纤维化模型, 检测肝脏组织中与肝纤维化密切相关的 MMP-2, MMP-3, TIMP-2 和 TIMP-3 的表达变化, 探讨 ACEI 抗大鼠肝纤维化的可能作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 同一品系清洁级健康 Wistar 大白鼠 40 只, 雌雄各半, 质量(180 ± 45) g 及普通饲料均由中南大学湘雅医学院实验动物学部提供; 卡托普利片, 江苏常州制药厂; 无水酒精, CCl₄ 购自湖南师范大学生化试剂厂; 高脂饲料由 850 g/kg 普通饲料加 150 g/kg 的猪油组成.

1.2 方法 大鼠实验前自由喂养 1 wk, 按雌雄随机分为 5 组: (1)正常对照组(C) 6 只: 正常普通饮食饮水; (2)实验对照组 A(Ea) 9 只: 均予高脂饮食, 以无水乙醇每天给大鼠 10 g/Kg 加入饮水中代替饮水; 实验第 1 天予 400 mL/L CCl₄ 菜籽油皮下注射 4 mL/kg 体重, 以后皮下注射 3 mL/kg, 1 次 /wk; 生理盐水 2 mL 灌胃 1 次 /d, 共 6 wk; (3)实验对照组 B (Eb) 9 只: 造模条件同实验对照组 A, 共 12 wk; (4)卡托普利预防组(P) 8 只: 造模条件同实验对照组, 造模开始即每天给予卡托普利按 100 mg/kg (溶于 2 mL 稀释液中)灌胃, 1 次 /d, 共 6 wk; (5)卡托普利治疗组(T) 8 只: 造模条件同实验对照组, 造模 12 wk, 从第 7 周起给予卡托普利, 给药剂量, 方法均同卡托普利预防组至造模结束. 动物均在 20 °C 左右环境温度, 明暗各 12 h 的清洁动物实验室内饲养. 冰冻切片分别予以 HE 和 van Gieson (VG) 染色. 按肝纤维结缔组织增生程度将肝纤维化分为 0-4 级^[6]: 0 级: 无肝纤维化; 1 级: 纤维结缔组织增生仅局限于汇管区或有汇管区扩大, 有向小叶发展倾向; 2 级: 纤维组织增生进入肝小叶 2/3 及有 1 级同样的改变; 3 级: 纤维组织进入肝小叶中央静脉周围; 4 级: 纤维组织在全小叶呈多处弥漫性增生, 有假小叶形成, 并有 3 级同样改变. MMP-2, MMP-3, TIMP-2, TIMP-3 的免疫组化测定按试剂盒说明操作. 结果用彩色病理图像分析仪分析: 阳性产物主要位于胞质, 阳性判断标准为该位置出现棕黄色颗粒并测阳性反应面积比, 每张切片选取四周及中央 5 个区域, 均取该区域中阳性反应

最多的视野 20 倍物镜下测定阳性反应面积比(阳性面积 / 肝组织面积 × 100 %), 取平均值^[7].

统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用统计软件 SPSS10.0 进行方差齐性检验, 并在此基础上进行方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性.

2 结果

2.1 大鼠肝纤维化组织学分级 正常对照组大鼠 VG 胶原染色仅见少许纤细纤维分布于血管壁; 实验对照组大鼠 VG 胶原染色见汇管区大量胶原纤维和网状纤维沉积, 相互连接形成纤维间隔, 小部分重新分割肝小叶形成假小叶; 卡托普利预防组、治疗组大鼠 VG 胶原染色仅于汇管区可见轻度增生的胶原纤维和网状纤维及纤维间隔吸收后的残留. 按纤维化分级标准, 卡托普利预防组 1.33 ± 0.52 、治疗组 1.67 ± 0.82 平均纤维化积分分别与实验对照组 A 2.17 ± 0.75 , B 2.86 ± 0.69 比较降低 $P < 0.05$ (图 1, 2).

2.2 大鼠肝组织 MMP-2, TIMP-2, MMP-3, TIMP-3 的表达 正常对照组 MMP-2, TIMP-2, MMP-3, TIMP-3 的阳性表达极少; 实验对照组 A、对照组 B、卡托普利预防组、治疗组的 MMP-2, MMP-3 阳性表达均增加, 主要分布于血管内皮细胞、窦周内皮细胞及肝星状细胞的胞质中; 其中实验对照组 B 的 MMP-2 阳性表达低于对照组 A, 卡托普利预防组、治疗组的 MMP-2 阳性表达均低于对应的实验对照组 A、对照组 B; 实验对照组 B 的 MMP-3 阳性表达高于对照组 A, 卡托普利预防组、治疗组 MMP-3 阳性表达分别高于实验对照组 A、对照组 B. 实验对照组 A、对照组 B、卡托普利预防组、治疗组 TIMP-2、TIMP-3 阳性表达均增加, 主要分布于窦周内皮细胞及肝星状细胞胞质中; 其中实验对照组 B 的 TIMP-2 阳性表达高于对照组 A, 卡托普利预防组 TIMP-2 阳性表达低于对照组 A, 而卡托普利治疗组阳性表达高于对照组 B; 实验对照组 B 的 TIMP-3 阳性表达高于 A, 卡托普利预防组、治疗组 TIMP-3 阳性表达分别低于对应实验对照组 A、对照组 B (表 1, 图 3, 4).

表 1 大鼠肝组织 MMP-2, MMP-3, TIMP-2, TIMP-3 的阳性表达面积比(% $\bar{x} \pm s$)

分组	MMP-2	TIMP-2	MMP-3	TIMP-3
C	0.17 ± 0.05	0.13 ± 0.05	0.21 ± 0.08	0.18 ± 0.06
Ea	8.20 ± 0.24	3.61 ± 0.46	1.54 ± 0.36	4.13 ± 0.29
P	4.43 ± 0.25 ^b	2.16 ± 0.17 ^b	4.25 ± 0.37 ^b	3.06 ± 0.28 ^b
Eb	5.67 ± 0.32 ^b	6.68 ± 0.52 ^b	3.69 ± 0.27 ^b	8.54 ± 0.45 ^b
T	3.21 ± 0.16 ^d	7.87 ± 0.59 ^d	10.75 ± 1.69 ^d	5.35 ± 0.34 ^d

^b $P < 0.01$ vs Ea; ^d $P < 0.01$ vs Eb.

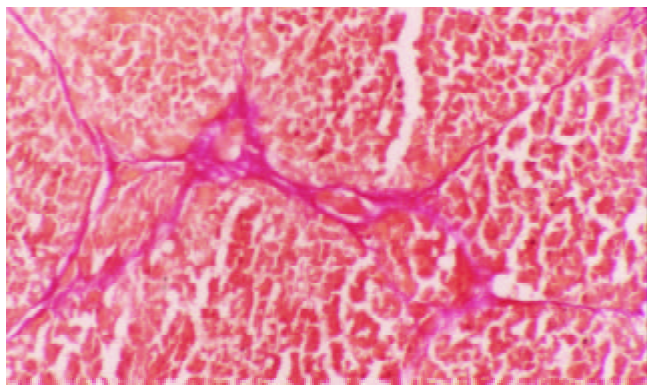


图1 Eb组大鼠肝组织VG染色 $\times 100$.

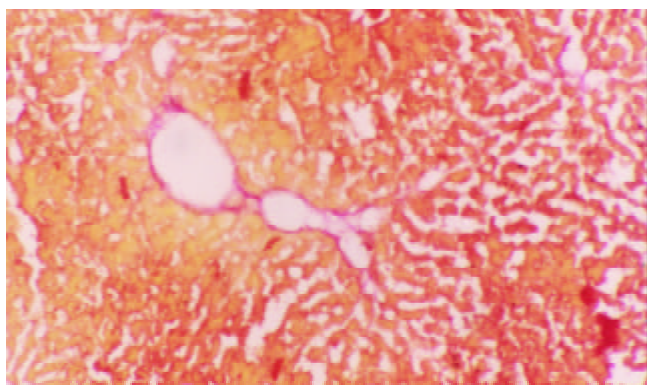


图2 T组大鼠肝组织VG染色 $\times 100$.

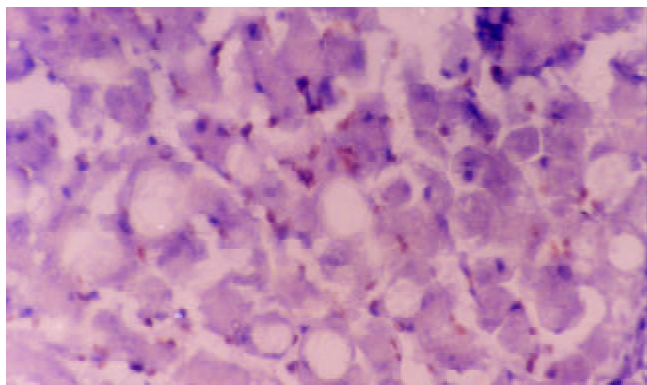


图3 Eb组大鼠肝组织MMP-3表达 $\times 400$.

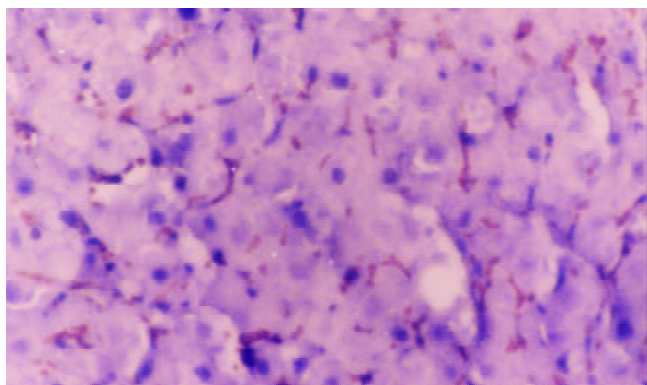


图4 T组大鼠肝组织MMP-3表达 $\times 400$.

3 讨论

Ang II在心、肾纤维化形成过程中的作用已得到证实^[8, 9],

如环孢素引起的肾小管间质纤维化可被ACEI所减轻^[10]; 同样, ACEI可减轻梗阻性肾病大鼠的IV型胶原的表达和间质的沉积^[11-13]. 有研究证实心、肾间质纤维母细胞和HSC均表达AT₁受体^[14-16]. 早期在体研究也表明血管紧张素II可以通过AT₁受体增加心肌成纤维细胞的I, III型胶原, 前胶原 α_1 和纤维连接素的mRNA表达水平^[10]. 近期国内外有研究表明ACEI类及血管紧张素II受体拮抗剂亦具有抗肝纤维化作用, 但均是在肝纤维化形成前即予以药物处理^[17, 18]. Ohishi et al^[3]用lisinopril预处理CCL₄诱导的肝纤维化实验, 能减缓肝纤维化的发生, 并发现血管紧张素II能上调前胶原 α_1 和TGF- β_1 的mRNA表达水平. 从临床应用角度看, 治疗肝纤维化有效的药物应该能阻止已形成的肝纤维化的进一步发展、甚至逆转肝纤维化. 本实验中无论是预防组抑或治疗组在肝细胞坏死, 脂肪变性, 炎性细胞浸润、胶原纤维增生等病理组织学方面, 及按纤维化分级标准所得到的平均纤维化积分方面均较相应实验对照组明显改善, 在治疗组甚至可见到纤维间隔吸收后的残留痕迹, 结果显示卡托普利不仅可以预防肝纤维化的发生, 而且可以逆转肝纤维化. 提示血管紧张素II可能是肝纤维化发生、发展的重要递质, 使用卡托普利能够阻止肝纤维化的发生、发展, 甚至逆转肝纤维化.

Benyon et al发现离体HSC受损早期短暂表达MMP-3^[16, 18], MMP-13和PA, 呈现基质降解相. 在大鼠和人类慢性肝病, 均存在MMP-1下调和MMP-2, MMP-9上调, 导致基底膜胶原降解增加, 间质胶原降解减少^[19-23]. Ninomiya et al用干扰素治疗慢性丙型肝炎后肝纤维化患者^[24, 25], 发现有纤维化逆转的患者血清MMP-1/TIMP-1比值增加, 而非干扰素治疗组血清MMP-1/TIMP-1比值下降; Rooprai et al^[26]在肿瘤研究中也发现卡托普利能降低MMP-2蛋白和基因的表达水平. 我们发现MMP-2在肝纤维化早期表达明显, 而MMP-3的表达随着肝纤维化的进展逐渐增加, 同时卡托普利预防组、治疗组的MMP-2表达明显低于相应实验对照组, MMP-3的表达高于相应实验对照组. 在肝纤维化过程中MMP-2与MMP-3表达的不一致, 提示不同的MMPs对纤维化的形成作用不同. 卡托普利能够抑制降解基底膜胶原的明胶酶MMP-2的表达, 而增加降解间质胶原的MMP-3的表达, 从而阻止了构架肝小叶的正常胶原的破坏, 促进了异常沉积的胶原降解.

我们发现随纤维化进展, TIMP-2, TIMP-3表达均增强, 卡托普利可明显抑制TIMP-3表达, 而对TIMP-2表达无抑制作用. 近年来研究发现激活pro-MMP-2不仅需要MT1-MMP, 还需要低浓度的TIMP-2的碳端结合pro-MMP-2的血红素蛋白区, 使pro-MMP-2接近活化的MT1-MMP, 而高浓度TIMP-2则抑制pro-MMP-2的活化^[27-30]. 这提示TIMP-2对MMP-2的调节可能具有双向作用.

4 参考文献

- 1 Li-Saw-Hee FL, Beevers DG, Lip GY. Effect of antihypertensive therapy using enalapril or losartan on haemostatic markers in essential hypertension: a pilot prospective randomised double-blind parallel group trial. *Int J Cardiol* 2001;78:241-246
- 2 Zaoui P, Cantin JF, Alimardani-Bessette M, Monier F, Halimi S, Morel F, Cordonnier D. Role of metalloproteases and inhibitors in the occurrence and progression of diabetic renal lesions. *Diabetes Metab* 2000;26(Suppl 4):25-29
- 3 Ohishi T, Saito H, Tsusaka K, Toda K, Inagaki H, Hamada Y, Kumagai N, Atsukawa K, Ishii H. Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatol Res* 2001;21:147-158
- 4 Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001;121:148-155
- 5 Ma L, Fogo AB. Role of angiotensin II in glomerular injury. *Semin Nephrol* 2001;21:544-553
- 6 Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. *Am J Clin Pathol* 2000;113:40-55
- 7 Lu X, Wang B, Xie Y, Liu C, Fu B. Dynamic change and expression of matrix metalloproteinase-2, -9 in alcoholic liver disease in rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:268-270
- 8 Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000;77:S93-98
- 9 Goineau S, Nisse-Durgeat S, Pape D, Guillo P, Ramee MP, Bellissant E. Systemic and regional hemodynamic and cardiac remodeling effects of candesartan in dilated cardiomyopathic hamsters with advanced congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40:189-200
- 10 Asai T, Nakatani T, Yamanaka S, Tamada S, Kishimoto T, Tashiro K, Nakao T, Okamura M, Kim S, Iwao H, Miura K. Magnesium supplementation prevents experimental chronic cyclosporine a nephrotoxicity via renin-angiotensin system independent mechanism. *Transplantation* 2002;74:784-791
- 11 Border WA, Noble N. Maximizing hemodynamic-independent effects of angiotensin II antagonists in fibrotic diseases. *Semin Nephrol* 2001;21:563-572
- 12 Hsieh MC, Lin SR, Hsieh TJ, Hsu CH, Chen HC, Shin SJ, Tsai JH. Increased frequency of angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1008-1013
- 13 Nakatani T, Asai T. Non-immunologic factor: immunosuppressive drug-induced nephrotoxicity. *Hinyokika Kiyo* 2002;48:699-705
- 14 Richer C, Fornes P, Domergue V, De Gasparo M, Giudicelli JF. Combined angiotensin II AT1-receptor blockade and angiotensin I-converting enzyme inhibition on survival and cardiac remodeling in chronic heart failure in rats. *J Card Fail* 2001;7:269-276
- 15 Zhou A, Yu L, Li J, Zhang J, Wang H. Renal protective effects of blocking the intrarenal renin-angiotensin system: angiotensin II type I receptor antagonist compared with angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Hypertens Res* 2000;23:391-397
- 16 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 17 Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 2001;35:376-385
- 18 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745-750
- 19 Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:92-98
- 20 Olasso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001;108:1369-1378
- 21 Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000;31:75-82
- 22 Chen PS, Zhai WR, Zhou XM, Zhang JS, Zhang Y, Ling YQ. Effects of different causes on the expression of matrix metalloproteinase 2 in hepatic stellate cells. *Zhonghua Gan zangbing Zazhi* 2002;10:279
- 23 Filanti C, Dickson GR, Di Martino D, Ulivi V, Sanguineti C, Romano P, Palermo C, Manduca P. The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. *J Bone Miner Res* 2000;15:2154-2168
- 24 Ninomiya T, Yoon S, Nagano H, Kumon Y, Seo Y, Kasuga M, Yano Y, Nakajima M, Hayashi Y. Significance of serum matrix metalloproteinases and their inhibitors on the antifibrogenetic effect of interferon-alfa in chronic hepatitis C patients. *Intervirology* 2001;44:227-231
- 25 黄宇琦, 王宇, 高毅, 魏银燕, 李朝龙, 杨继霞. A - 干扰素对大鼠肝纤维化间质胶原酶基因表达的调控. *世界华人消化杂志* 2000;8:579-580
- 26 Rooprai HK, Kandaneeratchi A, Maidment SL, Christidou M, Trillo-Pazos G, Dexter DT, Rucklidge GJ, Widmer W, Pilkington GJ. Evaluation of the effects of swainsonine, captopril, tangeretin and nobiletin on the biological behaviour of brain tumour cells in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:29-39
- 27 Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2001;114:131-139
- 28 Maquoui E, Frankenne F, Noel A, Krell HW, Grams F, Foidart JM. Type IV collagen induces matrix metalloproteinase 2 activation in HT1080 fibrosarcoma cells. *Exp Cell Res* 2000;261:348-359
- 29 Fleischmajer R, Kuroda K, Hazan R, Gordon RE, Lebowitz MG, Sapadin AN, Unda F, Iehara N, Yamada Y. Basement membrane alterations in psoriasis are accompanied by epidermal overexpression of MMP-2 and its inhibitor TIMP-2. *J Invest Dermatol* 2000;115:771-777
- 30 Toth M, Bernardo MM, Gervasi DC, Soloway PD, Wang Z, Bigg HF, Overall CM, DeClerck YA, Tschesche H, Cher ML, Brown S, Mobashery S, Fridman R. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem* 2000;275:41415-41423

垂体后叶素和特利加压素降低门胆汁性肝硬化大鼠门静脉高压对肝组织氧分压的影响

祝建波, 邓利群, 王思元

祝建波, 湖北民族学院医学院附属医院消化内科 湖北省恩施市 445000
邓利群, 湖北民族学院医学院病理教研室 湖北省恩施市 445000
王思元, 华中科技大学附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
祝建波, 男, 1962-08-27 生, 湖北京山县人, 汉族. 1983 年湖北医科大学本科毕业, 2001 年华中科技大学同济医学院医学硕士研究生毕业, 教授. 主任医师. 主要从事消化系统疾病的研究.
项目负责人: 祝建波, 445000, 湖北省恩施市, 湖北民族学院医学院附属医院消化内科.
收稿日期: 2001-10-12 接受日期: 2001-11-02

Effects of pituitrin and triglycyl-lysine-vasopressin on hepatic oxygen partial pressure in portal hypertensive rats

Jian-Bo Zhu, Li-Qun Deng, Si-Yuan Wang

Jian-Bo Zhu, Li-Qun Deng, Si-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Medical College of Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, Hubei Province, China
Correspondence to: Jian-Bo Zhu, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Medical College of Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, Hubei Province, China.
Received: 2001-10-12 Accepted: 2001-11-02

Abstract

AIM: To explore the different effects of pituitrin and triglycyl-lysine-vasopressin (tGLVP) on hepatic oxygen partial pressure ($P_{\text{H}_2\text{O}_2}$) while reducing the partial hypertension in portal hypertension rats.

METHODS: The model of biliary cirrhosis was induced by ligating the choledochus. Forty rats were divided into two groups randomly: pp group ($n=20$) and tGLVP group ($n=20$). PP and tGLVP were slowly infused into the rats via portal vein respectively. The portal vein pressure and the oxygen partial pressure were obtained at the moment before administration and 5, 10, 15, 25, 30 minutes after administration.

RESULTS: Portal venous pressure (PVP) was significantly lowered after infusion in two groups. There was no significant difference between the two groups ($t=0.39$, $P>0.05$). $P_{\text{H}_2\text{O}_2}$ was significantly decreased in pp group after infusion ($P<0.01$), but not in tGLVP group ($P<0.05$). There was significant difference between the two groups in $P_{\text{H}_2\text{O}_2}$ after infusion ($t=9.19$, $P<0.01$).

CONCLUSION: PP caused a significant decrease both in portal pressure and $P_{\text{H}_2\text{O}_2}$. PVP was decreased by tGLVP, but $P_{\text{H}_2\text{O}_2}$ was not decreased significantly. tGLVP is considered to be better than PP in treatment of acute variceal hemorrhage.

Zhu JB, Deng LQ, Wang SY. Effects of pituitrin and triglycyl-lysine-vasopressin on hepatic oxygen partial pressure in portal hypertensive rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1172-1174

摘要

目的: 探讨垂体后叶素和特利加压素降低肝硬化门脉高压时对肝组织氧分压的不同影响.

方法: 采用胆总管结扎法制作胆汁性肝硬化模型, 40 只大鼠随机分成 2 组: 垂体后叶素组($n_1=20$), 特利加压素组($n_2=20$), 两组分别从门静脉缓慢注入垂体后叶素和特利加压素, 连续观察用药前及用药后 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 的门静脉压及肝组织氧分压.

结果: 两组用药后门静脉压均明显降低, 两组间无显著差异($t=0.39$ $P>0.05$); 垂体后叶素组用药后肝组织氧分压明显下降, 特利加压素组无明显下降, 两组间有显著差异($t=9.19$ $P<0.01$).

结论: 垂体后叶素降低门静脉压时肝组织氧分压明显下降, 而特利加压素在降低门静脉压时肝组织氧分压无明显降低, 是治疗急性食管、胃静脉曲张破裂出血较理想的药物.

祝建波, 邓利群, 王思元. 垂体后叶素和特利加压素降低门胆汁性肝硬化大鼠门静脉高压对肝组织氧分压的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1172-1174
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1172.asp>

0 引言

门静脉高压症(PHT)常见, 其并发症 - 食管胃静脉曲张出血(EGVB)严重地威胁着患者的生命^[1-6]. 垂体后叶素和特利加压素(triglycyl-lysine vasopressin, tGLVP)仍是目前治疗急性 EGVB 的第一线药物^[7], 他们降低门静脉压 PVP 时对肝脏供血供氧的影响一直是许多研究的热点, 但迄今为止的研究都是通过有效肝血流量(EHBF)来评价他们对肝脏供血供氧的影响^[8-14]. 由于肝脏由肝动脉和门静脉双重供血, 而且 PHT 时肝动脉、肝静脉、门静脉之间均可发生短路, 因此仅用 EHBF 来评价肝脏供血供氧状况显然不够准确. 氧分压传感针能在体、实时、动态监测体内组织中的氧分压, 已用于实验研究^[15-20]. 为了解组织缺血缺氧状态提供了新的手段. 我们以胆汁性肝硬化大鼠模型为对象, 测定了分别静脉注射垂体后叶素和 tGLVP 前后肝硬化大鼠的 PVP 和肝组织氧分压($P_{\text{H}_2\text{O}_2}$), 旨在探讨垂体后叶素和 tGLVP 降低 PVP 时对肝组织供氧的不同影响, 为临床安全用药提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar 大鼠 40 只, 质量(281 ± 11) g, 由

华中科技大学同济医学院实验动物学部提供. 垂体后叶素由上海生物化学制药厂生产, tGLVP由瑞典FERRINGAB厂生产. SMUP-PC型生物信号处理系统, 由华中科技大学同济医学院生理教研室提供. 三通道组织氧测定仪由华中科技大学同济医学院生物工程研究室提供. 大鼠实验前禁食24 h, 自由饮水, 30 g/l 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉(剂量1 ml/kg 体重). 常规消毒、铺巾、沿腹白线切开入腹, 暴露并游离胆总管, 在近肝门和近十二指肠处分别结扎胆总管, 并从中剪断胆总管, 内脏复位后, 腹腔注射青霉素20万u, 缝合腹壁切口, 用复合饲料饲养6 wk即建成胆汁性肝硬化模型. 将40只模型大鼠随机分为2组: 垂体后叶素组($n_1=20$)从门静脉缓慢注入垂体后叶素(0.4 u/kg) 1 min内注完; tGLVP组($n_2=20$)从门静脉缓慢注入tGLVP (40 ug/kg)1 min内注完.

1.2 方法 大鼠实验前禁食24 h, 自由饮水. 30 g/l 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉(剂量0.5 ml/kg), 常规消毒、铺巾、沿腹白线切开入腹, 分离门静脉主干, 将细塑料管经回结肠静脉插入门静脉主干, 连接SMUP-PC型生物信号处理系统; 用酒精棉球擦洗大鼠尾, 并将大鼠尾尖3 cm部分浸入置有生理盐水的烧杯中, 将氧分压传感针也置入烧杯中调零, 然后, 暴露剑突下肝脏, 将氧分压传感针刺入肝组织中(5 mm), 室内温度保持在25℃左右, 待术后大鼠生理调节稳定20 min后, 从组织氧测定仪和生物信号处理系统显示屏上读出并记录用药前的 P_{tO_2} 和PVP. 然后从SMUP-PC型生物信号处理系统的三通接头注入VP 0.4 u/kg (VP组)或tGLVP 40 ug/kg (tGLVP组), 从显示屏读出并记录用药后5.10.15.25. 30 min时的

P_{tO_2} 和PVP. 实验结束后取肝组织于40 g/l 甲醛缓冲液固定, 常规脱水、包埋、切片、HE染色后用光学显微镜观察.

统计学处理 所有值均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用t检验, 规定 $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

模型制备6 wk后, 模型组所有大鼠均出现显著黄疸、胃肠瘀血、脾肝肿大及腹水. 肝脏表面呈细颗粒状, 被胆汁染成绿褐色. 组织学检查显示胆汁性肝硬化特征性表现, 即光镜下可见汇管区胆管明显扩张, 结缔组织增生显著, 有较多的新生胆管及炎性细胞浸润, 增生的结缔组织向小叶间及小叶内伸延分隔形成假小叶, 小叶内毛细胆管高度扩张, 扩张的胆管破裂形成胆湖(见图1, 2).

2.1 门静脉压力 用药前垂体后叶素组PVP为 2.02 ± 0.01 kpa, tGLVP组为 2.02 ± 0.07 Kpa. 两组间无明显差异($t=0.39$ $P > 0.05$). 用药后垂体后叶素组各时间段的PVP均较用药前明显下降($P < 0.01$)用药后tGLVP组各时段PVP均较用药前明显下降($P < 0.01$). 两组间用药后各时段的PVP均无明显差异($P > 0.05$, 表1).

2.2 肝组织氧分压 用药前垂体后叶素组 P_{tO_2} 为 11.95 ± 0.27 kpa, tGLVP组为 12.04 ± 0.41 kpa, 两组间无明显差异($t=0.39$ $P > 0.05$), 垂体后叶素组用药后各时段的 P_{tO_2} 均较用药前明显下降($P < 0.01$), tGLVP组用药后各时段的 P_{tO_2} 较用药前无明显下降($P > 0.05$), 但两组各时段间的 P_{tO_2} 均有显著差异($t=9.19$ $P < 0.01$, 表1).

表1 大鼠胆汁性肝硬化用药前后PVP改变 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

分组		用药前	用药后 (min)					
			5	10	15	20	25	30
PVP	垂体后叶素	2.01 ± 0.07	1.71 ± 0.09^b	1.54 ± 0.08^b	1.48 ± 0.07^b	1.490 ± 0.06^b	1.51 ± 0.06^b	1.52 ± 0.06^b
	tGLVP	2.02 ± 0.10	1.73 ± 0.23^b	1.61 ± 0.22^b	1.50 ± 0.06^b	1.48 ± 0.06^b	1.46 ± 0.06^b	1.47 ± 0.06^b
P_{tO_2}	垂体后叶素	11.95 ± 0.27	10.76 ± 0.46^d	10.34 ± 0.48^d	10.16 ± 0.46^d	10.01 ± 0.49^d	10.02 ± 0.50^d	9.93 ± 0.46^d
	tGLVP	12.04 ± 0.41	11.99 ± 0.37	11.95 ± 0.39	12.12 ± 0.38	11.95 ± 0.42	11.97 ± 0.31	12.01 ± 0.36

^b $P < 0.01$, 用药前 ^d $P < 0.01$ 用药前.

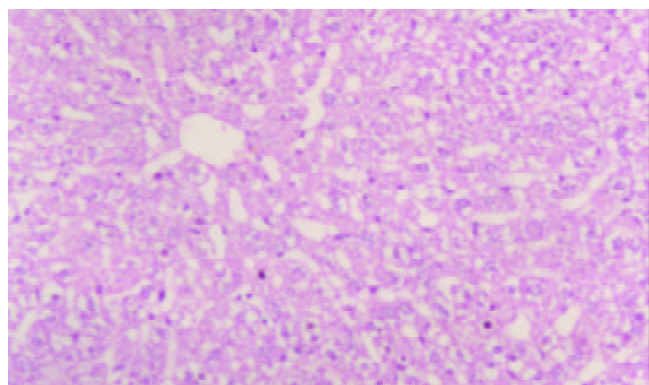


图1 正常肝组织 HE 染色(×100)

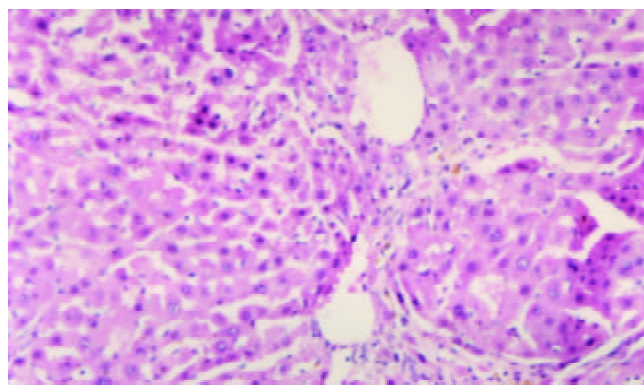


图2 肝硬化肝组织 HE 染色(×100)

3 讨论

垂体后叶素能明显降低PHT患者的PVP, PVBF, EHBF, 心输出量(CO)并引起平均动脉压增高, 但HAF并不增高^[8, 11, 21-26]。垂体后叶素降低PVP时是否引起肝细胞缺氧, 迄今为止的研究都是通过垂体后叶素对EHBF的影响来间接评价的, 由于肝脏血液供应的特殊性和PHT时肝内微循环发生紊乱, 此种评价方法显然存在着局限性^[18, 21, 23, 27]。我们首次通过 $P_{H_2O_2}$ 的测定证实了垂体后叶素在降低PHT大鼠的PVP时 $P_{H_2O_2}$ 也明显下降($P < 0.01$), 为研究VP降低PVP时对肝脏供血供氧的影响提供了一种新的方法。有的学者研究认为影响缺血性肝炎通常是由于肝组织低灌注所致, 当EHBF下降时可以引起肝细胞缺氧, 严重缺氧导致肝细胞损害。垂体后叶素在降低PVP、PVBF的同时明显减少EHBF, $P_{H_2O_2}$ 也明显下降, 因而临床上单用垂体后叶素治疗急性EGVB完全有可能诱发或加重肝硬化患者的缺血性肝炎, 应引起临床医师的高度重视。

tGLVP是人工合成的三甘氨酸-赖氨酸-加压素, 是一种无生物活性的加压素, 静脉注射后, 在体内缓慢的转化为有活性的赖氨酸-加压素^[11, 15, 23]。这种缓慢释放的机制使得tGLVP在一次给药后可维持平滑肌收缩长达10 h。tGLVP和垂体后叶素对PVP、PVBF、平均动脉压的影响是相似的, 二者之间最重要的差别是当PVP和PVBF下降时, tGLVP能使HAF代偿性的明显增加, 许多研究还表明^[14, 21] tGLVP不降低PHT的EHBF。本结果表明, tGLVP在明显降低PVP时 $P_{H_2O_2}$ 并无明显下降($P > 0.05$), 这可能与tGLVP降低PVP、PVBF时EHBF并不减少以及HAF代偿性增加有关。由于tGLVP作用时间长, 无心脏作用, 几乎没有血栓溶解作用, 且降低PVP时对 $P_{H_2O_2}$ 无明显影响, 因而是优于垂体后叶素治疗急性EGVB的较理想的药物。

4 参考文献

- 1 李梅春, 周永兴, 郝春秋, 雷香娥, 李光玉. B型超声对门脉高压症的诊断价值. 世界华人消化杂志 1999;7:306-308
- 2 李秋萍, 徐军全, 邢志华, 胡彩萍. 胃肠激素在肝硬变胃黏膜病变发病机制中的作用. 华人消化杂志 1998;6:789-790
- 3 李席如, 何泽生, 吴金生, 马庆久, 鲁建国, 武永忠. 门脉高压症患者脾动静脉结构成分的变化. 华人消化杂志 1998;6:760-761
- 4 保庭毅, 吴金生, 何泽生, 臧益民. 哌唑秦、育亨宾和硝苯吡啶对肝硬变门脉高压鼠门静脉的作用. 华人消化杂志 1998;6:757-759
- 5 褚延魁, 吴金生, 马庆永, 高德明, 王新. 肝硬变门脉高压形成中血浆TNF水平的变化. 华人消化杂志 1998;6:755-756
- 6 李席如, 何泽生, 吴金生, 马庆久. 肝硬变门脉高压症患者门脉及外周血内皮素的含量. 华人消化杂志 1998;6:827
- 7 Bratovic I, Lacevic N. Management of esophageal varices. *Med Arh* 2002;56(Suppl 1):11-12
- 8 Bhasin DK, Malhi NJ. Variceal bleeding and portal hypertension: much to learn, much to explore. *Endoscopy* 2002;34:119-128
- 9 Lin HC, Yang YY, Hou MC, Huang YT, Lee WC, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Hemodynamic effects of a combination of

- octreotide and terlipressin in patients with viral hepatitis related cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:482-487
- 10 Ramirez MC, Martinez-Cuesta MA, D' Ocon P, Noguera MA, Garcia-Zaragoza E, Bosch J, Melin P, Esplugues JV. Comparative effects of the novel vasotocin analogue F-180 vs. vasopressin and terlipressin on systemic and splanchnic isolated vessels from portal hypertensive rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001;364:199-204
- 11 Ramirez MC, Martinez-Cuesta MA, D' Ocon P, Noguera MA, Garcia-Zaragoza E, Bosch J, Melin P, Esplugues JV. New method of cardiac output measurement using ultrasound velocity dilution in rats. *J Appl Physiol* 2001;91:1274-1282
- 12 Garcia N Jr, Sanyal AJ. Portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2001;5:509-540
- 13 Vlavianos P, Westaby D. Management of acute variceal haemorrhage. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:335-342
- 14 Lee WC, Lin HC, Yang YY, Hou MC, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Hemodynamic effects of a combination of prazosin and terlipressin in patients with viral cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1210121-1210126
- 15 Hansen EF, Bendtsen F, Brinch K, Moller S, Henriksen JH, Becker U. Endoscopic Doppler ultrasound for measurement of azygos blood flow. Validation against thermodilution and assessment of pharmacological effects of terlipressin in portal hypertension. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:318-325
- 16 Huang HC, Chu CJ, Lee FY, Chang FY, Wang SS, Lin HC, Hou MC, Chan CC, Wu SL, Chen CT, Lee SD. Chronic inhibition of nitric oxide ameliorates splanchnic hyposensitivity to glypressin in a hemorrhage-transfused rat model of portal hypertension. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1308-1313
- 17 Lee FY, Chu CJ, Wang SS, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Chan CC, Wu SL, Chen CT, Huang HC, Lee SD. Inhibition of prostacyclin by indomethacin ameliorates the splanchnic hyposensitivity to glypressin in hemorrhage-transfused common bile duct-ligated rats. *Eur J Clin Invest* 2001;31:145-153
- 18 Wang SS, Chu CJ, Lee FY, Wu SL, Lin HC, Chan CC, Chang FY, Lee SD. Effects of prostacyclin inhibition on splanchnic hyposensitivity to glypressin in a hemorrhage-transfused rat model of portal hypertension. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:426-432
- 19 Bosch J. The sixth Carlos E. Rubio memorial lecture. prevention and treatment of variceal hemorrhage. *PR Health Sci J* 2000;19:57-67
- 20 Romero G, Kravetz D, Argonz J, Bidozola M, Suarez A, Terg R. Terlipressin is more effective in decreasing variceal pressure than portal pressure in cirrhotic patients. *J Hepatol* 2000;32:419-425
- 21 Arroyo V, Jimenez W. Complications of cirrhosis. II. Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):157-170
- 22 Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):141-156
- 23 Hansen EF, Strandberg C, Hojgaard L, Madsen J, Henriksen JH, Schroeder TV, Becker U, Bendtsen F. Splanchnic haemodynamics after intravenous terlipressin in anaesthetised healthy pigs. *J Hepatol* 1999;30:503-510
- 24 Oberti F, Veal N, Kaassis M, Pilette C, Rifflet H, Trouve R, Cales P. Hemodynamic effects of terlipressin and octreotide administration alone or in combination in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1998;29:103-111
- 25 Moller S, Hansen EF, Becker U, Brinch K, Henriksen JH, Bendtsen F. Central and systemic haemodynamic effects of terlipressin in portal hypertensive patients. *Liver* 2000;20:51-59
- 26 Huang YT, Lin LC, Chern JW, Lin HC, Hong CY. Portal hypotensive effects of combined terlipressin and DL-028, a synthetic alpha 1 adrenoceptor antagonist administration on anesthetized portal hypertensive rats. *Liver* 1999;19:129-134
- 27 Wolf DC. The management of variceal bleeding: past, present and future. *Mt Sinai J Med* 1999;66:1-13

电泳法检测肝和血清中醇脱氢酶同工酶

宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳

宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院
实验诊断科 上海市 200003

宓庆梅, 女, 1962-12 生, 汉族, 第二医科大学本科毕业, 讲师, 主管技师, 从事
肝脏酶学实验及研究。

项目负责人: 宓庆梅, 200003, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长
征医院实验诊断科。

电话: 020-63610109

收稿日期: 2002-12-05 接受日期: 2002-12-26

Detection of alcohol dehydrogenase isoenzymes in liver and serum by electrophoresis in liver disease

Qing-Mei Mi, Lu-Ning Cao, Chun-Fang Gao

Qing-Mei Mi, Lu-Ning Cao, Chun-Fang Gao, Changzheng Hospital, Second
Military Medical University, Shanghai 200003, China

Correspondence to: Qing-Mei Mi, Changzheng Hospital, Second Military
Medical University, Shanghai 200003, China.

Received: 2002-12-05 Accepted: 2002-12-26

Abstract

AIM: To establish an agarose gel electrophoretic method for detecting alcohol dehydrogenase isoenzymes in human serum or liver tissue.

METHODS: The samples of human liver tissue or serum were electrophoresed with 74 mmol/L diethylbarbital buffer (pH 8.6) of 10 g/L agarose gel. Electrophoresis can separate the Alcohol Dehydrogenase (ADH) isoenzymes to three bands clearly at 20 mA for 20 min in serum.

RESULTS: The total ADH activity in serum of sixty-seven patients with liver diseases was ranged from 0.013 Kat/L to 0.021 Kat/L. ADH I isoenzyme was ranged from 0.01 to 0.30 of the total activities. ADH III isoenzyme was from 0.12 to 0.31. ADH III was from 0.39 to 0.80. Total ADH activity in liver tissues of ten healthy subjects was ranged from 0.136 Kat/L to 0.196 Kat/L. ADH I isoenzyme was from 0.07 to 0.25 of the total activities. ADH III isoenzyme was ranged from 0.19 to 0.27. ADH III was from 0.56 to 0.73.

CONCLUSION: ADH activity is high in normal human liver. Three ADH isoenzymes can be separated with agarose gel electrophoresis. But serum ADH activity is low. High activities were obtained in serum from persons suffering from serious liver diseases.

Mi QM, Cao LN, Gao CF. Detection of alcohol dehydrogenase isoenzymes in liver and serum by electrophoresis in liver disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1175-1177

摘要

目的: 建立琼脂糖凝胶电泳法检测人血清醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase isoenzymes ADH EC 1.1.1.1)同工酶。

方法: 采用自制琼脂糖凝胶板, 摸索实验条件, 在 pH 8.6, 74 mmol/L 巴比妥电泳缓冲系统中进行 20 mA、20 min 电泳, 可清晰地分离出 ADH 同工酶三条区带。

结果: 检测了 67 例患者血清 ADH 总活性 0.013-0.021 Kat/L, 同工酶 ADH I 占 ADH 总活性 0.01-0.30, ADH II 占 ADH 总活性 0.12-0.31, ADH III 占 ADH 总活性 0.39-0.80。检测了 10 例人健康肝组织匀浆的 ADH 总活性为 0.136-0.196 Kat/L, 同工酶 ADH I 占总活性的 0.07-0.25, 同工酶 ADH II 占总活性的 0.19-0.27 和同工酶 ADH III 占总活性的 0.56-0.73。

结论: 正常人血清中 ADH 酶活性很低, 为 $0-1.8 \times 10^{-3}$ Kat/L, 其同工酶不易被检测出。而肝脏组织中含有大量 ADH 酶活性, 当肝脏受到严重损伤时, ADH 即从肝细胞内逸出, 进入血液, 使血清中 ADH 酶活性明显升高, 同时通过琼脂糖电泳对其同工酶的检测可测出三条区带, 帮助临床进一步了解肝细胞损伤程度, 对患者预后和病程的监测具有一定的临床意义。

宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳. 电泳法检测肝和血清中醇脱氢酶同工酶. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1175-1177

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1175.asp>

0 引言

人类醇脱氢酶(ADH, EC 1.1.1.1)在人体内, 主要催化醇与其相应的醛酮的互相变化。在人类肝脏内, 约有 20 多种醇脱氢酶同工酶^[1-7], 而基于其物理化学性质和电泳迁移率的不同, 大致可分为 3 种同工酶形式, ADH I, ADH II 和 ADH III。ADH I 由亚单位 α , β , γ 组成, ADH II 由亚单位 π 组成, ADH III 由亚单位 χ 组成。这 3 种同工酶都是由两聚体组成, 是个含有四原子锌的金属酶。亚单位 M_r 40 000, N-末端都有一组氨基酸, 整个酶的 M_r 80 000^[8]。

1 材料和方法

1.1 材料 丹麦 Amersham Pharmacia Biotech 电泳仪、美国 Helena 扫描仪、美国 GS-15R Centrifuge 离心机、日本 PRO Scientific Inc 匀浆仪、日本 7 020 Automatic Analyzer; 电泳槽缓冲液: 巴比妥-巴比妥钠缓冲液 pH 8.6。琼脂糖凝胶板: 10 g/L 琼脂糖加热, 溶于甘氨酸-Tris pH 8.2 缓冲液中。基质液: 乙醇 33.3 mmol/L, 戊醇 10 mmol/L, 氧化型辅酶 I (NAD^+) 2.5 mmol/L, 溶于甘氨酸-Tris pH 8.2 缓冲液中。显色液: 氯化亚硝基四氮唑蓝(NBT) 2.8 mmol/L。

吩噻二甲酯硫酸盐(PMS) 3.3 mmol/L, 溶于甘氨酸-Tris pH 8.2 缓冲液中. 固定漂洗液: 50 ml/L 冰醋酸液. 标本: 人肝脏组织取自 10 例猝死男性, 生前身体健康, 年龄 24-37 岁. 肝脏组织各 0.8 g, 分别加入 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液 pH 7.4 5 mL, 0 °C 条件下匀浆仪进行匀浆粉碎 5 min, 15 000 g × 30 min 离心, 取上清液, -70 °C 保存. 4 例患者血清取自于 4 例住院患者, 第 1 例诊断为急性心肌梗死, 第二例为服用大量安眠药患者, 第 3 例诊断为急性肝炎, 第 4 例诊断为糖尿病.

1.2 方法 测定 ADH 总活力基质液试剂 300 μL, 肝匀浆(稀释)或血样本 10 μL, 在日立 7020 全自动生化仪上, 37 °C, 340 nm 波长, 测定其 NADH 的吸光度 A 值的变化值, 计算 ADH 总活力单位.

$$\text{Kat/L} = \Delta A/\text{min} \div 6.3 \div 1.67 \times 10^{-4} \times 31 \times 10^3 = \Delta A/\text{min} \times 0.29$$

(6.3 × 10³ 为 340 nm 处 NADH 的摩尔吸光度)

1.3 ADH 同工酶的测定 加肝匀浆 5 μL 琼脂糖凝胶板上后静置片刻, 用 4 层纱布搭桥, 进行电泳. 取出凝胶板, 加基质液 1 μL 于凝胶板上, 置于 37 °C 水浴箱 25 min. 取凝胶板, 加 50 ml/L 冰醋酸 20 mL, 5 min, 漂洗凝胶板至底色透明. 用 Helena 扫描仪 570 nm 波长直接扫描定量分析.

2 结果

分别用 3, 5, 8 μL 样品量加样后进行电泳, 结果显示样品量为 5 μL 最适宜. 分别作基质液孵育 10, 20, 30 min 测定, 其结果经 Helena 扫描仪扫描, 基本一致, 但是最佳条件为 20 min, 区带显色完全, 底板着色适宜. 10 例正常人肝匀浆琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 4 例患者血清 ADH 同工酶的检测结果见图 2. 临床工作中检测了 67 例患者血样, 其同工酶的分布是 ADH I 0.01-0.30, ADH II 0.12 - 0.31, ADH III 0.39 - 0.80. 这 67 例患者都有严重肝脏组织损伤.

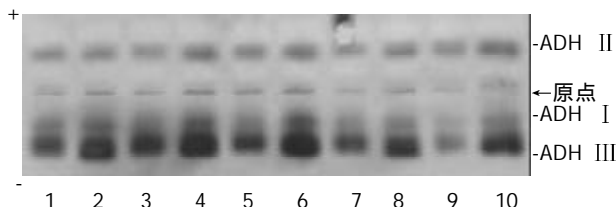


图 1 10 例正常人肝匀浆琼脂糖凝胶电泳结果.

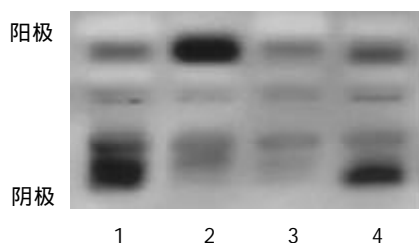


图 2 4 例患者血清 ADH 同工酶的检测图谱.

3 讨论

人类肝匀浆的 ADH 同工酶研究国外报道很多^[9-17], 在我国报道很少, 对血液的研究报道就更少. 我们主要建立一种新的琼脂糖凝胶电泳法, 在 pH 8.6 巴比妥-巴比妥钠电泳缓冲液中, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶作支持物, 对人类血液或肝匀浆进行电泳. 条件为: 电压 130 V, 时间 20 min, 用乙醇和戊醇作为底物, 加入 NAD⁺, PMS 和 NBT, 37 °C 温育 20 min, 能简便、灵敏、快速的将血液、肝匀浆 ADH 分离成清晰的 3 条蓝色区带. 通过扫描仪 570 nm 波长扫描, 可对 ADH 同工酶定量分析.

肝匀浆 ADH 总活性为 0.136-0.196 Kat/L, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 根据电泳迁移率和物理化学性质的不同, 从阳极到阴极分别为 ADH I, ADH II 和 ADH III. 其中 ADH I 占 0.07-0.25, ADH II 占 0.18-0.26, ADH III 占 0.56-0.73. ADH I : II : III 约 1 : 1.7 : 5.4. ADH III 最高, ADH I 最少, 且不耐热, 放置于室温 10 h 就失活.

正常人血清中 ADH 酶活性很低, 一般不易被检测出^[4, 5]. 当患者由于缺氧导致肝脏受到严重损伤时, ADH 大量从肝细胞内逸出血, 血清中 ADH 酶活性明显升高, ADH 在血清中出现的多少直接反映了肝脏的损害程度, 此时可通过检测血中其同工酶 ADH I, ADH II, ADH III 的活性, 对进一步了解患者肝细胞结构损伤程度, 估价其损伤的预后和对患者病程的监测具有一定的临床意义^[5-9].

图 2 中例 1 为急性心肌梗死, 伴有严重肝脏组织损伤, 导致同工酶 ADH III 占 0.75, 于发病后 4 d 死亡. 例 2, 女, 23 岁, 服用大量安眠药致昏迷, ADH I 为 0.78, ADH II 0.12, ADH III 0.10, 第 2 天死亡. 例 4, 男, 46 岁, 糖尿病患者, 其 ADH 活性明显升高, ADH III 0.57, 也于第 5 天死亡. 例 3, 急性肝炎患者, ADH I 0.47, ADH II 0.29, ADH III 0.24, 该患者经过 1 mo 的治疗后出院.

国外有琼脂糖凝胶电泳测定乳酸脱氢酶同工酶的时候发现有同工酶“LDH6”出现的报道^[18, 19]. 国内在 1984 年有也类似报道^[20]. 我们在检测 LDH 同工酶时, 也发现了有“LDH6”的出现, 经过分离、提取, 再经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 一半凝胶膜测定“LDH6”的 M_r 为 80 000, 另一半用以免疫固定(Western 印迹法)鉴定“LDH6”, 结果在 M_r 80 000 处有一条显色带, 鉴定该“LDH6”区带即为 ADH III. 同时, 肝癌组织内均存有大量“LDH6”. 我们在临床上测定了 100 例乳酸脱氢酶高的患者, 当“LDH6”活性占总乳酸脱氢酶活性 0.08 以上时, 有 91.3 % 的患者 1 wk 左右即死亡.

肝脏受到严重损伤, ADH 即从肝脏内释放入血, 使血清内 ADH 明显升高^[21-23], Chrostek et al^[24]经研究统计认为肝损伤患者 ADH I 明显升高, 其活性升高同转氨酶相关. Chao et al^[29]认为 ADH 同工酶与肝硬化有一定关系^[22-32]. 但肝脏损伤后 ADH 一旦释放入血, 会

导致 LDH 测定时受到 ADH - “LDH6” 的干扰, 并且其活性占总 LDH 活性 0.08 以上时, 患者 1 wk 左右即死亡, 其致死机制与 ADH 的从肝内细胞大量释放的相关性有多少, ADH I、II、III 哪一条带的明显升高对临床更有意义, 目前还不知道, 还有待继续的研究和观察。

4 参考文献

- 1 Duester G, Hatfield GW, Buhler R, Hempel J, Jornvall H, Smith M. Molecular cloning and characterization of a cDNA for the beta subunit of human alcohol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4055-4059
- 2 Fong WP, Keung WM. Substrate specificity of human class I alcohol dehydrogenase homo- and heterodimers containing the beta 2 (Oriental) subunit. *Biochemistry* 1987;26:5726-5732
- 3 Montavon P, Felber JP, Holmquist B, Vallee BL. A human liver alcohol dehydrogenase enzyme-linked immunosorbent assay method specific for class I, II and III isozymes. *Anal Biochem* 1989;176:48-56
- 4 Moulis JM, Holmquist B, Vallee BL. Hydrophobic anion activation of human liver chi chi alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 1991;30:5743-5749
- 5 Tsui HT, Mock WY, Lau KK, Fong WP. Proteolytic activation of grass carp (*Ctenopharygodon idellus*) liver alcohol dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996;1296:41-46
- 6 Watabiki T, Tokiyasu T, Yoshida M, Okii Y, Yoshimura S, Akane A. Intralobular distribution of class I alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase 2 activities in the hamster liver. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23(4 Suppl):52S-55S
- 7 Connally HE, Hamar DW, Thrall MA. Inhibition of canine and feline alcohol dehydrogenase activity by fomepizole. *Am J Vet Res* 2000;61:450-455
- 8 Wang Y, Schubert M, Ingendoh A, Franzen J. Analysis of non-covalent protein complexes up to 290 kDa using electrospray ionization and ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14:12-17
- 9 Jensen DE, Belka GK, DuBois GC. S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J* 1998;331(Pt 2):659-68
- 10 卓孝福, 陈仁奋, 郑靖. 血清乙醇脱氢酶活性测定及其临床意义. 上海医学检验杂志 1998;13:84-86
- 11 Van ophem PW, Van Beeumen J, Duine JA. Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol /aldehyde oxidoreductases purification and characterization of a novel type from amycolatopsis methanolic. *Eur J Biochem* 1993;212:819-826
- 12 Keung WM, Ditlow CC, Vallee BL. Identification of human alcohol dehydrogenase isozymes by disc polyacrylamide gel electrophoresis in 7 M urea. *Anal Biochem* 1985;151:92-96
- 13 O'Carra P, Griffin T, O'Flaherty M, Kelly N, Mulcahy P. Further studies on the bioaffinity chromatography of NAD(+)-dependent dehydrogenases using the locking-on effect. *Biochimica Biophysica Acta* 1996;1297:235-243
- 14 Dausmann T, Aivasidis A, Wandrey C. Purification and characterization of an alcohol:N, N-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase from the methanogen methanosarcina barkeri DSM 804 strain fusaro. *Eur J Biochem* 1997;248:889-896
- 15 Bosron WF, Li TK, Bosron WF, Li TK, Vallee BL. Heterogeneity and new molecular forms of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;91:1549-1555
- 16 Onorato VA, Manly KF, Vladutiu AO. Association of an oxygen-sensitive lactate dehydrogenase isoenzyme, LDk, with LD-6 in serum of critically ill patients. *Clin Chem* 1984;30:1603-1606
- 17 Aasmoe L, Winberg JO, Aarbakke J. The role of liver alcohol dehydrogenase isoenzymes in the oxidation of glycoethers in male and female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;150:86-90
- 18 Ketchum CH, Robinson CA, Hall LM, Grizzle WE, Maclaren NK, Riley WJ, Trost C. Clinical significance and partial biochemical characterization of lactate dehydrogenase isoenzyme 6. *Clin Chem* 1984;30:46-49
- 19 Kato S, Ishii H, Kano S, Horii K, Tsuchiya M. Evidence that "lactate dehydrogenase isoenzyme 6" is in fact alcohol dehydrogenase. *Clin Chem* 1984;30:1585-1586
- 20 陈文杰, 刘扬华, 董维兰, 缪李丽, 张成芳, 刘利阳, 史常志. 亚急性心肌梗塞合并心衰伴 LDH₆ 例报告. 中华医学杂志 1985;65:633-633
- 21 Ditlow CC, Holmquist B, Morelock MM, Vallee BL. Physical and enzymatic properties of a class II alcohol dehydrogenase isozyme of human liver: pi-ADH. *Biochemistry* 1984;23:6363-6368
- 22 Wagner FW, Pares X, Holmquist B, Vallee BL. Physical and enzymatic properties of a class III isozyme of human liver alcohol dehydrogenase: chi-ADH. *Biochemistry* 1984;23:2193-2199
- 23 Strydom DJ, Vallee BL. Characterization of human Alcohol dehydrogenase isoenzymes by high-performance liquid chromatographic peptide mapping. *Anal Biochem* 1982;123:422-429
- 24 Chrostek L, Szmitkowski M. Isoenzymes of class I and II alcohol dehydrogenase in chronic hepatitis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:145-147
- 25 Bello AT, Bora NS, Lange LG, Bora PS. Cardioprotective effects of alcohol: mediation by human vascular alcohol dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1858-1864
- 26 Chrostek L, Szmitkowski M. Activity of class I and II isoenzymes of alcohol dehydrogenase measured by a fluorometric method in the sera of patients with obstructive jaundice. *Clinica Chimica Acta* 1997;263:117-122
- 27 Borrás E, Coutelle C, Rosell A, Fernandez-Muixi F, Broch M, Crosas B, Hjeltnqvist L, Lorenzo A, Gutierrez C, Santos M, Szczepanek M, Heilig M, Quattrocchi P, Farres J, Vidal F, Richart C, Mach T, Bogdal J, Jornvall H, Seitz HK, Couzigou P, Pares X. Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in europeans: the ADH2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH3*1. *Hepatology* 2000;31:984-989
- 28 Marschall HU, Oppermann UC, Svensson S, Nordling E, Persson B, Hoog JO, Jornvall H. Human liver class I alcohol dehydrogenase gamma gamma isozyme: the sole cytosolic 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase of iso bile acids. *Hepatology* 2000;31:990-996
- 29 Chao YC, Wang LS, Hsieh TY, Chu CW, Chang FY, Chu HC. Chinese alcoholic patients with esophageal cancer are genetically different from alcoholics with acute pancreatitis and liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2958-2964
- 30 Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med* 2000;67:84-94
- 31 Pastino GM, Flynn EJ, Sultatos LG. Genetic polymorphisms in ethanol metabolism: issues and goals for physiologically based pharmacokinetic modeling. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2958-2964
- 32 Cheung B, Holmes RS, Eastaugh S, Beacham IR. Evolution of class I alcohol dehydrogenase genes in catarrhine primates: gene conversion, substitution rates, and gene regulation. *Drug Chem Toxicol* 2000;23:179-201

肝细胞生成素核受体的确定及特性

王 阁, 陈东风, 胡 谔, 王 军, 樊丽琳, 张晓荣

王阁, 陈东风, 胡谔, 王军, 樊丽琳, 张晓荣, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400042
王阁, 男, 34岁, 副教授、副主任医师, 硕士生导师, 发表论文24篇, 2002年“全国百篇优秀博士学位论文”获得者。主要从事肝再生方面研究。
国家自然科学基金, No.29900073
项目负责人: 王阁, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科。 wangge70@hotmail.com
电话: 023-68757342
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-02-18

Identification and characterization of nuclear receptor for hepatopoietin

Ge Wang, Dong-Feng Chen, Lu Hu, Jun Wang, Li-Lin Fan, Xiao-Rong Zhang

Ge Wang, Dong-Feng Chen, Lu Hu, Jun Wang, Li-Lin Fan, Xiao-Rong Zhang, Department of Gastroenterology, Daping Hospital of the Third Military Medical College, Chongqing 400042, China
Supported by the China National Natural Science Foundation, No. 29900073
Correspondence to: Dr. Ge Wang, Department of Gastroenterology, Daping Hospital of the Third Military Medical College, Chongqing 400042, China. wangge70@hotmail.com
Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-02-18

Abstract

AIM: To determine whether Hepatopoietin(HPO) acts via a novel nuclear receptor based signal transduction pathway.

METHODS: ^{125}I -HPO was used to characterize its binding activity by specific displacement test and Scatchard analysis in nuclear extracts of primarily cultured rat hepatocytes and human hepatoma cells. ^{125}I -HPO bound to its receptor complex by micro autoradiograph for the HPO receptor in HepG2 cells.

RESULTS: The binding was saturable and specific since it was replaceable by HPO but not by EGF, thyroid hormone or growth hormone. Scatchard analysis indicated the presence of a single class of high affinity receptor with dissociation constant (Kd) of 35 pmol and 12 pmol, and a receptor density of about 1.7×10^9 sites/g and 5.0×10^9 sites/g, in the rat hepatocytes and human hepatoma cells, respectively. Autoradiograph of the receptor showed that the receptor grains were well distributed around hepatocytes nuclei.

CONCLUSION: These data demonstrate the existence of HPO nuclear receptor in hepatocytes and hepatoma cells, which involves in hepatocytes proliferation signal transduction.

Wang G, Chen DF, Hu L, Wang J, Fan LL, Zhang XR. Identification and characterization of nuclear receptor for hepatopoietin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1178-1181

摘要

目的: 肝细胞生成素(HPO)特异性刺激肝细胞增生的信号转

导存在特异性核受体信号转导途径。

方法: 利用 ^{125}I 标记的HPO, 通过受体结合和特异性竞争抑制实验及Scatchard分析原代培养大鼠肝细胞和肝癌细胞核抽提物中核受体。

结果: 原代培养大鼠肝细胞和肝癌细胞核抽提物中存在核受体, 核受体数量分别为 $1.7 \times 10^9/\text{g}$ 和 $5.0 \times 10^9/\text{g}$, 平衡解离常数(Kd)分别为 35 pmol 及 12 pmol, 且存在数量上和亲和力的差异, 此结合不能被EGF、生长激素和甲状腺激素所竞争抑制。HepG2细胞放射自显影显示HPO核受体的存在。

结论: HPO促肝细胞增生作用可以通过肝细胞核受体介导。

王阁, 陈东风, 胡谔, 王军, 樊丽琳, 张晓荣. 肝细胞生成素核受体的确定及特性. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1178-1181

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1178.asp>

0 引言

肝细胞生成素(HPO)是一类来源于肝脏自身、特异性刺激肝细胞增生的小分子物质。前面实验结果证实HPO通过膜受体介导在体外不仅对原代培养的大鼠肝细胞、人胎肝细胞有刺激DNA合成作用, 而且对肝癌细胞也有直接刺激增生作用。HPO可促使肝细胞从G₀/G₁期进入S期^[1-24], 进一步发现在HepG2肝癌细胞生长中, HPO以一种自分泌和旁分泌作用机制发挥生物学效应。许多的生长因子具有核转位(nuclear translocation)现象, 并且在核内有相应的受体或结合蛋白的存在, 其中有与肝再生密切相关的细胞因子, 如EGF, TGF- α 和aFGF等, 他们不仅有膜受体, 也有核受体^[25, 26]。HPO是否存在核受体, 国内外至今未见任何报道。放射配基结合分析法是研究受体特性的经典方法, 因此我们利用前面具有高活性低失活已碘标记的HPO^[4], 通过受体配基结合竞争实验和放射自显影方法, 首次证实HPO核受体的存在, 并对核HPO受体的特性进行初步的研究。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠, 体质量200 \pm 20 g, 本院实验中心提供。HepG2细胞本科室保存。IV型核乳胶、Na¹²⁵I购自Amersham公司。HPO为自行构建的PBV-hHPO表达菌株, 经诱导表达, 纯化, 获纯度>95% HPO^[8]。利用氯胺T法¹²⁵I标记HPO。IV型胶原酶为Sigma产品。

细胞培养耗材均为 GIBCO 产品。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代肝细胞和细胞株的分离及培养 大鼠原代肝细胞分离参考 Seglen 方法^[27, 28], 将细胞悬液于含 100 ml/L FCS、青链霉素的 DMEM 中, 计数后将细胞铺于 10 cm 培养皿, 在 37 °C, 50 ml/L CO₂ 的孵箱中培养, 细胞密度为 5×10^5 /ml. 分离及培养 HepG2 细胞株, 将细胞悬液置于 100 ml/L FCS、DMEM 培养液中, 铺于 10 cm 培养皿, 在 37 °C, 50 ml/L CO₂ 的孵箱中培养, 细胞密度为 5×10^8 /L.

1.2.2 ¹²⁵I-HPO 受体结合实验^[29-31] 原代大鼠肝细胞、HepG2、COS-7 细胞、K562 细胞和 Hep2 细胞培养 24 h 后, 观察细胞贴壁生长良好, 利用蔗糖密度离心获得细胞核抽提物(50 g/L), 用结合缓冲液(20 mmol/L Hepes, 2 g/L BSA/Hanks, pH=7.0)冲洗 2 遍, 一组用不同浓度的 ¹²⁵I-HPO 加入每孔反应, 另一组在加入不同浓度的 ¹²⁵I-HPO 的同时加入相应浓度为 1 000 倍的未标记 HPO 进行反应, 在 4 °C 下摇床内反应 24 h, 再用 4 °C 的结合缓冲液冲洗 5 遍, 进行 *g*-计数仪计数, 完成受体结合曲线及 Scatchard 作图。

选择一组 ¹²⁵I-HPO 浓度为恒定反应浓度(1 pmol), 再分别加入 500 倍, 100 倍, 50 倍, 20 倍, 10 倍, 5 倍, 2 倍于 ¹²⁵I-HPO 反应浓度的未标记 HPO, 另外一组加入不同浓度的 EGF、甲状腺激素和生长激素, 反应条件同前, 最后收集细胞进行 *g*-计数仪计数, 制作特异性竞争抑制曲线。

1.2.3 HepG2 上 HPO 受体的放射自显影 接种 HepG2 细胞悬液于加有盖玻片的 35 mm 平皿中, 细胞密度为 5×10^2 /孔, 每孔加入含 100 ml/L FCS 的 DMEM 1ml, 37 °C, 50 ml/L CO₂ 孵箱培养 24 h 后, 用 Hanks 液冲洗细胞 1 次, 加入预先在 37 °C 预热 20 min 的含 ¹²⁵I-HPO, 50 ml/L FCS 的 DMEM 培养液, 浓度为 37 k Bq/L, 37 °C 孵育 24 h, 用 Hanks 液冲洗 3 次, 再用 70 % 酒精固定 30 min, 暗室中涂抹核乳胶, -20 °C 暗盒曝光 3-5 d, 显影定影后用 Giemsa 染色 5 min, 酒精逐级脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 光镜观察。

2 结果

2.1 ¹²⁵I-HPO 与核受体结合 通过受体结合实验和结合竞争抑制实验发现, 肝源性细胞包括正常肝细胞(原代培养大鼠肝细胞)与非正常肝细胞(HepG2 肝癌细胞等) 核抽提物与 ¹²⁵I-HPO 反应具有剂量效应关系, 以原代培养大鼠肝细胞和 HepG2 细胞核抽提物为代表进行分析。图 1A 示 ¹²⁵I-HPO 原代培养大鼠肝细胞核抽提物结合实验的典型饱和结合曲线, 图 1B 为 Scatchard 作图分析, 其最大结合位点数量为 1.7×10^9 /g, K_d 值为 35 pmol; 图 1C 代表 ¹²⁵I-HPO 与 HepG2 肝癌细胞受体结合实验的典型饱和曲线, 图 1D 为 Scatchard 作图分析其最大结合位点 5.0×10^9 /g, K_d 值为 12 pmol; 来源于其他组织的非肝

源性细胞, 如 COS-7 细胞、K562 细胞、Hep2 细胞和 CHO 细胞核抽提物与 ¹²⁵I-HPO 均无明显的剂量效应关系。

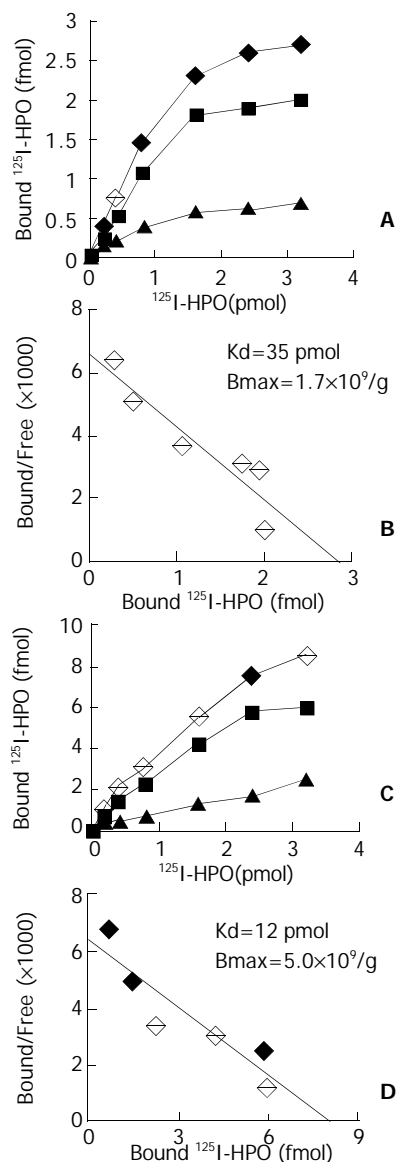


图 1 ¹²⁵I-HPO 与肝细胞受体结合典型饱和结合曲线和 Scatchard 作图。(◆) 总结合曲线(■)特异性曲线(▲)非特异性曲线。

2.2 ¹²⁵I-HPO 与核受体结合的特异性实验 只有未标记的 HPO 可竞争抑制 ¹²⁵I-HPO 与核受体的结合(图 2), 并呈剂量效应关系, 在浓度为反应浓度的 100 倍左右时可发生完全竞争抑制, 而 EGF、生长激素和甲状腺激素却不能竞争抑制 ¹²⁵I-HPO 与核受体的结合。

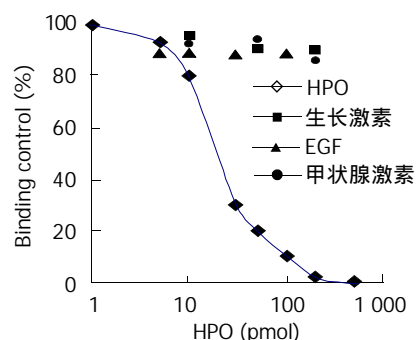


图 2 ¹²⁵I-HPO 与核受体特异性结合典型的竞争抑制曲线。

2.3 HepG2细胞HPO核受体的放射自显影 在受体与配基已发生结合的HepG2细胞上,可见一部分以细胞质为中心簇集着直径为1-2 μm 的黑色圆形颗粒,代表

^{125}I -HPO与膜受体结合后形成的复合物^[4],一部分以细胞核为中心簇集,代表 ^{125}I -HPO与核受体结合后形成的复合物,表明HPO核受体的存在(图3).



图3 HepG2细胞HPO核受体的放射自显影($\times 600$).

3 讨论

HPO刺激肝细胞增生通过与靶细胞膜上特异性受体结合而发挥生物学效应的,HPO受体具有高度特异性,可逆性和饱和性,其组织分布和细胞定位具有特异性,原代大鼠肝细胞、肝癌细胞和人胎肝细胞上均有HPO的受体,但在数量和亲和力上存在明显的差异.通过调节受体的数量和亲和力发挥着HPO在肝细胞生长发育中的重要作用.HPO可能通过自分泌和旁分泌方式调控肝细胞的生长发育,受体数目与亲和力的变化或HPO产生的异常可能是肝癌发生的机制之一.通过 ^{125}I 标记的HPO,观察 ^{125}I -HPO与大鼠肝细胞和肝癌细胞核抽提物的结合,发现 ^{125}I -HPO与核抽提物有剂量效应关系,且有饱和趋向及可逆性,即结合后若再加入大量未标记HPO,则 ^{125}I -HPO与细胞核结合位点的结合下降;另外,其结合具有特异性,即加入EGF、生长激素和甲状腺激素, ^{125}I -HPO与肝细胞结合位点不受影响,与核抽提物均无明显的剂量效应关系,结果证明肝细胞核抽提物中的特异性位点可能就是HPO的核受体,具有特异性,可逆性和饱和性.

核受体具有转录活性,结构中有与特异配体结合的功能域,在配体存在或不存在的条件下与不同的蛋白分子作用,调控相关基因的转录^[32-34].肝细胞可自分泌HPO,HPO的核受体的存在提示,在肝细胞处于增生静息(G_0)期时,HPO核受体可能以同源或异源二聚体(辅助因子)的形式与DNA相应作用区段结合,抑制DNA的转录;在外源性肝再生信号或HPO配体转运到达肝细胞核内,HPO核受体同源或异源二聚体发生构象的变化,DNA转录抑制的解除,发生肝细胞DNA的转录,产生肝细胞增生效应.在虽然原代大鼠肝细胞和肝癌细胞上核抽提物中均有HPO的受体,但在数量和亲和力上存在明显的差异.原代大鼠肝细胞上核抽提物中受体的数量少,亲和力低;肝癌细胞上受体的数量多,亲和力高;肝细胞HPO核受体在不同生理病理状态下所表现的不同状况,提示肝细胞中HPO核受体数目

与亲和力的变化可能是肝癌发生有关.

4 参考文献

- Li Y, Xing G, Wang Q, Li M, Wei H, Fan G, Chen J, Yang X, Wu C, Chen H, He F. Hepatopoietin acts as an autocrine growth factor in hepatoma cells. *DNA Cell Biol* 2001;20:791-795
- Wang G, Zhang XR, Hu L, Wang J, Leng ER, Fang DC, Yang XM, Zhang Y, He FC. Rapid induction of mRNAs for liver regeneration genes by hepatopoietin and partial hepatectomy. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002;10:256-259
- An W, Du HJ, Chen L. Increased cellular proliferation in BEL-7402 hepatoma cells transfected by human hepatic stimulator substance gene. *Shengli Xuebao* 2001;53:473-477
- Wang G, Yang X, Zhang Y, Wang Q, Chen H, Wei H, Xing G, Xie L, Hu Z, Zhang C, Fang D, Wu C, He F. Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. *J Biol Chem* 1999;174:11469-11472
- Cheng J, Zhong Y. Cloning and sequence analysis of human genomic DNA of augmentor of liver regeneration hepatitis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:12-14
- Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, Hagiya M, Okita K. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases. *J Gastroenterol* 2000;35:112-119
- Li Y, Li M, Xing G, Hu Z, Wang Q, Dong C, Wei H, Fan G, Chen J, Yang X, Zhao S, Chen H, Guan K, Wu C, Zhang C, He F. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin. *J Biol Chem* 2000;275:37443-37447
- Adams GA, Maestri M, Squiers EC, Alfrey EJ, Starzl TE, Dafoe DC. Augmenter of liver regeneration enhances the success rate of fetal pancreas transplantation in rodents. *Transplantation* 1998;65:32-36
- Stein G, Lisowsky T. Functional comparison of the yeast scERV1 and scERV2 genes. *Yeast* 1998;14:171-180
- Li Y, Wang HY, Cho CH. Effects of heparin on hepatic regeneration and function after partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol* 1999;5:305-307
- Gandhi CR, Kuddus R, Subbotin VM, Prelich J, Murase N, Rao AS, Nalesnik MA, Watkins SC, DeLeo A, Trucco M, Starzl TE. A fresh look at augmentor of liver regeneration in rats. *Hepatology* 1999;29:1435-1445
- Hofhaus G, Stein G, Polimeno L, Francavilla A, Lisowsky T. Highly divergent amino termini of the homologous human ALR and yeast scERV1 gene products define species specific differences in cellular localization. *Eur J Cell Biol* 1999;78:349-356
- Becher D, Kricke J, Stein G, Lisowsky T. A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. *Yeast* 1999;15:1171-1181

- 14 Liu Q, Wang Z, Luo Y. The cDNA clone and sequence analysis of the coding region of human augments of liver regeneration (hALR) gene. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1999;7:156-158
- 15 Yang X, Wang A, Zhou P, Wang Q, Wei H, Wu Z, He F. Protective effect of recombinant human augments of liver regeneration on CCl₄-induced hepatitis in mice. *Chin Med J* 1998;111:625-629
- 16 Dong J, Cheng J, Liu Y, Wang Q, Wang G, Shi S, Si C. Cloning and sequence analysis of a pseudogene of liver regeneration augments in rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:105-107
- 17 Lu C, Li Y, Zhao Y, Xing G, Tang F, Wang Q, Sun Y, Wei H, Yang X, Wu C, Chen J, Guan KL, Zhang C, Chen H, He F. Intracrine hepatopoietin potentiates AP-1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway. *FASEB J* 2002;16:90-92
- 18 Theocharis SE, Margeli AP, Agapitos EV, Mykoniatis MG, Kittas CN, Davaris PS. Effect of hepatic stimulator substance administration on tissue regeneration due to thioacetamide-induced liver injury in rats. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:656-663
- 19 Liakos AA, Mykoniatis MG, Kokala ME, Papadimitriou DG, Liatsos GD. Levels of hepatic stimulator substance in liver regenerating process of partially hepatectomized rats pre-treated with a single dose of carbon tetrachloride. *Dig Dis Sci* 1999;44:1046-1053
- 20 Zhang BH, Gong DZ, Mei MH. Protection of regenerating liver after partial hepatectomy from carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: role of hepatic stimulator substance. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:1010-1017
- 21 Margeli AP, Skaltsas SD, Spiliopoulou CA, Mykoniatis MG, Theocharis SE. Hepatic stimulator substance activity in the liver of thioacetamide-intoxicated rats. *Liver* 1999;19:519-525
- 22 Margeli AP, Manolis E, Skaltsas SN, Tsarpalis KS, Mykoniatis MG, Theocharis SE. Hepatic stimulator substance activity in animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Dig Dis Sci* 2002;47:2170-2178
- 23 Zhang Y, Yang XM, Wang G, He FC. Biological activity of recombinant human hepatopoietin. *Shengli Xuebao* 1999;51:347-350
- 24 Brenner DA. Signal transduction during liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13(Suppl):S93-95
- 25 Tomassoni ML, Albi E, Magni MV. Changes of nuclear membrane fluidity during rat liver regeneration. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:1049-1059
- 26 Grasl-Kraupp B, Schausberger E, Hufnagl K, Gerner C, Low-Baselli A, Rossmanith W, Parzefall W, Schulte-Hermann R. A novel mechanism for mitogenic signaling via pro-transforming growth factor alpha within hepatocyte nuclei. *Hepatology* 2002;35:1372-1380
- 27 Yan JP, Jia JB, Ma XH, Wu XR, Zhao YC, Han DW. Immunohistochemical study on expression of epidermal growth factor receptor at hepatocyte nuclei in experimental rat liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 1998;4:143
- 28 Jia JB, Han DW, Xu RL, Gao F, Zhao LF, Zhao YC, Yan JP, Ma XH. Effect of endotoxin on fibronectin synthesis of rat primary cultured hepatocytes. *World J Gastroenterol* 1998;4:329-331
- 29 Huang ZS, Wang ZW, Liu MP, Zhong SQ, Li QM, Rong XL. Protective effects of polydatin against CCl₄ induced injury to primary cultured rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 1999;5:41-44
- 30 Higuchi O, Nakamura T. Identification and change in the receptor for hepatocyte growth factor in rat liver after partial hepatectomy or induced hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:599-607
- 31 Zarnegar R, DeFrances MC, Oliver L, Michalopoulos G. Identification and partial characterization of receptor binding sites for HGF on rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;176:1179-1185
- 32 Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 1997;387:677-684
- 33 Lobie PE, Wood TJ, Chen CM, Waters MJ, Norstedt G. Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 1994;269:31735-31746
- 34 Lobie PE, Mertani H, Morel G, Morales-Bustos O, Norstedt G, Waters MJ. Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. *J Biol Chem* 1994;269:21330-21339

PD98059对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响

马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政

马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政, 成都军区总医院消化内科
四川省成都市 610083

马洪德, 男, 1967-04-18 生, 河南省柘城县人, 汉族. 第三军医大学、成都军区总医院联合培养的在读硕士研究生, 主治医师. 主要从事肝纤维化的基础研究.

全军“十五”医药卫生科研基金资助课题, No.01MB037

项目负责人: 蒋明德, 610083, 四川省成都市天回镇, 成都军区总医院消化内科. jiangmd@mail.sc.cninfo.net

电话: 028-86570346

收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-19

Effects of PD98059 on proliferation of rat cultured hepatic stellate cells stimulated by acetaldehyde

Hong-De Ma, Ming-De Jiang, Xian-Fei Zhong, Fang-Wei Xie, Wei-Zheng Zeng

Hong-De Ma, Ming-De Jiang, Xian-Fei Zhong, Fang-Wei Xie, Wei-Zheng Zeng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China
Supported by Funds from Military Foundation for Medicine and Health during the 10th 5-year period, No. 01MB037

Correspondence to: Dr. Ming-De Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. jiangmd@mail.sc.cninfo.net

Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-02-19

Abstract

AIM: To study the effects of PD98059, the specific blocking agent of MEK₁, on the proliferation of hepatic stellate cells and expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in rat hepatic stellate cells (HSC).

METHODS: HSC stimulated by acetaldehyde were cultured. The cell growth was evaluated by MTT colorimetric assay. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was examined by immunocytochemical staining.

RESULTS: PD98059 of 20 $\mu\text{mol/L}$ had an inhibitory effect on proliferation of HSC ($P < 0.05$, 0.109 ± 0.020 vs 0.146 ± 0.030), which was more obvious when cells exposed to PD98059 at 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$, 0.081 ± 0.010 , 0.056 ± 0.020 vs 0.146 ± 0.030), and the expression of PCNA also showed a descending tendency with the increase of PD98059 concentration ($P < 0.05$, 0.62 ± 0.09 , 0.47 ± 0.04 , 0.34 ± 0.04 vs 0.74 ± 0.05).

CONCLUSION: PD98059 inhibits proliferation of HSC and expression of PCNA, which is correlated with the decreased activity of PCNA.

Ma HD, Jiang MD, Zhong XF, Xie FW, Zeng WZ. Effects of PD98059 on proliferation of rat cultured hepatic stellate cells stimulated by acetaldehyde. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1182-1184

摘要

目的: 探讨特异性 MEK1 阻断剂 PD98059 对乙醛刺激的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC) 增生及其细胞增生核抗原表达的影响.

方法: 用 PD98059 对乙醛刺激的 HSC 进行处理, 分别以 MTT 比色、免疫细胞化学法检测细胞增生及其细胞增生核抗原表达.

结果: PD98059 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时即对 HSC 增生出现抑制作用($P < 0.05$, C 组 0.109 ± 0.020 vs B 组 0.146 ± 0.030), 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制作用逐渐增强($P < 0.05$, D、E 组 0.081 ± 0.010 、 0.056 ± 0.020 vs B 组 0.146 ± 0.030); HSC 中 PCNA 表达也随 PD98059 剂量增加而减弱($P < 0.05$, C、D、E 组 0.62 ± 0.09 、 0.47 ± 0.04 、 0.34 ± 0.04 vs B 组 0.74 ± 0.05).

结论: PD98059 对 HSC 增生及细胞增生核抗原表达具有抑制作用, 提示 Erk 信号传导通路是调控肝星状细胞增生的重要通道.

马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政. PD98059 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1182-1184

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1182.asp>

0 引言

肝星状细胞(HSC)是形成肝纤维化的主要细胞, HSC 的活化与增生是肝纤维化进展的中心环节^[1-5]. 乙醛是激活 HSC 导致酒精性肝纤维化的关键分子^[6,7]. 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, Erk)信号通路参与调控细胞增生与分化, 是多种信号交汇点或共同通路^[8-14], 但在乙醛刺激的 HSC 增生中的作用报道较少. 我们用不同剂量的特异性 MEK1 阻断剂 PD98059 阻断 Erk 活性后, 观察乙醛刺激的 HSC 增生及其细胞增生核抗原表达的变化, 探讨 Erk 信号通路调控乙醛刺激的 HSC 增生的分子机制, 为酒精性肝纤维化的防治提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 PD98059(NEB 公司); 增生细胞核抗原(PCNA)免疫组化法检测试剂盒(北京中山公司); 小牛血清及 DMEM/IMDM 培养基(美国 Gibco 公司); CFSC 大鼠肝星状细胞株由第三军医大学李小安博士惠赠.

1.2 方法 细胞用含 150 ml/L 小牛血清的 DMEM/IMDM (1:1) 培养基, 另添加适量的 HEPES、抗生素(1×10^5 单位/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素)至 37℃、50 ml/L CO₂ 混合气体的孵箱中培养, 细胞换液时间为 2-3 d, 传代时间为 3-5 d, 传代前用 2.5 g/L 胰酶消化. 实验分为: 空白对照组(A 组)加无血清的 DMEM/IMDM(1:1)培养液; 乙醛对照组(B 组): 无血清培养液中加乙醛 200 μmol/L; 实验组 1(C 组): 在 B 组基础上培养液中加入 PD98059 (浓度为 20 μmol/L); 实验组 2 (D 组): 在 B 组基础上培养液中加入 PD98059 (浓度为 50 μmol/L); 实验组 3 (E 组): 在 B 组基础上培养液中加入 PD98059 (浓度为 100 μmol/L). 取大鼠 HSC, 调整浓度至 1×10^8 /L 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 200 μL 细胞悬液, 细胞生长至 80 % 以上融合度时, 4 ml/L 血清培养基同步化处理 24 h, 实验组经 PD98059 预处理 1 h 后, 加乙醛 200 μmol/L (终浓度), CO₂ 培养箱中继续孵育 24 h 后(乙醛每 12 h 补充), 每孔加 5 g/L 的 MTT 20 μL, 反应 4 h, 用快速翻板法去除培养液, 加 DMSO 200 μL, 30 min 后用酶标仪(E-Liza Mat-3000)双波长测定其 A 值, 测定波长为 570 nm, 参考波长为 630 nm, 酶标仪所示 A 值为 A₅₇₀ 减去 A₆₃₀, 以消除非特异性光吸收效应. 免疫组化: 以 5×10^8 /L 接种 12 孔培养板, 每孔 1 ml, 作细胞爬片. 细胞生长至 80 % 以上融合度行同步化处理, 按上述分组法加药继续培养 24 h. 将培养板孔中的盖玻片取出, PBS 洗涤两次, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, 按 SP 试剂盒操作方法进行免疫细胞化学 PCNA 检测, DAB 显色, 同时用 PBS 代替一抗作阴性对照. 结果判定: 胞核呈棕黄色为阳性, 并对染色后的细胞片进行显微镜下观察, 摄片, IDA-2000 软件分析平均灰密度, 相对定量 PCNA 表达的强度.

统计学处理 所有指标均用($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS11.0 软件分析. 成组设计多样本均数的比较用单因素方差分析.

2 结果

2.1 MTT 结果 加入乙醛后明显刺激 HSC 增生($P < 0.05$, B 组 0.146 ± 0.030 vs A 组 0.030 ± 0.010); 随着 PD98059 用量增加 C (0.109 ± 0.020)、D(0.081 ± 0.010)、E (0.056 ± 0.020) 3 组细胞增生均受到抑制($P < 0.05$, vs B 组), 呈明显的剂量效应关系, 但 E 组细胞增生仍高于 A 组, 表明 100 μmol/L PD98059 仍不能完全抑制乙醛刺激的 HSC 增生.

2.2 PCNA 免疫组织化学染色 乙醛对照组 HSC 胞核着色最深, 呈棕黄色(图 1), 实验组随着 PD98059 用量的增加胞核着色逐渐减弱, PD98059 100 μmol/L (完全抑制 Erk 活性剂量)胞核呈淡黄色(图 2). 经病理分析软件分析显示, 乙醛组 PCNA 平均灰密度较对照组明显增高($P < 0.05$, B 组 0.74 ± 0.05 vs A 组 0.24 ± 0.03); 实验组随着 PD98059 用量的增加 HSC 内 PCNA 平均灰密度较乙醛组明显降低($P < 0.05$), E 组 PCNA 平均灰密度

(0.34 ± 0.04)仍高于 A 组($P < 0.05$), 结果表明 PD98059 具有抑制作用, 但 100 μmol/L PD98059 仍不能完全抑制乙醛刺激的 HSC 内 PCNA 表达.

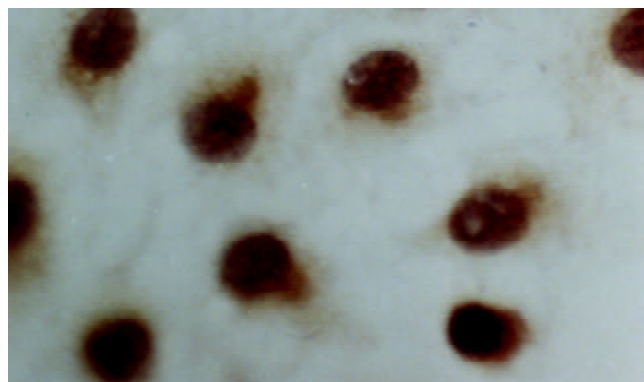


图 1 乙醛组 HSC 免疫细胞化学染色胞核着色呈棕黄色($\times 400$ SP 法).

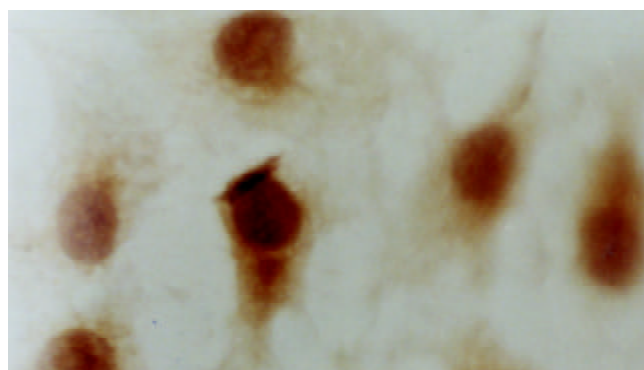


图 2 100 μmol/L PD98059 予处理乙醛刺激的 HSC 后胞核着色呈淡黄色($\times 400$ SP 法).

3 讨论

肝纤维化的发生机制较复杂^[15], 目前关于 ERK 信号传导通路的激活与肝纤维化发生机制的研究甚少. 文献表明: Erk 信号传导通路参与调控 PDGF 等刺激的 HSC 增生^[16-19]. 乙醛作为有效刺激信号是激活 HSC 导致酒精性肝纤维化发生的关键分子, 但 ERK 信号通路在乙醛刺激的 HSC 增生中的意义报道较少, 我们采用 MTT 实验观察 PD98059 对乙醛刺激的 HSC 增生的影响, 结果表明阻断 Erk 信号通路后 HSC 增生明显抑制, 且有剂量依赖关系, 提示 Erk 信号通路是调控乙醛刺激的 HSC 增生的重要通道, 同时 100 μmol/L PD98059 (完全抑制 Erk 活性剂量)仍不能完全抑制 HSC 增生, 提示 Erk 通路并非调控乙醛刺激的 HSC 增生的唯一通道.

增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 又称细胞周期蛋白, 是真核细胞 DNA 合成时所必需的一种 36 KD 的酸性核蛋白^[20], 他在细胞周期调控方面发挥着重要作用^[21-26], 其表达亦可反应细胞增生的活跃程度^[27-30], 目前 Erk 信号通路调控乙醛刺激的 HSC 增生的分子机制尚不明了, 我们用不同浓度 PD98059 (20, 50, 100 μmol/L) 分别加入乙醛刺激的 HSC 内 24 h 后, 免疫细胞化学染色法检测发现,

PD98059 组与乙醛对照组相比, PCNA 表达逐渐减弱, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 组 PCNA 表达仍弱阳性, 提示 PD98059 抑制乙醛刺激的 HSC 增生可能与一定程度上抑制细胞周期蛋白 PCNA 合成有关。

目前对 Erk 信号通路调控乙醛刺激的 HSC 增生的分子机制研究刚刚起步, 其确切机制尚需进一步研究。

4 参考文献

- Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamauchi M, Gillan A, Rippe RA. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000;32:32-38
- Kim KY, Rhim TY, Choi I, Kim SS. N-acetylcysteine induces cell cycle arrest in hepatic stellate cells through its reducing. *Activity J Biol Chem* 2001;276:40591-40598
- 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. 世界华人消化杂志 2000; 8:687-689
- 朱永红, 胡大荣, 聂青和, 刘国栋, 谭朝霞. 人肝脏星形细胞培养激活及其 c-fos, c-jun 的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:299-302
- 王宝恩. 肝星状细胞与肝纤维化. 中华肝脏病杂志 2000;8: 197-199
- Anania FA, Womack L, Jiang MD, Saxena NK. Aldehydes potentiate alpha(2)(I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:846-856
- Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Bendia E, Benedetti A, Greenwel P. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;33:1130-1140
- Peyssonnaud C, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Calothy G, Eychene A. Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct ras downstream signaling pathways. *Mol Cell Biol* 2000;20:7068-7079
- Lee JH, Johnson PR, Roth M, Hunt NH, Black JL. ERK activation and mitogenesis in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:1019-1029
- Schmidt M, Goebeler M, Posern G, Feller SM, Seitz CS, Bocker EB, Rapp UR, Ludwig S. Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *J Biol Chem* 2000;275:41011-41017
- Cha H, Shapiro P. Tyrosine-phosphorylated extracellular signal-regulated kinase associates with the golgi complex during G2/M phase of the cell cycle: evidence for regulation of golgi structure. *The J Cell Biol* 2001;153:1355-1368
- Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, Kataoka T, Kohno M. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated up-regulation of p27 (kip1). *J Biol Chem* 2001;276:2686-2692
- Keenan SM, Bellone C, Baldassare JJ. Cyclin-dependent kinase 2 nucleocytoplasmic translocation is regulated by extracellular regulated kinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 22404-22409
- Dolci S, Pellegrini M, Di Agostino S, Geremia R, Rossi P. Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. *J Biol Chem* 2001;276: 40225-40233
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factors actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology* 1999;30:951-958
- Lee KS, Cottam HB, Houghlum K, Wasson DB, Carson D, Chijkier M. Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity. *J Physiol* 1997;273:1094-1100
- Iwamoto H, Nakamuta M, Tada S, Sugimoto R, Enjoji M, Nawata H. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor AG1295 attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Lab Clin Med* 2000;135:406-412
- Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, Kawada N, Kaneda K. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology* 2000;32:983-989
- Dervan PA, Magee HM, Buckley C, Carney DN. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. *Am J Clin Pathol* 1992;97(5 Suppl 1):S21-28
- Hida M, Omori S, Awazu M. ERK and p38 MAP kinase are required for rat renal development. *Kidney Int* 2002;61:1252-1262
- Hirata A, Igarashi M, Yamaguchi H, Suwabe A, Daimon M, Kato T, Tominaga M. Nifedipine suppresses neointimal thickening by its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth via a MEK-ERK pathway coupling with Pyk2. *Br J Pharmacol* 2000;131:1521-1530
- Westwood G, Dibling BC, Cuthbert-Heavens D, Burchill SA. Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway. *Oncogene* 2002; 21:809-824
- Weber CK, Sommer G, Michl P, Fensterer H, Weimer M, Gansauge F, Leder G, Adler G, Gress TM. Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology* 2001;121:657-667
- Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ring-master of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001;77:1007-1120
- 高美霞, 张乃珍, 冀春莹. 胃癌雌激素受体与 PCNA 的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:1117-1120
- Kitada T, Seki S, Nakatani K, Kawada N, Kuroki T, Monna T. Hepatic expression of c-Myb in chronic human liver disease. *Hepatology* 1997;26:1506-1512
- Ramakrishna G, Perella C, Birely L, Diwan BA, Fornwald LW, Anderson LM. Decrease in K-ras p21 and increase in Raf1 and activated Erk 1 and 2 in murine lung tumors initiated by N-nitrosodimethylamine and promoted by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 179:21-34
- Omori S, Fukuzawa R, Hida M, Awazu M. Expression of mitogen-activated protein kinases in human renal dysplasia. *Kidney Int* 2002;61:899-906
- Ishizuka S, Yano T, Hagiwara K, Sone M, Nihei H, Ozasa H, Horikawa S. Extracellular signal-regulated kinase mediates renal regeneration in rats with myoglobinuric acute renal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:88-92

雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响

许君望, 龚 均, 冯新利, 苒新明, 罗金燕, 董 蕾, 贾 皓, 徐贵平

许君望, 冯新利, 苒新明, 贾皓, 徐贵平, 西安交通大学第一医院消化内科 陕西省西安市 710061

龚均, 罗金燕, 董蕾, 西安交通大学第二医院消化内科 陕西省西安市 710031
许君望, 男, 1964-04-20 生, 陕西省兴平市人, 1986 年毕业于西安医科大学, 博士研究生, 副教授, 主要从事慢性肝病的基础与临床研究。

西安交通大学博士学位论文基金资助项目, No.2001-13

项目负责人: 许君望, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学第一医院消化内科: xujw@pub.xaonline.com

电话: 029-5323507 传真: 029-5263190

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-26

Effects of estradiol on type I, III collagens and TGF β_1 in hepatic fibrosis in rats

Jun-Wang Xu, Jun Gong, Xin-Li Feng, Xin-Ming Chang, Jin-Yan Luo, Lei Dong, Ai Jia, Gui-Ping Xu

Jun-Wang Xu, Xin-Li Feng, Xin-Ming Chang, Ai Jia, Gui-Ping Xu, Department of Gastroenterology, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Jun Gong, Jin-Yan Luo, Lei Dong, Department of Gastroenterology, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710031, Shaanxi Province, China

Supported by the Doctorate Foundation of Xi'an Jiaotong University, No.2001-13.

Correspondence to: Dr. Jun-Wang Xu, Department of Gastroenterology, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. xujw@pub.xaonline.com

Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-03-26

Abstract

AIM: To study the effects of estradiol on the production of collagen I, III and transforming growth factor β_1 (TGF β_1) in experimental fibrosis in rats induced by carbon tetrachloride (CCL₄), and to investigate the suppressive effects of estrogen on liver fibrosis.

METHODS: Rats were randomly allocated into a normal control group, a model control group, a therapy control group and an estradiol group. Liver fibrosis was induced by CCL₄ administration. The estradiol group, apart from the administration of CCL₄, was treated subcutaneously with estradiol (benzoic estradiol) 1 mg/kg twice weekly. At the end of week 8, all the rats were sacrificed. Liver inflammation and collagen deposition were observed with HE and Masson's collagen stains, analyzed with scoring and staging systems. Type I, III collagens and TGF β_1 were observed with immunohistochemical method.

RESULTS: CCL₄ group had the typical liver fibrosis compared with normal control group. The fibrous septa were formed in CCL₄ group rats, and collagens were accumulated and deposited in the sinusoids and liver lobules. The expression of type I, III collagens (0.58±0.26 vs 6.34±2.24, 1.07±0.49 vs 5.28±1.28, $P < 0.001$) and TGF β_1 was significantly increased. Estradiol significantly attenuated collagen ac-

cumulation ($P < 0.05$) in the fibrotic livers, and decreased type I, III collagens (2.47±0.76 vs 6.34±2.24, 3.02±1.20 vs 5.28±1.28, $P < 0.05$) and TGF β_1 expression in the liver.

CONCLUSION: Estradiol treatment reduces the synthesis of hepatic type I, III collagens and TGF β_1 in the fibrotic liver induced by CCL₄ administration, and attenuates hepatic fibrosis.

Xu JW, Gong J, Feng XL, Chang XM, Luo JY, Dong L, Jia A, Xu GP. Effects of estradiol on type I, III collagens and TGF β_1 in hepatic fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1185-1188

摘要

目的: 观察雌二醇对肝纤维化大鼠肝脏胶原沉积和转化生长因子 β_1 (TGF β_1) 表达的影响, 研究雌激素对肝纤维化形成的抑制作用, 并探讨其可能的机制。

方法: 设立模型组、治疗对照组、雌二醇组和正常对照组, 以四氯化碳复合因素诱导大鼠肝纤维化动物模型, 雌二醇组在四氯化碳应用的同时皮下注射苯甲酸雌二醇 1 mg/kg, 2 次 /wk, 共 8 wk。大鼠肝脏 HE 染色与 Masson 染色, 分级观察肝组织的炎性坏死与胶原纤维沉积变化, 并观察对大鼠肝纤维化形成过程中肝脏表达 I, III 型胶原蛋白及对 TGF β_1 的影响。

结果: 与正常对照组比较, 四氯化碳模型大鼠出现典型的肝纤维化表现, 肝脏胶原纤维间隔广泛形成, 肝小叶与肝窦内胶原增生沉积明显, I, III 型胶原(0.58 ± 0.26 vs 6.34 ± 2.24, 1.07 ± 0.49 vs 5.28 ± 1.28, P 值均 < 0.001)及 TGF β_1 基因表达明显增多; 雌二醇应用可以明显减轻肝脏内胶原纤维增生沉积($P < 0.05$), 抑制肝脏 I、III 型胶原蛋白(2.47 ± 0.76 vs 6.34 ± 2.24, 3.02 ± 1.20 vs 5.28 ± 1.28, P 值均 < 0.05)及 TGF β_1 的合成表达。

结论: 雌二醇可抑制肝纤维化大鼠肝脏 I, III 型胶原蛋白及 TGF β_1 的合成表达, 发挥对肝纤维化的抑制作用。

许君望, 龚均, 冯新利, 苒新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平。雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响。世界华人消化杂志 2003;11(8): 1185-1188

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1185.asp>

0 引言

肝纤维化是许多肝脏疾病共同的病理过程, 是肝损伤过程中机体抗损伤修复的一种表现, 以肝脏胶原等细胞外基质的沉积为其主要特征。肝硬化在男性的发病比女性

更普遍,男性和女性的发病率之比为2.3:1-2.6:1^[1, 2].虽然肝脏并非性激素作用的基本靶器官,但肝脏中存在有雌激素受体,能对雌激素产生反应,从而调节肝脏的功能^[3].因此,性激素在肝纤维化至肝硬化的发展中可能发挥一定的作用.在肝纤维化的动物模型和人类肝脏疾病的研究发现,TGF β_1 在肝纤维化的过程中具有重要作用^[4, 5].有研究发现,抗雌激素药物他莫昔芬可使女性患者肺纤维化的危险性明显升高,而他莫昔芬的致肺纤维化是由TGF β_1 介导的^[6].因此设想,肝纤维化时雌激素可能在调节TGF β_1 等一些细胞因子的表达中发挥了作用.本实验通过四氯化碳复合因素诱导大鼠肝纤维化动物模型,结合I、III型胶原蛋白及TGF β_1 的免疫组化,探讨雌二醇的抗肝脏纤维化作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley 大鼠40只,清洁级,质量 220 ± 21 g, 10周龄左右,由陕西省实验动物中心提供.苯甲酸雌二醇由上海第九制药厂生产,批号00080103;秋水仙碱片为云南昆明植物药厂出品;四氯化碳和胆固醇分析纯由西安化学试剂厂生产;市售猪油、玉米粉;精制花生油(山东鲁华集团出品);I、III型胶原抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,工作浓度1:50;TGF β_1 的免疫组化试剂盒购自Dako公司,工作浓度1:1 000;ST试剂盒购自福建迈新生物技术开发公司.

1.2 方法 试验动物饲养于控温控湿12 h光照的环境中,不限饮食.每10只1组,随机分为4组.CCL₄组皮下注射400 mL/L CCL₄花生油溶液,剂量为2 mL/kg,2次/wk,首剂加倍.雌二醇(E)组,注射CCL₄的同时皮下注射苯甲酸雌二醇1 mg/kg,2次/wk.秋水仙碱(Col)组注射CCL₄的同时,每日0.11 mg/kg秋水仙碱灌胃.以上3组动物均给予含5 g/kg胆固醇和200 g/kg猪油的高脂饮食.对照组给予普通饮食并皮下注射等容量花生油溶剂,2次/wk.8 wk后,全部实验动物禁食1晚,经肌肉注射苯巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后行颈椎错位处死,迅速取出肝脏,被切除的大鼠肝脏取右叶,经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋和HE、Masson染色,由半定量的方法^[7]对肝纤维化程度进行评估.胶原增生程度半定量标准:0分,正常肝脏或无明显胶原纤维增生;1分,胶原纤维增生,中央静脉和汇管区有少量纤维索放散延伸,但无间隔形成;2分,胶原纤维明显增生,中央静脉和汇管区结缔组织变厚,由此向四周延出纤维索,形成不完全间隔;3分,胶原纤维大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成(假小叶),或较厚的不完全间隔,即将形成假小叶;4分,完全间隔较厚,假小叶大量形成.I、III型胶原及TGF β_1 免疫组化采用PAP法DAB显色.I、III型胶原表达程度,应用CMIAS彩色医学图像分析仪,对各组切片随机选取10个视野测量阳性染色面积占肝脏视野面积比进行定量分析,以他们的染色面积在标本中所占百分比表示^[8].

统计学处理 将数据表示为 $\bar{x} \pm s$,进行非配对的秩和检验、t检验或F检验.数据输入计算机采用SPSS10.0统计软件分析.

2 结果

2.1 雌二醇对大鼠实验性肝纤维化的影响 HE染色显示对照组的肝脏具有正常的肝小叶结构;CCL₄组表现出严重的损伤性病理改变,肝小叶失去正常结构,肝板排列紊乱,肝细胞普遍变性,大多数为脂肪变性,少数水样变,炎症及坏死明显,汇管区纤维组织增生,并可见厚薄不一的纤维分隔包绕肝小叶,部分有肝细胞再生及假小叶形成;雌二醇组肝脏损伤性病理改变明显减轻,纤维有部分分割肝小叶,但未见完整的假小叶形成,肝组织有部分再生.Masson胶原染色(表1),肝脏胶原纤维增生程度半定量测量,表明雌二醇可明显抑制大鼠实验性肝纤维化的形成.

表1 雌二醇对大鼠实验性肝纤维化的作用

分组	n	肝纤维化分级(级)				
		-	+	++	+++	++++
Control	10	10	0	0	0	0
CCL ₄	9	0	2	2	3	1
CCL ₄ +E ^a	8	0	4	2	1	0
CCL ₄ +Col ^a	9	0	3	4	2	0

^aP < 0.05, vs CCL₄组.

2.2 I、III型胶原免疫组化染色分析 用免疫组织化学PAP法对肝脏组织切片I、III型胶原进行观察,正常对照组肝脏I型胶原蛋白主要存在于中央静脉、门脉区三联管管周及管间纤维组织,III型胶原除上述区域外还存在于肝窦四周.CCL₄组中I、III型胶原阳性细胞染色均明显增多,其分部除汇管区、中央静脉及肝窦四周增多外,在纤维隔内呈弥漫分布.雌二醇组及秋水仙碱组I型胶原蛋白主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带,而III型胶原蛋白以门脉区及肝细胞坏死区较多.各组I、III型胶原蛋白面密度(胶原面积/肝组织视野面积×100%)测量值见表2.

表2 雌二醇对大鼠肝纤维化肝脏I、III型胶原蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	I型胶原	III型胶原
Control	10	0.58 ± 0.26	1.07 ± 0.49
CCL ₄	9	6.34 ± 2.24	5.28 ± 1.28
CCL ₄ +E ^a	8	2.47 ± 0.76	3.02 ± 1.20
CCL ₄ +Col ^a	9	2.63 ± 0.91	3.31 ± 1.43

^aP < 0.05, vs CCL₄组.

2.3 TGF β_1 的免疫组化染色分析 CCL₄组的TGF β_1 阳

性细胞主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带及肝纤维间隔中, 主要见于肝星状细胞、类间质细胞和炎症细胞质及其周围. 而雌二醇及秋水仙碱组中阳性染色程度较 CCL₄ 组明显为轻 (图 1、2).

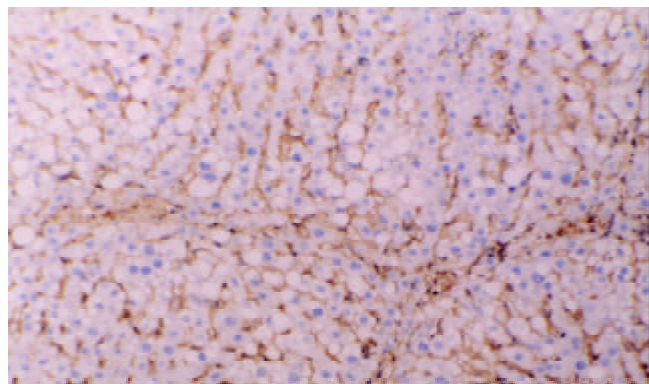


图 1 CCL₄ 组 TGF β_1 的免疫组化染色 PAP 法 $\times 100$

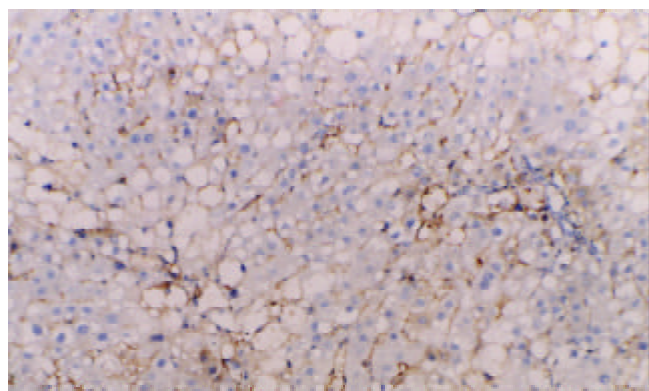


图 2 雌二醇组 TGF β_1 的免疫组化染色 PAP 法 $\times 100$

3 讨论

肝纤维化通常始于肝细胞的破坏, 继而炎症细胞和血小板聚集, 刺激枯否细胞释放细胞因子和生长因子 (如 TGF β_1 等), 这些因子通过活化肝星状细胞, 肝星状细胞活化后增生并转化为成纤维母细胞样的细胞, 合成并大量沉积细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 从而将炎症和肝硬化的形成过程联系起来^[9-13]. ECM 包括胶原、非胶原糖蛋白及蛋白多糖, 其中胶原是最重要的 ECM. 肝脏胶原有 I, III, IV, V, VI 型等, 以 I, III 型为主, 约占肝脏胶原总量的 60% 以上^[14-17]. 我们以 CCL₄ 等复合因素诱导大鼠肝纤维化模型, 可见正常对照组肝脏仅有少量 I 型胶原存在于中央静脉、门脉区三联管管周及管间纤维组织, III 型胶原除上述区域外还少量存在于肝窦四周, 而 CCL₄ 组中 I, III 型胶原阳性细胞染色均明显增多, 其分布除汇管区、中央静脉及肝窦四周增多外, 在纤维隔内亦呈弥漫分布, 包绕肝小叶. 雌二醇组的肝纤维化程度明显低于 CCL₄ 组, 且 I, III 型胶原阳性细胞免疫组化染色也弱于 CCL₄ 组, I 型胶原蛋白主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带, 而 III 型胶原蛋白以门脉区及肝细胞坏死区为主. 表明雌二醇能抑制 I, III 型胶原的合成而发挥抗肝

纤维化作用.

肝损害时肝星状细胞被认为是 ECM 的主要来源, 而肝星状细胞的活化是肝细胞、内皮细胞、血小板、枯否细胞、炎症细胞、细胞因子和生长因子间相互作用的结果^[18-22]. 细胞因子在肝纤维化的每个阶段都发挥着重要作用^[23-26]. 在肝纤维化的动物模型和人类肝脏疾病的研究发现, TGF β_1 在肝纤维化的过程中具有重要作用^[27-31], 它是一种多功能生长因子, 能使单个肝星状细胞胶原合成增加 60-80%, 被认为是肝纤维化形成的关键因子. Bentzen et al^[6] 在研究放疗女性肺纤维化时发现, 给予他莫昔芬 (tamoxifen, 一种抗雌激素的药物) 可使患者肺纤维化的危险性明显升高, 而他莫昔芬的致肺纤维化是由 TGF β_1 介导的. 因此设想, 肝纤维化时雌激素可能在调节 TGF β_1 等一些细胞因子的表达中发挥了作用. 本实验显示, 雌二醇组肝纤维组织中 TGF β_1 的表达量明显弱于 CCL₄ 组, 表明雌二醇可能通过下调 TGF β_1 的表达, 从而间接地发挥对肝纤维化的抑制作用.

肝纤维化时肝星状细胞由静止状态转变为活化细胞, 增加 I, III 型胶原等 ECM 的表达, 激活的肝星状细胞还可通过自分泌途径扩大激活细胞群, TGF β_1 是肝星状细胞自分泌扩增的重要细胞因子, 既增加胶原的合成, 又进一步刺激 TGF β_1 的产生, 使更多静止的肝星状细胞被激活^[32-35]. 本研究雌二醇能抑制 TGF β_1 的产生, 阻断自分泌放大过程, 从而减少 I, III 型胶原等 ECM 的合成, 这一作用可能是肝纤维化及肝硬化的发病率存在性别差异的原因之一.

4 参考文献

- 1 Pinzani M, Romanelli RG, Magli S. Progression of fibrosis in chronic liver diseases: time to tally the score. *J Hepatol* 2001; 34:764-767
- 2 Yan JC, Ma JY, Pan BR, Ma LS. Study of hepatitis B in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:611-616
- 3 Shimizu I, Mizobuchi Y, Yasuda M, Shiba M, Ma YR, Horie T, Liu F, Ito S. Inhibitory effect of oestradiol on activation of rat hepatic stellate cells *in vivo* and *in vitro*. *Gut* 1999;44:127-136
- 4 Gabriel A, Kuddus RH, Rao AS, Gandhi CR. Down-regulation of endothelin receptor by transforming growth factor β_1 in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999;30:440-450
- 5 Bai XW, Yan XX, Feng LY. Recent progression of hepatic fibrosis research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1267-1268
- 6 Bentzen SM, Skoczylas JZ, Overgaard M, Overgaard J. Radiotherapy-related lung fibrosis enhanced by tamoxifen. *J Nat Cancer Inst* 1996;88:918-922
- 7 Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, Maiga MY, Gallois Y, Cales P. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. *J Hepatol* 1998;28:439-446
- 8 Zhang YT, Chang XM, Li X, Li HL. Effects of spironolactone on expression of type I/III collagen proteins in rat hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1120-1124
- 9 Wu CH. Fibrodynamics-elucidation of the mechanisms and sites of liver fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:388-390
- 10 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- 11 Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001;7:1-8

- 12 Jiang SL, Yao XX, Shun YF. The treatment of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:684-686
- 13 Jian HQ, Zhang XL. The mechanisms of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:687-689
- 14 Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM. Dynamic changes of type I, III and IV collagen synthesis and distribution of collagen-producing cells in carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:397-403
- 15 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effect of Yigan Decoc-tion on the expression of type I, III collagen proteins in experi-mental hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:263-267
- 16 George J, Rao KR, Stern R, Chandrakasan G. Dimethylnitro-samine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology* 2001;156:129-138
- 17 Bruck R, Shirin H, Aeed H, Matas Z, Hochman A, Pines M, Avni Y. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. *J Hepatol* 2001;35:457-464
- 18 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 19 Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the develop-ment of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- 20 Li X, Meng Y, Yang XS, Wu PS, Li SM, Lai WY. CYP11B2 expression in HSCs and its effect on hepatic fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 2000;6:885-887
- 21 Chen PS, Zhai WR, Zhou XM, Zhang JS, Zhang YE, Ling YQ, Gu YH. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in he-patic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:647-651
- 22 Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at differ-ent stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:115-119
- 23 Xie YM, Nie QH, Zhou YX, Cheng YQ, Kang WZ. Detection of TIMP-1 and TIMP-2 RNA expressions in cirrhotic liver tissue using digoxigenin labelled probe by in situ hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:251-254
- 24 Lu X, Liu CH, Xu GF, Chen WH, Liu P. Successive observa-tion of laminin and collagen IV on hepatic sinusoid during the formation of the liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:260-262
- 25 Huang GC, Zhang JS. Intercellular signal transduction of acti-vated hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1056-1060
- 26 Xu JW, Gong J, Chang XM, Luo JY, Dong L, Hao ZM, Jia A, Xu GP. Estrogen reduces CCL₄- induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:883-887
- 27 Bauer M, Schuppan D. TGF β 1 in liver fibrosis: time to change paradigms. *FEBS Letters* 2001;502:1-3
- 28 Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stel-late cells. *Hepatology* 1999;30:196-202
- 29 Wu GH, Huang YX, Fan GR, Zhang GX. Serum transforma-tion growth factor β 1 in patients with hepatitis B. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:505-506
- 30 Liu F, Liu JX, Cao ZC, Li BS, Zhao CY, Kong L, Zhen Z. Relationship between TGF- β 1, serum indexes of liver fibrosis and hepatic tissue pathology in patients with chronic liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:519-521
- 31 Liu F, Liu JX. Role of transforming growth factor betal in hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:86-88
- 32 Gao ZL, Li DG, Lu HM, Gu XH. The effect of retinoic acid on Ito cell proliferation and content of DNA and RNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:443-444
- 33 Liu T, Hu JH, Cai Q, Ji YP. Signal conducting molecule in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:805-807
- 34 Li D, Zhang LJ, Chen ZX, Huang YH, Whang XZ. Effects of TNF β IL-6 and IL-10 on the development of experimental rat liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1242-1245
- 35 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoc-tion on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514

大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进

冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞

冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 郭洁, 李海霞, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

漆楚波, 湖北省肿瘤医院病理科 湖北省武汉市 430070

冯志强, 男, 1973-02 生, 湖北省赤壁市人, 汉族. 现为武汉大学消化内科硕士研究生.

项目负责人: 沈志祥, 430060, 湖北省武汉市解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. whfzq@hotmail.com

收稿日期: 2002-10-10 接受日期: 2002-10-29

Improvement of induction method of acute alcoholic fatty liver model in rats

Zhi-Qiang Feng, Zhi-Xiang Shen, Shi-Yun Tan, He-Sheng Luo, Chu-Bo Qi, Jie Guo, Hai-Xia Li

Zhi-Qiang Feng, Zhi-Xiang Shen, Shi-Yun Tan, He-Sheng Luo, Jie Guo, Hai-Xia Li, Department of Gastroenterology, the Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei Province 430060, China

Chu-Bo Qi, Department of Pathology, Hubei Tumor Hospital, Wuhan, Hubei Province 430070, China

Correspondence to: Dr. Zhi-Qiang Shen, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430070, Hubei Province, China. whfzq@hotmail.com

Received: 2002-10-10 Accepted: 2002-10-29

Abstract

AIM: To provide a valuable model for the study on acute alcoholic fatty liver.

METHODS: Thirty Wistar male rats were randomized into two groups: model group (group 1, intragastric infusion of spirits, fed with high fat and iron diet), control group (group 2, intragastric infusion of saline, fed with common diet). Some rats were sacrificed after 2 and 3 weeks to evaluate the process of alcoholic fatty liver formation. All rats were sacrificed at the end of the fourth week.

RESULTS: Slight fatty deposition was observed at the end of 2nd week after the experiment and moderate fatty deposition at the 3rd week and severe fatty deposition at the 4th week. In comparison with control group, the liver mass index was increased in the model group. There was a statistically significant difference between the two groups.

CONCLUSION: The lesion of the acute alcoholic fatty liver in model rats is similar to that in humans. The experiment is very simple and the experiment cycle is short and the conclusion is clear.

Feng ZQ, Shen ZX, Tan SY, Luo HS, Qi CB, Guo J, Li HX. Improvement of induction method of acute alcoholic fatty liver model in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1189-1192

摘要

目的: 为酒精性脂肪肝的研究提供有价值的模型.

方法: 采用高浓度酒每日灌胃, 同时改进饲料配方, 增加食物中脂肪含量、增加铁剂的方法.

结果: 造模 2 wk 后可见肝脏轻微脂肪沉积, 3 wk 后呈中度脂肪肝, 4 wk 后为重度脂肪肝病变; 与对照组相比, 肝指数明显增大 (模型组 4.9 ± 1.1 ; 对照组 4.0 ± 0.6 , $P < 0.05$), 具有统计学意义.

结论: 本造模方法与人类酒精性脂肪肝病变类似, 方法简单易行、实验周期短, 结论明确, 一般实验室均可进行.

冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞. 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1189-1192

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1189.asp>

0 引言

目前, 酒精性脂肪肝已经成为国内外的一大研究热点. 经典的酒精性脂肪肝模型为 Liber-Decarli 模型, 该方法简便易行、费用低、形成率高并且稳定性好, 但由于大鼠厌酒, 故不能保证大鼠较恒定的酒精摄入量, Tsukamoto-French 大鼠模型虽能控制实验动物的酒精摄入, 但制作该模型需要一些技术上的训练和特殊设备, 价格昂贵, 给人们的研究带来不便. 因此, 我们在他们实验的基础上, 采用了高浓度酒每日灌胃, 同时改进饲料配方的方法建立了大鼠酒精性脂肪肝模型, 并对结果进行了病理组织学观察, 以期对酒精性脂肪肝的研究提供有价值的模型.

1 材料和方法

1.1 材料 武汉市实验动物中心提供的体重 150-200 g 同批 ♂ Wistar 大鼠 30 只, 按体重大小排序为 1, 2, 3, ……30, 再利用随机数字表, 将随机数字为单号者分入 1 组 (模型组), 双号者归入 2 组 (对照组). Mettler AE200 分析天平, 日本 Olympus 显微镜. 采用普通饲料: 猪油 = 85:15, 每 1 000 g 饲料中加入 15 g 硫酸亚铁; 充分混匀, 制成成型饲料, 60 °C 烤干.

1.2 方法 模型组大鼠, 前 3 d 先饮用 15 % (v/v) 二锅头酒 (北京双庆和酒业有限责任公司生产, GB10781.2-89), 第 4 天起再按 15 ml/kg 灌服 52 % (v/v) 二锅头酒, 每日上午一次; 同时给予上述饲料, 自由饮水. 对照组则灌服同等剂量生理盐水, 自由饮水, 给予普通饲料. 2 wk、3 wk 后每组各处死 1 只, 以动态观察模型的变化. 第 4 周称重, 断颈处死所有大鼠, 立即取出肝脏, 4 °C

生理盐水反复冲洗4-5次,称全肝重量,选最大肝叶沿最长径取肝组织一块,10%中性甲醛固定,石蜡包埋,常规切片,HE染色,检查由湖北省肿瘤医院病理科完成。

统计学处理 数据统计分析采用t检验,用SAS8.1软件包进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 一般状况 模型组大鼠灌服白酒后,绝大部分行动迟缓,行走不稳,重者醉倒嗜睡,对外界刺激的反应明显减弱,甚至没有反应,大约35-60 min后逐渐恢复正常,进食量及饮水量明显少于对照组,皮毛不整,欠光泽。对照组大鼠皮毛光泽柔顺,行动敏捷,对外界环境的刺激反应迅速,进食量及饮水量正常。体重变化见表1。模型组有2只因灌胃误呛入肺导致化学性肺炎,经抢救无效而死亡,对照组有3只误呛,经抢救全部存活,另外,每组各有1只因灌胃不慎致胃穿孔而死亡。

表1 不同时间大鼠体重变化的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	2 wk 体重变化(g)	4 wk 体重变化(g)
对照组	12	16.92 \pm 7.45	33.25 \pm 7.72
模型组	10	13.10 \pm 6.67	24.50 \pm 7.86 ^b

^b $P < 0.05$, vs 对照组相比。

2.2 肝指数 计算方法:肝指数=肝湿重/大鼠体重(见表2)。

表2 各组大鼠肝重、体重、肝指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝重(g)	体重(g)	肝指数
对照组	12	8.91 \pm 2.00	220.67 \pm 23.63	4.00 \pm 0.60
模型组	10	9.12 \pm 2.20	186.00 \pm 25.75	4.93 \pm 1.08 ^a

^a $P < 0.05$, vs 对照组相比。

2.3 大体标本观察 对照组大鼠肝脏色泽正常,被膜光泽。模型组大鼠肝脏外观呈弥漫性肿大,边缘稍钝,触之如面团,有油腻感,压迫时可出现凹陷,表面色泽较苍白,部分略带灰黄色。切面呈淡黄色,甚至苍白色。

2.4 病理组织学所见 模型组:2 wk后,可见大鼠肝脏出现轻微脂肪变性,部分炎性细胞浸润(图1);3 wk后,表现为中度脂肪肝,较多炎性细胞浸润(图2);而4 wk后,可见重度脂肪变性,肝细胞索排列紊乱,肝细胞肿胀呈气球样变,细胞内充满大小不一的脂滴,胞质疏松,其内可见大小不等、数量不一的脂肪空泡以及水样变性,细胞核被挤向一边,呈印戒状。肝细胞的脂肪变性以肝小叶中央区最为明显,可见,酒精对大鼠机体的影响是受时间、剂量的影响的,随着给酒时间的延长、酒精摄入量的增加,酒精对机体的影响亦会随之加大,所引起的肝脏脂肪变性也越来越严重(图3、4)。对照组:肝小叶结构清晰,肝细胞索

排列整齐,肝细胞大小较一致,胞核居中,胞质淡红色,在中央静脉区偶可见少数散在脂滴(图5)。

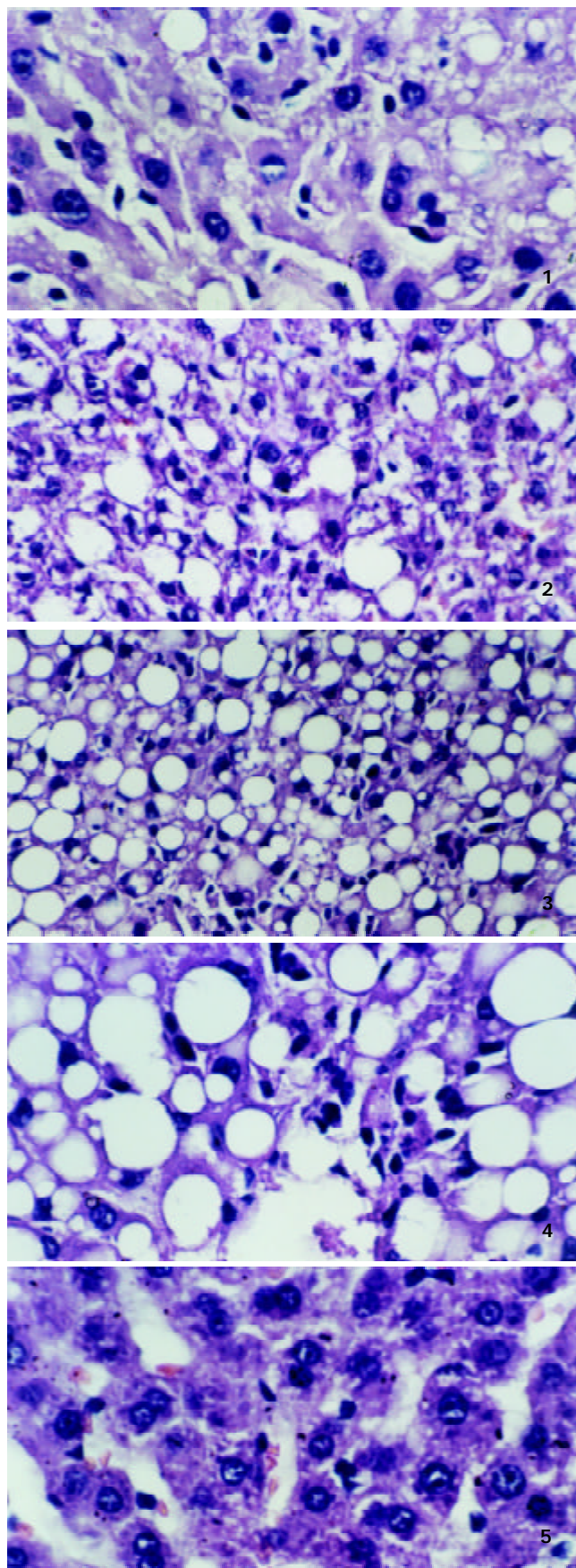


图1 造模2 wk, 轻微脂肪变性, HE \times 400. 图2 造模3 wk, 中度脂肪肝, HE \times 200. 图3 造模4 wk, 重度脂肪肝, HE \times 200. 图4 造模4 wk, 重度脂肪肝, HE \times 400. 图5 对照组正常肝组织, HE \times 400.

3 讨论

近几年来,随着人民生活水平的提高,饮酒或酗酒者明显增加,由此所引起的酒精性脂肪肝的发病率也随之上升.酒精性脂肪肝的研究已成为当前一大研究热点.为深入研究酒精性脂肪肝的发病机制,寻找有效的治疗和预防手段,需要建立一个较理想而经济实用的动物模型.

经典的模型为 Liber-Decarli 模型,由于其简便易行、费用低、形成率高及稳定性好而受到青睐,但由于大鼠厌酒,故而不能保证大鼠较恒定的酒精摄入量, Tsukamoto-French 大鼠模型虽能控制实验动物的酒精摄入,但制作该模型需要一些技术上的训练如胃内导管的植入、维持,以及保证 24 h 持续注入酒精所需的特殊设备,价格昂贵,给人们的研究带来不便.范建高 et al^[1]用高脂饮食加 60 % 的酒精 15ml/kg 灌胃,2 次/d,在造模 3mo 后出现轻至中度肝细胞脂肪变.徐正婕 et al^[2]造模 8wk 出现肝细胞脂肪变及酒精性肝炎样改变.薄爱华 et al^[3]的实验模型周期也较长,林红 et al^[4]的实验模型虽然周期较短,但需每日灌胃 3 次,操作比较烦琐,且易造成实验动物的意外死亡.他们的研究表明,要造成进行性酒精性肝损伤,必须给动物过量酒精,并维持血中持续性高浓度酒精含量.国内外学者已证实,过量铁对人体所有的细胞均有毒害作用.铁的毒性作用主要是在启动和催化氧自由基中起重要作用,最明显的机制为 Fenton 反应 (haber-weiss 反应),反应生成大量活跃的 OH· 自由基,从而损伤线粒体,导致肝脏的损伤^[5,6];酒精性脂肪肝时,肝铁含量增加,肝铁可进一步增强肝组织的脂质过氧化损伤,从而加重脂肪肝^[7-18].实验证实,增加肝铁含量会导致巨噬细胞对肝脏的毒害作用^[19];铁和酒精具有协同毒性作用^[20].白玉 et al^[21]的研究表明,减少肝组织中铁的含量则能有效地减轻脂质过氧化损伤.因此,本实验参照酒精性脂肪肝的发病机制^[22-24]改进了饲料配方,利用铁超载的肝毒性来抑制肝酶活性,影响乙醇代谢以促进酒精性肝损伤的发生和发展.

肝脏是脂质代谢的中心.长期进食高脂饮食时,肝脏从血液中摄取脂肪酸合成 TG(甘油三脂)也相应增加,当肝脏合成 TG 多于肝细胞将其转运出肝时, TG 则沉积于肝细胞内,从而形成脂肪肝.研究证明:高脂低碳水化合物饮食较低脂高碳水化合物饮食更易促进脂肪肝的形成^[25-29],国内学者^[30]研究证实,高脂饮食可加重肝脏的负担,明显增加脂质在肝脏的沉积,从而促进脂肪肝的形成.故而本实验改用高脂饮食,以促进脂肪肝的快速形成.

总之,我们认为,本造模方法与人类酒精性脂肪肝病变类似,实验周期较短,造模方法简单易行,一般实验室均可进行,为今后酒精性脂肪肝的研究提供了较有价值的动物模型.

4 参考文献

- 范建高, 曾民德, 李继强, 邱德凯, 李超群, 李蓉蓉, 彭延申. 肝内脂肪和脂质过氧化与肝纤维化关系的实验研究. *中华内科杂志* 1997;36:808-811
- 徐正婕, 范建高, 王国良, 丁晓东, 田丽艳, 郑晓英. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型. *世界华人消化杂志* 2002;10:392-396
- 薄爱华, 田翠时, 薛贵平, 杜建华, 许永利. 大鼠免疫性和酒精性肝病的形态学变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:157-160
- 林红, 吕森, 张义侠, 王炳元, 傅宝玉. 酒精性肝病大鼠模型的建立. *世界华人消化杂志* 2001;9:24-28
- Tomeckova V, Barnova E, Guzy J, Chavkova Z, Marekova M, Dubayova K, Kusnir J. Fe²⁺-induced oxidative processes in the liver mitochondria of rats. *Bratisl Lek Listy* 2000;101:213-218
- Boireau A, Marechal PM, Meunier M, Dubedat P, Moussaoui S. The anti-oxidant ebselen antagonizes the release of the apoptogenic factor cytochrome c induced by Fe²⁺/citrate in rat liver mitochondria. *Neurosci Lett* 2000;289:95-98
- Djuric Z, Potter DW, Taffe BG, Strasburg GM. Comparison of iron-catalyzed DNA and lipid oxidation. *J Biochem Mol Toxicol* 2001;15:114-119
- Anderson D, Yardley-Jones A, Hambly RJ, Vives-Bauza C, Smykatz-Kloss V, Chua-Anusorn W, Webb J. Effects of iron salts and haemosiderin from a thalassaemia patient on oxygen radical damage as measured in the comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000;20:11-26
- Nepomuceno MF, de Oliveira Mamede ME, Vaz de Macedo D, Alves AA, Pereira-da-Silva L, Tabak M. Antioxidant effect of dipyrindamole and its derivative RA-25 in mitochondria: correlation of activity and location in the membrane. *Biochim Biophys Acta* 1999;1418:285-294
- Shih MK, Hu ML. UVA-induced oxidative damage to rat liver nuclei: reduction of iron ions and the relationship between lipid peroxidation and DNA damage. *Mutat Res* 1999;438:125-132
- Valerio LG Jr, Petersen DR. Characterization of hepatic iron overload following dietary administration of dicyclopentadienyl iron (Ferrocene) to mice: cellular, biochemical, and molecular aspects. *Exp Mol Pathol* 2000;68:1-12
- MacDonald GA, Bridle KR, Ward PJ, Walker NI, Houghlum K, George DK, Smith JL, Powell LW, Crawford DH, Ramm GA. Lipid peroxidation in hepatic steatosis in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:599-606
- George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, Cowley LL, Walker NI, Ward PJ, Jazwinska EC, Powell LW. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998;114:311-318
- Brandsch C, Ringseis R, Eder K. High dietary iron concentrations enhance the formation of cholesterol oxidation products in the liver of adult rats fed salmon oil with minimal effects on antioxidant status. *J Nutr* 2002;132:2263-2269
- Aleynik MK, Leo MA, Aleynik SI, Lieber CS. Polyenylphosphatidylcholine opposes the increase of cytochrome P-4502E1 by ethanol and corrects its iron-induced decrease. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:96-100
- Valerio LG Jr, Petersen DR. Formation of liver microsomal MDA-protein adducts in mice with chronic dietary iron overload. *Toxicol Lett* 1998;98:31-39
- Tjalkens RB, Valerio LG Jr, Awasthi YC, Petersen DR. Association of glutathione S-transferase isozyme-specific induction and lipid peroxidation in two inbred strains of mice subjected to chronic dietary iron overload. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;151:174-181
- Hu ML, Shih MK. Ascorbic acid inhibits lipid peroxidation but enhances DNA damage in rat liver nuclei incubated with iron ions. *Free Radic Res* 1997;26:585-592
- Tsukamoto H, Lin M, Ohata M, Giulivi C, French SW, Brittenham G. Iron primes hepatic macrophages for NF-kappaB activation in alcoholic liver injury. *Am J Physiol* 1999;277:G1240-1250

- 20 Anghileri LJ, Esposito M, Fulcheri E, Zicca A, Cadoni A, Thouvenot P. Iron-ethanol synergism and pathological liver transformation. *In Vivo* 1999;13:13-20
- 21 白玉, 曹治宸, 庄甲举, 勾凌燕, 刘景冬, 宋艳改. 去铁疗法在实验性肝损伤中的保护作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:149-152
- 22 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制. *世界华人消化杂志* 1999;7:75-76
- 23 冯志强, 沈志祥, 谭诗云. 酒精性脂肪肝的发病机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:346-348
- 24 范建高, 曾民德. 脂肪肝. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000:58-81
- 25 Tsukada H, Wang PY, Kaneko T, Wang Y, Nakano M, Sato A. Dietary carbohydrate intake plays an important role in preventing alcoholic fatty liver in the rat. *J Hepatol* 1998;29:715-724
- 26 Bailey SM, Cunningham CC. Effect of dietary fat on chronic ethanol-induced oxidative stress in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1210-1218
- 27 Delzenne NM, Hernaux NA, Taper HS. Lack of protective effect of menhaden oil supplementation on rat liver steatosis induced by a carbohydrate-rich diet. *Food Chem Toxicol* 1998;36:555-561
- 28 Lindros KO, Jarvelainen HA. A new oral low-carbohydrate alcohol liquid diet producing liver lesions: a preliminary account. *Alcohol Alcohol* 1998;33:347-353
- 29 Fisher H, Halladay A, Ramasubramaniam N, Petrucci JC, Dagounis D, Sekowski A, Martin JV, Wagner GC. Liver fat and plasma ethanol are sharply lower in rats fed ethanol in conjunction with high carbohydrate compared with high fat diets. *J Nutr* 2002;132:2732-2736
- 30 丁小云, 李定国, 徐芹芳, 陆汉明. 辛伐他汀对大鼠实验性脂肪肝的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:650-65

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

• 病例报告 •

小肠血管结构不良2例

冯瑞娥, 赵大春, 陈杰

冯瑞娥, 赵大春, 陈杰, 中国医学科学院, 北京协和医院病理科 北京市 100730
项目负责人: 冯瑞娥, 100730, 北京市, 中国医学科学院, 北京协和医院病理科. fengre@hotmail.com
电话: 010-65095521 传真: 010-65295520
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-04-01

摘要

目的: 观察小肠血管结构不良的组织病理形态, 以探讨其临床及组织病理学特点.

方法: 2例因小肠血管结构不良患者分别行部分小肠切除, 标本经甲醛固定, 常规制片, HE染色, 显微镜观察.

结果: 2例患者, 1例女性、81岁, 另1例男性、73岁, 均为长期反复发作的下消化道出血, 核素显像分别为小肠第2组及第5、6组出血. 大体检查分别见1处及多处微隆起红色病灶, 直径0.2-0.8 cm. 显微镜观察见黏膜下层和黏膜固有层静脉血管扩张, 迂曲.

结论: 小肠结构不良病灶较小, 需仔细检查标本, 核素显像有利于确定出血肠段, 显微镜下黏膜固有层静脉血管扩张对此病有诊断意义.

冯瑞娥, 赵大春, 陈杰. 小肠血管结构不良2例. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1192

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1192.asp>

1 病例资料

病例1女, 81岁, 4 a前无明显诱因出现黑便, 约1-2 d 1次, 成形, 量不多, 无呕血及腹痛, 不伴有晕厥、心悸. 血色素60-70 g/L, 曾予止血治疗并间断输血, 400 ml/1-1.5 mo, 症状无缓解. 2 a前, 结肠镜检查于盲肠见一息肉状肿物, 手术切除, 术后病理报告: 结肠绒毛腺管状腺瘤. 术后15 d开始间断排暗红色血便1-3次/d, 胃镜检查未见异常. 核素显像: 消化道第5、6组小肠出血, 手术切除部分小肠.

病例2男, 73岁, 近5 a, 出现黑便10次, 成形, 量不多, 其中一次伴头晕、心悸、大汗, 测血压60/40 mmHg, 曾止血及抗炎治疗. 胃镜检查未见异常, 肠镜检查距屈氏韧带40 cm及70 cm处小肠黏膜毛细血管扩张. 核素显像: 消化道第2组小肠间歇性出血, 故行部分小肠切除术.

病理检查见切除肠管2段, 分别长17 cm、8.6 cm, 周径3-5 cm, 浆膜面光滑, 沿系膜对侧打开肠管, 分别见灰红色、微隆起病灶1处及3处, 直径0.2-0.8 cm, 切面黏膜灰红色. 显微镜检查见黏膜固有层和黏膜下层血管扩张, 管腔不规则迂曲, 同一管壁可见薄厚不均的平滑肌细胞, 部分血管自黏膜下层向上穿过黏膜肌层达黏膜固有层. 病变处黏膜绒毛增宽、扁平、消失, 部分上皮脱落; 黏膜及黏膜下层炎症细胞无明显增多, 间质纤维组织增生不明显, 肌层和浆膜层未见血管异常.

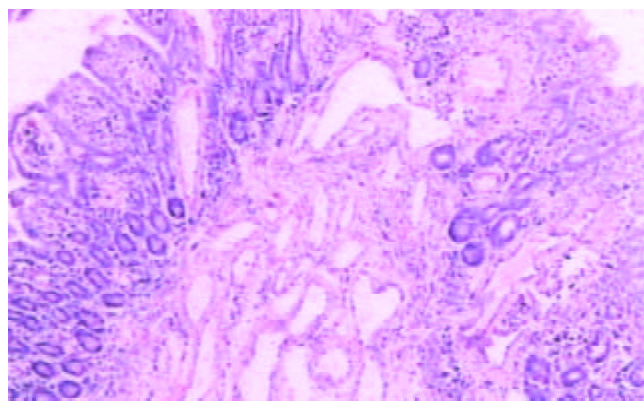


图 小肠黏膜及黏膜固有层内不规则扩张血管(HE10 × 4).

2 讨论

肠道血管结构不良常见于老人, 累及盲肠和右半结肠, 病变较小, 常多发. 由于在临床及病理诊断上有一定的困难, 所以准确的发病率难以统计. 结肠镜检查的发病率约占3-6%. 临床表现为反复发作的下消化道出血, 有时为大出血, 患者可以伴有主动脉狭窄和Von Willebrand病. Mitsudo et al研究认为肠道血管结构不良不是一个肿瘤性疾病, 而是肠道正常血管在老年人的退行性改变.

本文报道2例均为老年患者, 有长期反复发作的下消化道出血, 1例伴贫血, 需长期输血治疗. 核素显像均提示为小肠活动性出血. 切除小肠检查分别见1处及3处黏膜微隆起红色病灶, 直径0.2-0.8 cm. 病灶处显微镜检查可见黏膜固有层及黏膜下层静脉性血管扩张, 迂曲. 因此我们认为核素显像对临床上确诊肠道血管结构不良的出血部位有帮助.

肠道血管结构不良由于病灶较小, 切除后标本中血管有塌陷, 从而造成临床及病理诊断的困难. 因此有研究对切除标本血管内灌注放射性物质及肠道灌注甲醛, 以便更好显示黏膜内扩张的血管, 但该方法均繁琐、费时, 同时增加患者的经济负担, 在日常的病理工作中很难推广. 病理医生了解肠道血管结构不良的大体和镜下特点, 有利于我们在常规病理工作中更好的诊断此病. 对于临床上因反复下消化道出血而可疑为血管结构不良的标本, 病理医生要仔细检查大体标本, 以便发现较小的灰红色病灶. 镜下黏膜固有层静脉性血管扩张对血管结构不良有诊断意义. 虽然此病同时也伴有黏膜下血管扩张, 但由于黏膜下层正常时就有较丰富的毛细血管、小静脉及动脉, 任何原因引起的血液循环改变均可引起黏膜下层血管扩张, 淤血, 因此仅有黏膜下层血管扩张、迂曲不足以诊断此病.

丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞 HCT-8 增生的影响

布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红

布立民, 纪欣, 韩英, 王志红, 北京军区总医院消化内科 北京市 100700
陈刚, 北京军区总医院 北京市 100700
孙淑红, 河北省承德医学院 河北省承德市 067000
布立民, 男, 1971-03-12 生, 河北省承德市人, 满族, 1995 年承德医学院本科毕业, 硕士生。主要从事大肠癌防治研究。
项目负责人: 韩英, 100700, 北京市东城区南门外 5 号, 中国人民解放军北京军区总医院消化内科。
电话: 010-66721168
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-03-28

Effect of sodium butyrate combined with chuanhuning on HCT-8 cell line proliferation

Li-Min Bu, Xin Ji, Ying Han, Gang Chen, Zhi-Hong Wang, Shu-Hong Sun

Li-Min Bu, Xin Ji, Ying Han, Zhi-Hong Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing Command, Beijing 100700, China
Gang Chen, Beijing Military Medical College, Beijing 100700, China
Shu-Hong Sun, Chengde Medical College, Chengde 06700, Hebei Province, China
Correspondence to: Dr. Ying Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing Command, 5 Nanmencang, Dongcheng District, Beijing 100700 China.
Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-28

Abstract

AIM: To study the effect of sodium butyrate in combination with chuanhuning on HCT-8 cell line proliferation.

METHODS: Inhibition of HCT-8 cell line by sodium butyric acid in combination with chuanhuning was detected by MTT assay and growth curve, and apoptosis was determined by morphological assay and flow cytometry (FCM). Apoptotic cells were observed electro-microscopically.

RESULTS: Sodium butyric acid showed inhibitory effect on the proliferation of HCT-8 cell line in dose-dependent and time-dependent manner. The inhibitory rates were 15.7 %, 20.3 %, and 33.3 % ($P < 0.01$) in different groups. Differentiation and apoptosis were observed under electronic microscope. Sub-G1 peak was detected by FCM. Cell cycle was blocked in S phase. The apoptotic rate of combined group 1 were 23.5 %, 48.6 % at 24 h, and 48 h, and the apoptotic rate of combined group 2 were 30.8 %, 54.2 % at 24 h, and 48 h ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Sodium butyric acid can induce apoptosis and differentiation of HCT-8 cells of human colorectal carcinoma, and inhibit proliferation of HCT-8 cells. Apoptotic rate was significantly increased when sodium butyric acid was combined with Chuanhuning.

Bu LM, Ji X, Han Y, Chen G, Wang ZH, Sun SH. Effect of sodium butyrate combined with chuanhuning on HCT-8 cell line proliferation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1193-1196

摘要

目的: 探讨丁酸钠、穿琥宁体外联合应用对结肠癌细胞的影响。

方法: 应用生长曲线、MTT、流式细胞仪、电镜研究丁酸钠、穿琥宁对 HCT-8 的增生抑制及诱导凋亡作用。

结果: 丁酸钠对 HCT-8 细胞有明显抑制作用, 48 h 后各组抑制率分别为 15.7 %, 20.3 %, 33.3 % ($P < 0.01$), 呈现浓度、时间依赖性。电镜下观察可见成熟分化改变及凋亡细胞, 流式细胞仪可检测到亚 G1 峰, 细胞周期分析发现其主要阻滞在 G1 期。穿琥宁与其联合应用, 混合组 1 在 24 h, 48 h 凋亡率为 23.5 %, 48.6 %, 混合组 2 在 24 h, 48 h 凋亡率为 30.8 %, 54.2 % ($P < 0.01$)。

结论: 丁酸钠抑制 HCT-8 细胞增生, 并诱导其成熟分化、凋亡。穿琥宁与其合用使凋亡率增加。

布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红. 丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞 HCT-8 增生的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1193-1196
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1193.asp>

0 引言

大肠癌较常见, 随着人民饮食结构的改变, 大肠癌的发病率与死亡率逐年上升严重威胁人们的身心健康, 平均 5 a 生存率低于 40 %^[1,2]。积极探索大肠癌综合治疗的新手段有重要的临床和社会经济意义。晚期转移性或不可切除的结肠癌患者的化疗仍以 5-FU 为主, 但总有效率仍不满意。研究表明, 多种肿瘤的发生与细胞凋亡障碍有关^[3,4], 诱导肿瘤细胞凋亡可能成为肿瘤治疗中有前景的手段之一。丁酸钠作用于大肠癌细胞株, 可抑制其增生, 阻滞细胞周期, 并诱导细胞凋亡^[5-11], 而穿琥宁与其联合应用, 使抑制作用明显增强, 凋亡率增加, 这为大肠癌的治疗及预防提供了新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 穿琥宁由哈尔滨制药三厂生产, 有效成分为脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯单钾盐, 200 mg 溶于 PBS 溶液 5 mL 中, 4 °C 室温避光保存。丁酸钠 (n-butyric acid sodium) 购自 Sigma 公司, 250 mg 溶于 PBS 溶液 20 mL 中, 4 °C 室温保存, 保存液浓度为 0.11 mol/L, 噻唑兰 (MTT)、碘化丙啶 (PI) Sigma 公司产品。HCT-8 为结肠腺癌细胞, 由北京药物研究所提供, 贴壁培养于 100 mL/L 胎牛血清和青、链霉素的 RPMI1640 的培养液中, 置 37 °C,

50 mL/L CO₂ 饱和湿度的无菌培养箱中培养。

1.2 方法 将对数期生长细胞用胰酶消化成单个分散细胞,分种到每孔含3 mL培养液的6孔板中,培养24 h后加入穿琥宁溶液和丁酸钠溶液,各组的终浓度分别为:穿琥宁0.4 g/L, 1.2 g/L, 2.4 g/L, 丁酸钠1.1, 3.3, 5.5 mol/L,连续培养5 d,每天每组取3孔进行细胞计数,每组取平均值绘制生长曲线。根据生长曲线观察结果,分为穿琥宁1组(0.4 g/L)、穿琥宁2组(1.2 g/L)、穿琥宁3组(2.4 g/L)、丁酸钠1组(1.1 mol/L)、丁酸钠2组(3.3 mol/L)、丁酸钠3组(5.5 mol/L)及混合组1(穿琥宁1.2 g/L+丁酸钠3.3 mol/L)、混合组2(穿琥宁1.2 g/L+丁酸钠5.5 mol/L)进行细胞毒性试验及流式细胞仪检测。

1.2.1 细胞毒性试验 取对数生长期细胞调整至 5×10^6 /L接种到96孔板,使每孔含培养液100 μ L,细胞数 5×10^4 /孔,培养24 h后,分别加入上述浓度的丁酸钠及穿琥宁,作用48 h后每孔加MTT10 μ L,继续培养4 h后弃上清液,每孔加二甲基亚砜100 μ L,振荡10 min,使各孔结晶充分溶解,30 min后采用波长490 nm在酶标仪上测定各孔A值,每浓度组取8个复孔,取平均值按下式计算抑制率:抑制率(%)=(对照组A值-实验组A值)/对照组A值 $\times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞仪分析 取对数期生长细胞以 5×10^6 /L,接种于50 mL培养瓶中,加等量PBS溶液为阳性对照组,适应性培养24 h后,各实验组分别加入相应浓度的药物,在加药后24、48 h终止培养,胰酶消化成单细胞悬液,进行碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪检测,用M μ Lticycle软件进行DNA含量和细胞周期分析。

1.2.3 透射电镜观察 取正常对照组、丁酸钠3.3 mmol组、穿琥宁1.2 mg组和混合组1在加药后24 h用少量胰酶消化脱壁,25 g/L戊二醛固定后,常规脱水染色,制成超薄切片后进行电镜观察。

统计学处理 采用t检验方法, $P < 0.01$, 数据分析软件为STATA软件。

2 结果

2.1 生长曲线观察 低浓度穿琥宁(0.4 g/L)对细胞生长无明显抑制作用,1.2 g/L穿琥宁对细胞生长有轻度抑制作用,2.4 g/L浓度有一定抑制,但细胞仍可生长(图1)。丁酸钠各浓度均有抑制作用,1.1 mol/L组轻度抑制,3.3 mol/L中度抑制,5.5 mol/L有明显抑制作用(图2)。

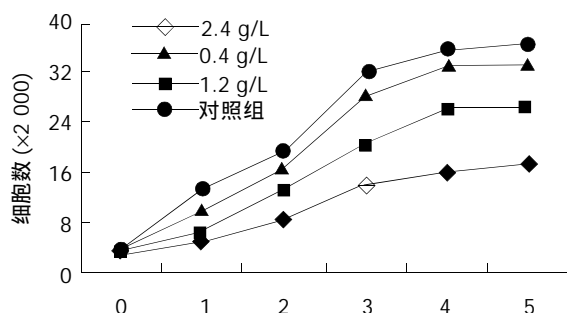


图1 不同浓度穿琥宁的生长抑制曲线。

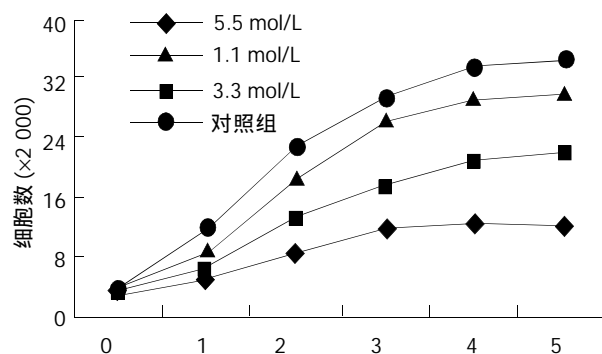


图2 不同浓度丁酸钠的生长抑制曲线。

2.2 细胞毒性试验 根据各组PI值进行抑制率的比较,对照组为3%,穿琥宁0.6 g/L组为7%,穿琥宁1.2 g/L组为13%,穿琥宁2.4 g/L组为24%,丁酸钠1.1 mol/L组为15.7%,丁酸钠3.3 mol/L组为20.3%,丁酸钠5.5 mol/L组为33.3%,混合组1为40%,混合组2为63.1%。穿琥宁各组对HCT-8细胞的毒性作用并不明显,丁酸钠各组随着剂量增加,抑制程度更明显,而混合组抑制明显,超过各组的叠加作用。

2.3 流式细胞仪检测 药物作用后24、48 h分别收集细胞,比较各处理组凋亡率,阴性对照分别为2%,5%,穿琥宁1.2 g/L组为3%,5%,穿琥宁2.4 g/L组为4%,9.2%,丁酸钠3.3 mol/L组为13.7%,17%,丁酸钠5.5 mol/L组为14.1%,23%,混合组1为23.5%,48.6%,混合组2为30.8%,54.2%。且作用48 h后,各混合组均出现明显的亚G1峰,(见图3-6)细胞周期分析显示与对照组比较,穿琥宁对细胞周期无明显影响,而丁酸钠及混合组细胞均可见G1期细胞增加,由54%增加到72%,S期、G2细胞数量下降,由46%下降到28%说明丁酸钠可能影响细胞S期合成,使细胞阻滞在G1期。

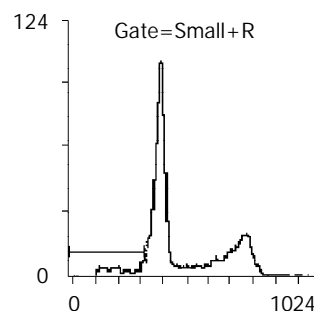


图3 丁酸钠3.3 mol/L作用48 h。

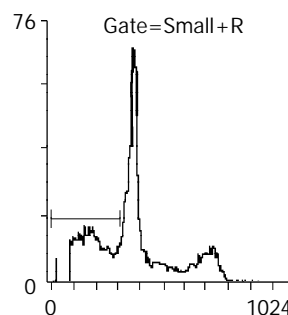


图4 混合组1作用48 h。

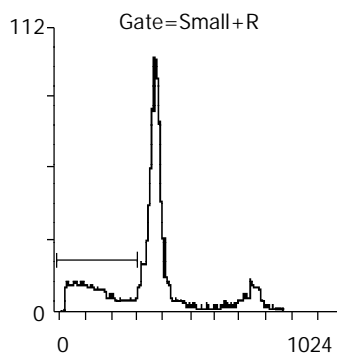


图5 丁酸钠 5.5 mol/L 作用 48 h.

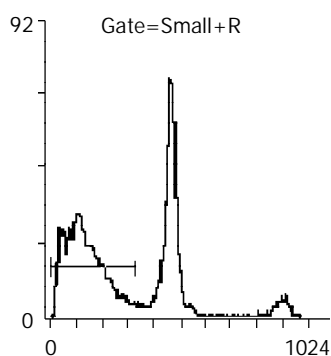


图6 混合组2作用 48 h.

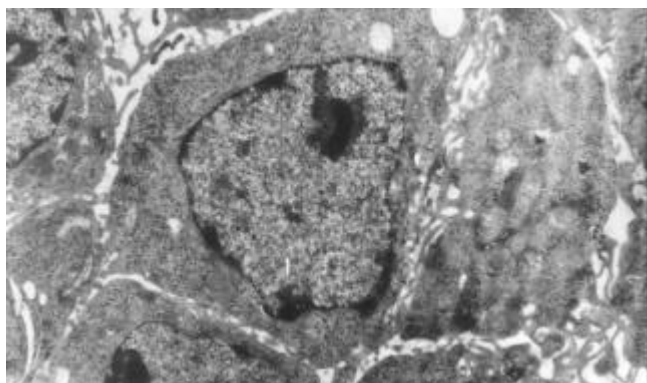


图7 正常 HCT-8 细胞 TEM × 10 000.

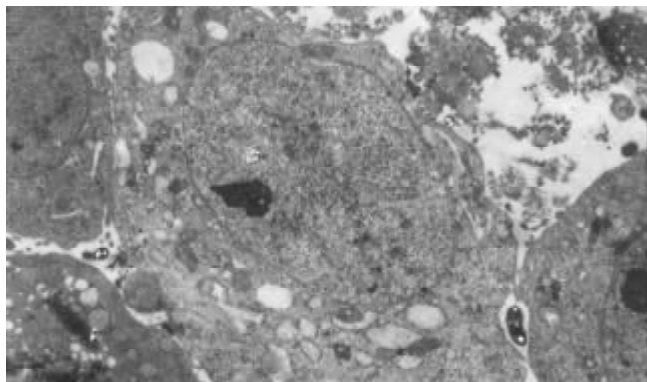


图8 丁酸钠作用 24 h TEM × 10 000.

2.4 电镜下观察 正常 HCT-8 细胞核大, 外形不规则, 细胞质中细胞器稀少, 常染色体丰富, 异染色体散在分布(图 7); 丁酸钠诱导后, 细胞核较规则, 核浆比例

减少, 常染色体向核边浓缩, 异染色质稀少, 多数细胞内质网、高尔基体数量、密度明显增多, 部分细胞细胞质呈大量空泡样改变(图 8). 穿琥宁作用后, 细胞外形圆形改变, 胞膜外微绒毛明显增多, 核浆比例减少(见图 9). 混合组作用后, 可见大量细胞呈凋亡形态, 细胞核皱缩, 染色质浓缩于核边, 呈半月形、环形, 部分细胞细胞质内可见凋亡小体(图 10).

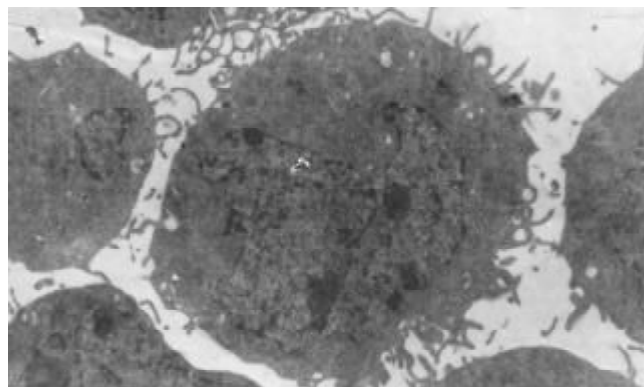


图9 穿琥宁作用 24 h TEM × 10 000.

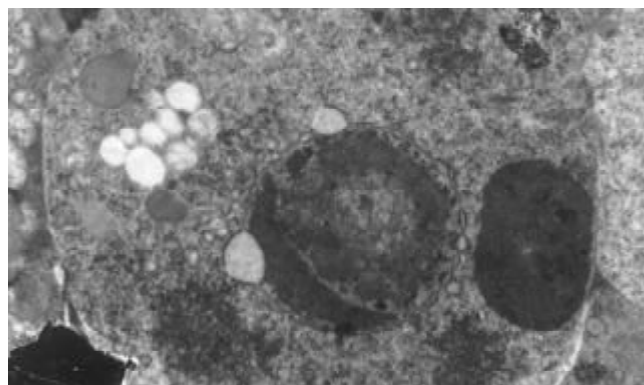


图10 丁酸钠, 穿琥宁联合作用 24 h TEM × 10 000.

3 讨论

大肠癌的发生表现为多基因、多步骤的协同累积作用. 丁酸盐对大肠癌的作用机制是目前研究热点^[12-21]. 丁酸钠可抑制大肠癌细胞生长, 诱导癌细胞成熟分化^[22-24]. 丁酸钠还有诱导多种癌细胞发生凋亡的作用并参与多种基因的表达^[26-28]. 本实验证实, 生理浓度下单独应用丁酸钠不仅可以抑制大肠癌 HCT-8 细胞增生, 而且在一定程度上诱发细胞凋亡, 电镜下可见到细胞核固缩, 染色质浓缩等典型凋亡表现, 未凋亡细胞也有胞核较规则, 核质比例缩小, 异染色质减少, 多数细胞内质网、高尔基体数量及密度明显增加等成熟分化的表现. G1/G0 期是细胞群比例增加, G1 期延长, G1 期向 S 期过渡是细胞开始分化早期效应, 累积于 G1 期的细胞是一些分化或将要分化的细胞群体^[29, 30]. 丁酸钠抑制大肠癌细胞生长, 诱发凋亡的机制尚未清楚. 已知丁酸钠可导致细胞核内多种变化, 包括组蛋白的超大型乙酰化、DNA 的甲基化及非组蛋白 HMG (high mobility group) 的修饰. 其

中以组蛋白的超乙酰基化最为重要,与基因表达和抑制细胞生长有关.丁酸作为乙酰化酶的抑制剂,使组蛋白超乙酰化后,能够诱导抑制多种基因的转录,促进细胞分化,诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡.丁酸钠诱导细胞凋亡的能力可能是饮食中摄入纤维能预防大肠癌发生的机制之一.

穿琥宁为脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯单钾盐的干粉制剂,对W256细胞有一定的抑制作用,其精氨酸复盐能抑制大鼠乳腺癌SHZ-88细胞株生长,随浓度加大,抑制作用加强并能抑制其DNA合成,硒化穿心莲内酯对小鼠肉瘤180的抑制率为74-80%,此外穿心莲内酯具有较强的促急性骨髓白血病M1细胞分裂活性.穿心莲注射治疗对绒毛上皮癌及恶性葡萄胎有一定疗效,有报道穿琥宁静滴能使HCG迅速下降,于治疗后后期辅以抗癌药疗效更佳.

我们曾做过中药提取物与化疗药品联合应用对大肠癌细胞株的相关研究^[31],作者认为单独应用丁酸钠对人大肠癌HCT-8细胞有一定抑制作用,且随时间、剂量的增加而增强,透射电镜及流式细胞式均可检测到细胞凋亡,与相关文献报道相同.单独应用穿琥宁对HCT-8细胞,低浓度无明显抑制作用,高浓度有轻度抑制作用.单独应用穿琥宁不会导致细胞凋亡.穿琥宁与丁酸钠合用,与单独应用丁酸钠相比,对HCT-8细胞有显著抑制作用,与单独应用丁酸钠对照,细胞凋亡率明显增高.穿琥宁对丁酸钠增敏作用的机制尚未清楚.明确丁酸钠和穿琥宁联合对大肠癌HCT-8细胞的作用机制,将为大肠癌的预防与治疗提供一种新途径.

4 参考文献

- 1 李世荣. 进一步提高我国大肠癌的早期诊断水平. 世界华人消化杂志 2001;9:737-738
- 2 Fernandez E, Porta M, Malats N, Belloc J, Gallen M. Symptom-to-diagnosis interval and survival in cancers of the digestive tract. *Dig Dis Sci* 2002;47:2434-2440
- 3 Strul H, Arber N. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective apoptotic anti-neoplastic drugs in the prevention of colorectal cancer: the role of super aspirins. *Isr Med Assoc J* 2000;2:695-702
- 4 高虎, 张方信, 梁君蓉. 药物诱导细胞凋亡与胃癌治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:795-796
- 5 Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwart ZB. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *J Nutr* 2002;132:1812-1818
- 6 Wang Q, Li N, Wang X, Kim MM, Evers BM. Augmentation of sodium butyrate-induced apoptosis by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibition in the KM20 human colon cancer cell line. *Clin Cancer Res* 2002;8:1940-1947
- 7 Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* 2002;132:1012-1017
- 8 Oliver L, Cordel S, Barbieux I, LeCabellec MT, Meflah K, Gregoire M, Vallette FM. Resistance to apoptosis is increased during metastatic dissemination of colon cancer. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:175-180
- 9 Tan S, Seow TK, Liang RC, Koh S, Lee CP, Chung MC, Hooi SC. Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer* 2002;98:523-531
- 10 Giermasz A, Grzela T, Nowis D, Makowski M, Czaika A, Stoklosa T, Lasek W, Dabrowski A, Wlznierowicz M, Macklewlcz A, Jakoolslak M. Butyric acid enhances in vivo expression of hTNF-alpha in transduced melanoma cell line. *Anticancer Res* 2001;21:4001-4004
- 11 Salomone B, Ponti R, Gasco MR, Ugazio E, Quaglini P, Osella-Abate S, Bernengo MG. In vitro effects of cholesteryl butyrate solid lipid nanospheres as a butyric acid pro-drug on melanoma cells: evaluation of antiproliferative activity and apoptosis induction. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:663-673
- 12 Sasahara Y, Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Tonaka N, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of promoter-dependent transcriptional activity of inducible nitric oxide synthase by sodium butyrate in colon cancer cells. *Cancer Lett* 2002;177:155-161
- 13 Leng SL, Leeding KS, Gibson PR, Bach LA. Insulin-like growth factor-II renders LIM 2405 human colon cancer cells resistant to butyrate-induced apoptosis: a potential mechanism for colon cancer cell survival in vivo. *Carcinogenesis* 2001;22:1625-1631
- 14 Hernandez A, Thomas R, Smith F, Sandberg J, Kim S, Chung DH, Evers BM. Butyrate sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Surgery* 2001;130:265-272
- 15 Iacomino G, Tecce MF, Grimaldi C, Tosto M, Russo GL. Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:1280-1289
- 16 Rosato RR, Wang Z, Gopalkrishnan RV, Fisher PB, Grant S. Evidence of a functional role for the cyclin-dependent kinase-inhibitor p21WAF1/CIP1/MDA6 in promoting differentiation and preventing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by sodium butyrate in human myelomonocytic leukemia cells (U937). *Int J Oncol* 2001;19:181-191
- 17 Wachtershauser A, Akoglu B, Stein J. HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis* 2001;22:1061-1067
- 18 Bidon N, Brichory F, Thomas D, Cavalier A, Caulet-Maugendre S, Bourguet P, Dazord L. Sodium butyrate induces growth inhibition and modulates galectin-8 expression in human lung carcinoma cells. *Anticancer Res* 2001;21:1049-1055
- 19 Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S, Hara I. Overexpression of Bcl-2 regulates sodium butyrate- and/or docetaxel-induced apoptosis in human bladder cancer cells both in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2001;93:26-32
- 20 Rabizadeh E, Bairey O, Aviram A, Ben-Dror I, Shaklai M, Zimra Y. Doxorubicin and a butyric acid derivative effectively reduce levels of BCL-2 protein in the cells of chronic lymphocytic leukemia patient. *Eur J Haematol* 2001;66:263-271
- 21 Bras-Goncalves RA, Pocard M, Formento JL, Poirson-Bichat F, De Pinieux G. Synergistic efficacy of 3n-butyrate and 5-fluorouracil in human colorectal cancer xenografts via modulation of DNA synthesis. *Gastroenterology* 2001;120:874-888
- 22 Wachtershauser A, Stein J. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells occurs independently from p27. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:295-299
- 23 Wu JT, Archer SY, Hinnebusch B, Meng S, Hodin RA. Transient vs. prolonged histone hyperacetylation: effects on colon cancer cell growth, differentiation, and apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G482-490
- 24 Milovic V, Teller IC, Turchanowa L, Caspary WF, Stein J. Effect of structural analogues of propionate and butyrate on colon cancer cell growth. *Int J Colorectal Dis* 2000;15:264-270
- 25 Karasawa Y, Murakami A, Okisaka S. Apoptosis after butyrate-induced differentiation in retinoblastoma cell line Y-79. *Jpn J Ophthalmol* 2000;44:601-609
- 26 Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S. Sodium butyrate induces apoptosis in human renal cell carcinoma cells and synergistically enhances their sensitivity to anti-Fas-mediated cytotoxicity. *Int J Oncol* 2000;17:1213-1218
- 27 Tsai LC, Hung MW, Chang GG, Chang TC. Apoptosis induced by the sodium butyrate in human gastric cancer TMK-1 cells. *Anticancer Res* 2000;20:2441-2448
- 28 Litvak DA, Hwang KO, Evers BM, Townsend CM Jr. Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate. *Anticancer Res* 2000;20:779-784
- 29 李丰. 丁酸钠诱导的人大肠癌细胞成熟分化中的表型变化. 中国医科大学学报 2000;29:404-407
- 30 DiGiuseppe JA, Weng LJ, Yu KH, Fu S, Kastan MB, Samid D, Gore SD. Phenylbutyrate-induced G1 arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells: structure-function analysis. *Leukemia* 1999;13:1243-1253
- 31 邹明, 韩英, 纪欣. 当归促进大肠癌 HCT-8 细胞增生及抑制 5-氟尿嘧啶致凋亡的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:475-476

大肠癌组织胸苷磷酸化酶/血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义

余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲

余细球, 邓长生, 朱尤庆, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
程芳洲, 咸宁医学院内科 湖北省咸宁市 437100
余细球, 女, 1970-05-04 生, 湖北通城人, 汉族, 1993 年湖北医科大学本科毕业, 现武汉大学医学院博士在读, 主治, 主要从事胃肠肿瘤的研究。
项目负责人: 邓长生, 430071, 湖北省武汉市武昌东胡路 169 号, 湖北武汉大学中南医院消化内科。
电话: 027-87335764
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2003-01-13

Expression and significance of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in human colorectal cancer tissue

Xi-Qiu Yu, Chang-Sheng Deng, You-Qing Zhu, Fang-Zhou Cheng

Xi-Qiu Yu, Chang-Sheng Deng, You-Qing Zhu, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Fang-Zhou Cheng, Department of Internal Medicine, Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, 169 Donghu, Wuchang, 430071, Hubei Province China.
Received: 2002-11-29 Accepted: 2003-01-13

Abstract

AIM: To study the relationship between thymidine phosphorylase (TP)/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), microvessel density (MVD) and the clinical pathological characteristics of colorectal carcinoma.

METHODS: TP/PD-ECGF protein expression and microvessel density (MVD) in 50 colorectal carcinomas were examined by means of immunohistochemical staining S-P method and the relationship of TP/PD-ECGF, MVD and clinical pathological characteristics and its prognosis of colorectal cancers were analysed.

RESULTS: MVD and TP/PD-ECGF expression positively correlated with the size of the tumour, Dukes stage, lymph node metastasis and depth of invasion ($P < 0.01$), but no significant correlation with the histologic type ($P > 0.05$) was found. There was a positive correlation between MVD and TP/PD-ECGF expression ($r = 0.72$).

CONCLUSION: TP/PD-ECGF is highly related to angiogenesis of colorectal carcinoma and promotes invasion and metastasis. TP/PD-ECGF expression or MVD may be one of the predictors of the biological behaviors of colorectal carcinoma, and they may serve as prognostic factors and guide the treatment.

Yu XQ, Deng CS, Zhu YQ, Cheng FZ. Expression and significance of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in human colorectal cancer tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(8):1197-1199

摘要

目的: 探讨胸苷磷酸化酶 (thymidine phosphorylase, TP)/血小板衍生内皮细胞生长因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF) 和微血管密度 (microvessel density, MVD) 与大肠癌临床病理特征的关系。

方法: 应用免疫组化 SP 法, 检测 50 例大肠癌组织中胸苷磷酸化酶/即血小板衍生内皮细胞生长因子蛋白表达及微血管密度, 分析 TP/PD-ECGF 和 MVD 及其与大肠癌临床病理因素及预后的关系。

结果: TP/PD-ECGF 表达强度和 MVD 与大肠癌的肿块大小、Dukes 分期、淋巴结转移、浸润深度密切相关 ($P < 0.01$); 而与肿瘤分化无关 ($P > 0.05$)。MVD 与 TP/PD-ECGF 表达二者呈正相关 ($r = 0.72$)。

结论: TP/PD-ECGF 与大肠癌血管生成密切相关, 对大肠癌的生长与浸润转移起促进作用。TP/PD-ECGF 与 MVD 可作为反映大肠癌生物学行为的指标, 同时也是判断预后和指导辅助治疗的有效指标。

余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲. 大肠癌组织胸苷磷酸化酶/血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11(8):1197-1199
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1197.asp>

0 引言

肿瘤的发生、发展与转移均需依赖新生血管的形成。已知有许多影响血管生成的因子, 如胸苷磷酸化酶 (thymidine phosphorylase, TP) 即血小板衍生内皮细胞生长因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF) 是该领域相对较新的一个血管因子。为探讨大肠癌生物学行为中 TP/PD-ECGF 与肿瘤血管形成的作用, 应用免疫组化 SP 法检测人大肠癌组织中 TP/PD-ECGF 表达和微血管密度 (microvessel density, MVD), 分析 TP/PD-ECGF 表达和 MVD 及其与大肠癌各临床病理指标间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 我院 1992/1995 年手术切除并经病理证实的大肠癌石蜡标本 50 例, 男 32 例, 女 18 例, 年龄 32-79 (平均 58) 岁。术前均未进行过任何辅助治疗。Dukes: A 期 9 例, B 期 10 例, C 期 16 例, D 期 15 例; 发生淋巴结转移 29 例, 无淋巴结转移 21 例。所有病例均获得术后 5 a

的随访资料。

1.2 方法 制备4 μ m连续切片3张, 1张用于HE染色, 另2张分别行免疫组化检测TP/PD-ECGF表达及MVD值(MVD检测用CD₃₄标记内皮细胞)。采用免疫组化SP法, DAB显色。微血管染色及TP/PD-ECGF染色用微波修复抗原。TP/PD-ECGF单克隆抗体、鼠抗人CD₃₄、SP试剂盒均购自北京中山生物试剂公司。TP/PD-ECGF表达阳性根据细胞染色强度和染色细胞所占面积二者积分来判断。染色强度积分为: 不染色=0; 轻度染色=1; 中度染色=2; 强染色=3。染色面积分为: 无细胞染色=0; <25%细胞染色=1; 25-50%细胞染色=2; >50%细胞染色=3。若两种积分之和>2, 则为TP/PD-ECGF表达阳性, ≤ 2 则为表达阴性^[1]。肿瘤微血管密度(MVD)测定先用低倍镜($\times 40$ 倍)扫视整个切片, 寻找高血管密度区即“热点”区(即微血管生长集中区), 再转到高倍镜($\times 200$ 倍)下精确计数微血管数量。取3个热点区微血管数量的平均值视作为每例的微血管数^[2]。

统计学处理 TP/PD-ECGF以(+)或(-)表示, 为计数资料; MVD以($\bar{x} \pm s$)表示。TP/PD-ECGF和MVD之间关系用t检验; TP/PD-ECGF与临床病理因素之间用 χ^2 检验; MVD与临床病理因素之间关系用t检验, 与肿瘤分期关系用单因素方差分析和检验; 生存率采用Kaplan-Meier法计算, 生存期差别的比较用Log-rank检验; $P < 0.05$, 有统计学意义。

2 结果

在50例标本中, TP/PD-ECGF阳性35例, 阳性率70%。TP/PD-ECGF阳性染色主要定位于肿瘤间质细胞胞质, 呈棕黄色。偶有胞核染色。而肿瘤细胞团阳性染色少。CD34⁺将微血管内皮细胞胞质染成黄褐色, 呈环状。微血管密集于肿瘤基质, 尤其肿瘤浸润前缘的微血管较肿瘤内部密集, MVD值10-57, 平均为 36.5 ± 10.2 (图2-5)。

2.1 TP/PD-ECGF、MVD与大肠癌各病理因素的关系

TP/PD-ECGF阳性组中的MVD值 45.5 ± 10.2 明显高于TP/PD-ECGF阴性组 20.3 ± 9.3 ($P < 0.01$)。TP/PD-ECGF表达与肿块大小($P < 0.05$)、Dukes分期($P < 0.05$)、浸润深度($P < 0.01$)、淋巴结转移($P < 0.01$)密切相关, 与肿瘤分化程度无关($P > 0.05$)。MVD值在肿瘤大于5 cm组明显高于小于5 cm组($P < 0.05$)。肿瘤侵及浆膜外组明显高于肿瘤局限于浆膜组($P < 0.01$)。有淋巴结转移组MVD高于无淋巴结转移组($P < 0.01$)。MVD与肿瘤分期关系显示各期的MVD值有差别($P < 0.05$)。提示随着肿瘤分期增加而增加, 但与肿瘤分化程度无关(表1)。

2.2 TP/PD-ECGF、MVD与预后 在50例患者中, 有26例术后存活5 a或5 a以上, 5 a存活率为52%。其中TP阳性组术后5 a存活率42.8%, 明显低于TP阴性组的术后5 a生存率73.3%, ($P < 0.01$, 图1)。

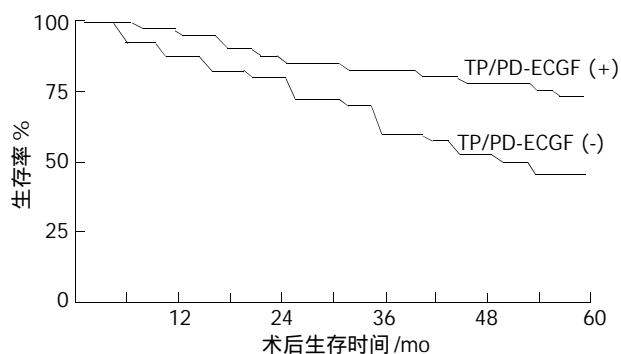


图1 TP/PD-ECGF与Kaplan-Meier生存率曲线图。

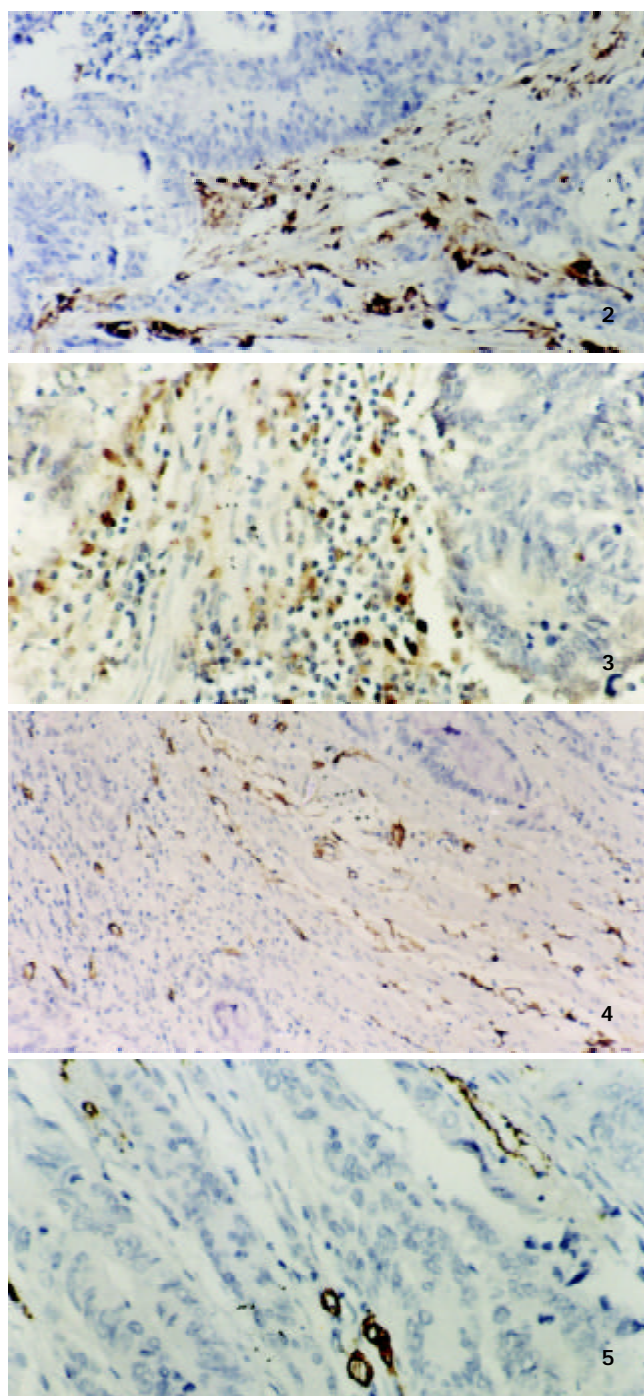


图2 人大肠癌TP/PD-ECGF阳性表达多集中在间质 $\times 100$ 。

图3 人大肠癌组织中TP/PD-ECGF阳性表达, $\times 200$ 。

图4 人大肠癌组织CD₃₄表达, 微血管增生主要集中于间质。 $\times 100$ 。

图5 人大肠癌组织CD₃₄表达呈黄褐色, $\times 200$ 。

表1 大肠癌 TP/PD-ECGF、MVD 与其病理因素关系

病理特征	n	TP/PD-ECGF		MVD 值($\bar{x} \pm s$)
		(+)	(-)	
肿瘤大小 <5 cm	28	16	12	18.3 \pm 8.0
>5 cm	22	19	3 ^a	45.3 \pm 10.1 ^b
浸润深度 浆膜及以外	31	26	5	50.6 \pm 9.5
未及浆膜	19	9	10 ^b	27.4 \pm 12.8 ^b
肿瘤分化 差或较差	30	22	8	41.5 \pm 10.3
好或较好	20	13	7	36.4 \pm 9.2
淋巴结转移 有	29	24	5	52.7 \pm 13.6
无	21	11	10 ^b	34.3 \pm 7.9 ^b
Dukes A	9	4	5 ^a	19.8 \pm 7.2 ^a
B	10	5	5	33.2 \pm 11.3
C	16	12	4	44.7 \pm 13.0
D	15	14	1	56.5 \pm 18.2

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 对应组.

3 讨论

胸苷磷酸化酶(TP)是嘧啶合成分解过程中的一个酶,与血小板衍生内皮细胞生长因子(PD-ECGF)为同一物质.他能可逆催化胸腺嘧啶核苷为胸腺嘧啶和 2-脱氧-核糖-1-磷酸,后者去磷酸化的产物 2-脱氧-D-核糖具有血管生成和催化内皮细胞活性^[3].该酶在体外具内皮细胞催化性,体内有血管生成活性,是少有的具酶活性的促血管生长因子,主要分布于人体血小板和胎盘,他在宫颈癌、肝癌、胃癌、大肠癌等许多实体瘤中异常增高,其表达增高往往预示其预后不良^[4-6].TP/PD-ECGF与宫颈癌、食管癌、胃癌、肝癌组织中MVD密切相关,甚至可使肿瘤细胞凋亡减少^[7-10].TP/PD-ECGF、MVD一起成为许多实体瘤的发生、发展及预后的评判指标.

我们发现在大肠癌中 TP/PD-ECGF 阳性组其 MVD 高,其表达强度与 MVD 值呈正相关.从免疫组化图片上,我们发现 TP/PD-ECGF 阳性表达多见于肿瘤基质也即微血管丰富区,而少微血管的肿瘤细胞团也少有 TP/PD-ECGF 阳性表达.说明 TP/PD-ECGF 与肿瘤微血管密度密切相关,位于肿瘤间质的 TP/PD-ECGF 对大肠癌肿瘤的微血管生成与发展起重要作用.这与 Tanioka et al^[11]在脑星形细胞瘤中观察到的结果一致.同时还发现 TP/PD-ECGF 表达强度也与肿块大小、浸润深度、分期及淋巴结转移密切相关. TP/PD-ECGF 阳性表达多见于肿块大于 5 cm、肿瘤浸润深及浆膜外、分期高、伴淋巴结转移的大肠癌患者.表明 TP/PD-ECGF 作为促血管生长因子,是大肠癌血管形成与维持的重要因子,对大肠癌的生长、浸润、转移起重要作用.

我们还发现, TP/PD-ECGF 表达、MVD 与大肠癌预后也有相关性. TP/PD-ECGF 阳性组其 MVD 值(46 \pm 10)明显高于 TP/PD-ECGF 阴性组 MVD 值(20 \pm 13),且 TP/PD-ECGF 阳性组其术后 5 a 生存率 42.8 % 明显低于 TP/PD-ECGF 阴性组 73.3 %. 因此,检测大肠癌中 TP/

PD-ECGF 不仅可以反映大肠癌内微血管生成情况,也可以反映大肠癌生长、浸润、转移能力,同时也反映其预后情况.

5-氟尿嘧啶(5-FU)是临床上广泛用于结肠癌、乳腺癌等肿瘤化疗药. TP/PD-ECGF 酶能催化 5-FU 与其前体物质(如:氟铁龙、希罗达 capecitabine),阻断 DNA 合成,消除潜在血管生长因子^[12,13].实现抗肿瘤生长与抗肿瘤血管生成的统一.因 TP/PD-ECGF 表达在肿瘤组织中高于正常组织,故在 TP/PD-ECGF 酶表达增高的肿瘤如消化道肿瘤、乳腺癌等,应用 5-FU 及其前体药具有确切疗效.因此检测肿瘤组织中 TP/PD-ECGF 表达也是提示化疗有效的一个预测因素,具有重要的临床意义.

4 参考文献

- Mattern J, Koomagi R, Volm M. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:1459-1463
- Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36:169-180
- Stevenson DP, Milligan SR, Collins WP. Effects of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase, substrate, and products in a three-dimensional model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998;152:1641-1646
- Takebayashi Y, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Furukawa T, Kinoshita F, Aoki D, Okumura H, Yamada Y, Akiyama S, Aikou T. The activity and expression of thymidine phosphorylase in human solid tumours. *Eur J Cancer* 1996;32:1227-1232
- Jin-no K, Tanimizu M, Hyodo I, Nishikawa Y, Hosokawa Y, Endo H, Doi T, Mandai K, Ishitsuka H. Circulating platelet-derived endothelial cell growth factor increases in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer* 1998;82:1260-1267
- Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Wen H, Tamaya T. Clinical implication of expression of platelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF) in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Res* 1999;59:3041-3044
- Tang W, Wang X, Utsunomiya H, Nakamuta Y, Yang Q, Zhang Q, Zhou G, Tsubota Y, Mabuchi Y, Li L, Kakudo K. Thymidine phosphorylase expression in tumor stroma of uterine cervical carcinomas: histological features and microvessel density. *Cancer Lett* 2000;148:153-159
- Okamoto E, Osaki M, Kase S, Adachi H, Kaibara N, Ito H. Thymidine phosphorylase expression causes both the increase of intratumoral microvessel and decrease of apoptosis in human esophageal carcinomas. *Pathol Int* 2001;51:158-164
- Osaki M, Sakatani T, Okamoto E, Goto E, Adachi H, Ito H. Thymidine phosphorylase expression results in a decrease in apoptosis and increase in intratumoral microvessel density in human gastric carcinomas. *Virchow Arch* 2000;437:31-36
- Guo L, Kuroda N, Toi M, Miyazaki E, Hayashi Y, Enzan H, Jin Y. Increased expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in human hepatocellular carcinomas correlated with high Edmondson grades and portal vein tumor thrombosis. *Oncol Rep* 2001;8:871-876
- Tanioka K, Takeshima H, Hirano H, Kimura T, Nagata S, Akiyama S, Kuratsu J. Biological role of thymidine phosphorylase in human astrocytic tumors. *Oncol Rep* 2001;8:491-496
- Griffiths L, Stratford J. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in tumor growth and response to therapy. *British J Cancer* 1997;76:689-693
- Matsuura T, Fukuda Y, Fujitaka T, Nishisaka T, Sakatani T, Ito H. Preoperative treatment with tegafur suppositories enhances apoptosis and reduces the intratumoral microvessel density of human colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88:1007-1015

多粘菌素 B 及其模拟肽体外抗内毒素的实验研究

万志红, 王宇明, 刘国栋

万志红, 王宇明, 刘国栋, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

万志红, 女, 1970-10-11 生, 安徽长丰县人, 汉族. 1993 年重庆医科大学大学本科毕业, 2000 年第三军医大学博士毕业, 讲师. 主要从事 LPS 致炎机制及病毒性肝炎发病机制的研究.

项目负责人: 万志红, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. zhihong_wan@sohu.com

电话: 023-68754289 传真: 023-68754412

收稿日期: 2002-12-23 接受日期: 2003-01-13

Experimental studies of polymyxin B and its mimic peptide anti-LPS in vitro

Zhi-Hong Wan, Yu-Ming Wang, Guo-Dong Liu

Zhi-Hong Wan, Yu-Ming Wang, Guo-Dong Liu, Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Dr. Zhi-Hong Wan, Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. zhihong_wan@sohu.com

Received: 2002-12-23 Accepted: 2003-01-13

Abstract

AIM: To observe the binding ability of FITC-LPS and PMBC, changes of IL-6, TNF α before and after polymyxin B (PMB) or its mimic peptide treatment.

METHODS: LPS (or FITC-LPS) 100 μ g/L was incubated with PMB 100 mg/L, peptide 0 : 100 mg/L, peptide 1 : 100 mg/L or PBS at 37 $^{\circ}$ C and 5 mL/L normal human serum respectively for 30 min to stimulate PBMC. Binding ability of FITC-LPS and CD14 expression of PBMC were assayed by flow cytometer; IL-6 and TNF α level in culture supernatant were assayed by ELISA.

RESULTS: After incubation with PMB or peptide 1, mean fluorescence intensity of FITC-LPS binding to cell membrane decreased (8.1 ± 1.8 vs 15.8 ± 4.5 $P < 0.01$; 8.5 ± 2.0 vs 15.8 ± 4.5 $P < 0.01$, respectively). Positive rate of CD14 increased in 3 h after LPS stimulation, Incubation with PMB or peptide 1 could reduce CD14 expression of PBMC stimulated by LPS ($45.5 \pm 6.2\%$ vs $68 \pm 5.5\%$ $P < 0.01$; $43.2 \pm 4.1\%$ vs $68 \pm 5.5\%$ $P < 0.01$, respectively). Pretreatment with PMB or peptide 1 could decrease TNF- α (15.30 ± 1.0 vs 45.9 ± 5.7 $P < 0.01$; 18.2 ± 0.9 vs 45.9 ± 5.7 $P < 0.01$, respectively) and IL-6 level (50.5 ± 4.2 vs 176.4 ± 12.1 $P < 0.01$; 58.1 ± 4.1 vs 176.4 ± 12.1 $P < 0.01$, respectively) stimulated by LPS significantly.

CONCLUSION: PMB and its mimic peptide (peptide 1) might suppress inflammation stimulated by LPS via down-regulating CD14 expression, and decrease cytokines level.

Wan ZH, Wang YM, Liu GD. Experimental studies of polymyxin B and its mimic peptide anti-LPS in vitro. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1200-1202

摘要

目的: 观察 PMB 及其模拟肽处理前后 FITC-LPS 与 PMBC 的结合能力及培养上清中 IL-6、TNF α 的含量变化.

方法: LPS(或 FITC-LPS)100 μ g/L 分别与 PMB 100 mg/L、peptide 0 100 mg/L、peptide 1 100 mg/L、PBS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后(分别加入 50 mL/L NHS)刺激 PBMC, 用流式细胞仪检测 FITC-LPS 与 PBMC 的结合能力及 CD14 表达; ELISA 法检测培养上清中细胞因子 TNF α 、IL-6 含量.

结果: FITC-LPS 分别与 PMB、peptide1 孵育后, 细胞膜平均通道荧光显著减少, LPS 与 PBMC 的结合能力显著降低(分别为 8.1 ± 1.8 vs 15.8 ± 4.5 $P < 0.01$; 8.5 ± 2.0 vs 15.8 ± 4.5 $P < 0.01$). 100 μ g/L LPS 刺激 PBMC3h 后 CD14 阳性率明显增加; LPS 分别与 PMB 和 peptide1 预孵育后可显著降低 LPS 刺激 PBMC 细胞膜 CD14 表达(分别为 $45.5 \pm 6.2\%$ vs $68 \pm 5.5\%$ $P < 0.01$; $43.2 \pm 4.1\%$ vs $68 \pm 5.5\%$ $P < 0.01$). LPS 刺激 PBMC 分泌 TNF- α 和 IL-6 显著增加, LPS 分别与 PMB 和 peptide1 预孵育后能显著减少细胞因子 TNF- α (分别为 15.30 ± 1.0 vs 45.9 ± 5.7 $P < 0.01$; 18.2 ± 0.9 vs 45.9 ± 5.7 $P < 0.01$) 和 IL-6 分泌(分别为 50.5 ± 4.2 vs 176.4 ± 12.1 $P < 0.01$; 58.1 ± 4.1 vs 176.4 ± 12.1 $P < 0.01$).

结论: 多粘菌素 B 及其模拟肽(Peptide1)可能通过下调 PBMC CD14 表达, 降低细胞因子水平来减少 LPS 诱导的炎症反应.

万志红, 王宇明, 刘国栋. 多粘菌素 B 及其模拟肽体外抗内毒素的实验研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1200-1202

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1200.asp>

0 引言

近年来, 肠源性内毒素血症(IETM)与肝病的关系日益受到重视. 由于内毒素自身及激活枯否细胞所造成的肝损伤, 称为继发性肝损伤, 对肝炎的发展有着重要作用. IETM 重者往往引起过度炎症反应, 发生严重肝坏死, 而导致重症肝炎甚至发生肝衰竭, 轻者可出现反复与持续的肝细胞损伤和相伴随的炎症细胞浸润与肝组织的修复, 导致肝纤维化. 因此, 对肝病患者进行抗内毒素治疗已变得尤为重要^[1-6]. 到目前为止, 已报道的能结合并能中和 LPS 的蛋白质只有少数几种, 包括多粘菌素 B、螯抗 LPS 因子以及杀菌性/通透性增强蛋

白(BPI)等^[7-16].有学者证实多粘菌素 B(PMB)能与 LPS 的类脂 A 高亲和力、特异性结合,具有中和 LPS 及降低 LPS 攻击动物的死亡率,但由于其具有神经毒性和肾毒性,在临床上的应用受到一定的限制.近来有研究者提出模拟 PMB 功能区结构合成的模拟肽,可能在降低其毒性的情况下,保留了 PMB 特异性中和 LPS 的特性^[7,17].我们观察 PMB 及其模拟肽处理前后 FITC-LPS 与 PMBC 的结合能力及培养上清中 IL-6, TNF α 的含量变化.

1 材料和方法

1.1 材料 PMB(AMRESCO 公司)、PMB 模拟肽(peptide1)及对照肽(peptide 0)由北京赛百盛公司合成(peptide 0: lys-phe-leu-lys-lys-thr, peptide1: lys-phe-phe-lys-phe-phe-lys-phe-phe)、FITC-LPS (O111:B4): Sigma 产品,小鼠抗人 CD14 抗体, FITC 标记羊抗小鼠 IgG: 北京中山公司进口分装.人 TNF α 、IL-6 检测试剂盒: Pharamigen 产品.淋巴细胞分离液: 上海试剂厂.人外周血单个核细胞(PBMC)分离: 正常人抗凝静脉血 10 mL, 小心加入已加 10 mL 淋巴细胞分离液的离心管中, 500 g 20 °C 离心 20 min, 小心吸取离心管白色中间层, PBS 洗 2 次备用.

1.2 方法 分离人外周血单个核细胞(PBMC), 调整密度为 1×10^6 /L, 在含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中常规培养. FITC-LPS 100 μ g/L 分别与 PMB 100 mg/L、peptide 0 100 mg/L、peptide 1 100 mg/L、PBS, 分别加入 50 mL/L 正常人血清(NHS)37 °C 孵育 30 min, 另设对照组. 分别加入培养的 PBMC(约 10^6 cells) 37 °C, 50 mL/L 培养箱中孵育 3 h, 上流式细胞仪测定 10 000 个细胞, 计算细胞平均通道荧光(MFI).

1.2.1 间接免疫荧光染色观察 CD14 表达^[18] LPS 100 mL/L 分别与 PMB 100 mg/L、peptide 0 100 mg/L、peptide1 100 mg/L、PBS, 37 °C 孵育 30 min 后(分别加入 50 mL/L NHS), 分别加入 1×10^6 PBMC, 37 °C 再孵育 30 min. 取细胞悬液(约 10^5 cells)于尖底离心管中, 离心去上清, 加入小鼠抗人 CD14 抗体 1:500 100 μ L, 充分混匀, 置 4 °C 30 min; 用含 20 mL/L 小牛血清、1 g/L NaN₃ 的 PBS 洗 3 次, 每次 3 000 r/min 5 min 去上清, 细胞沉淀加 FITC 标记羊抗小鼠 IgG (1:200)100 μ L, 充分混匀, 置 4 °C 30 min, 用含 20 mL/L 小牛血清、1 g/L NaN₃ 的 PBS 洗 3 次, 每次 3 000 r/min 5 min. 沉淀细胞用 40 g/L 多聚甲醛 PBS 0.5 ml 固定, 避光保存于 4 °C. 在流式细胞仪上测定 10 000 个细胞, 计算阳性细胞率(%).

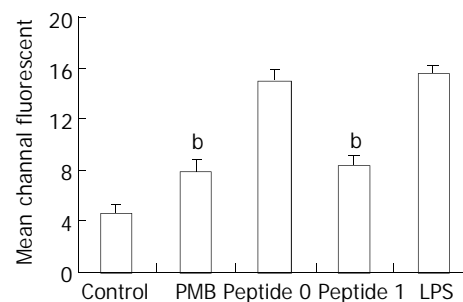
1.2.2 培养上清中细胞因子 TNF α , IL-6 检测 LPS 100 μ g/L 分别与 PMB 100 mg/L、peptide 0 100 mg/L、peptide 1 100 mg/L、PBS, 37 °C 孵育 30 min 后(分别加入 50 mL/L NHS), 分别加入 1×10^6 PBMC 37 °C, 50 mL/L 培养箱中再孵育 3 h, 收集培养上清. 用 ELISA 法检测培养上

清中细胞因子 TNF α , IL-6 含量, 参照试剂说明书操作.

统计学处理 t 检验.

2 结果

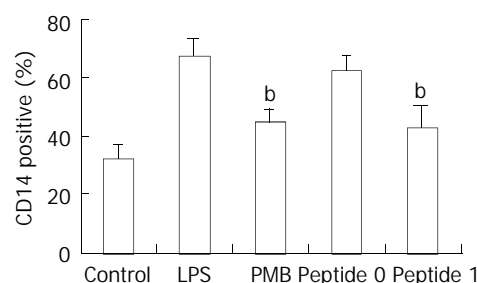
在正常人血清存在的情况下, FITC-LPS 分别与 PMB, peptide1 孵育后, 细胞膜平均通道荧光显著减少, LPS 与细胞膜结合减少, LPS 与 PMBC 的结合能力显著降低. peptide 0 作用不显著(图 1).



^bP < 0.01 vs LPS

图 1 FITC-LPS 与 PBMC 结合的分析.

2.1 CD14 表达 在正常人血清存在的情况下, 100 μ g/L LPS 刺激 PBMC 3 h 后 CD14 阳性率明显增加(P < 0.01 vs Control). LPS 分别与 PMB 和 peptide1 预孵育后可显著降低 LPS 刺激 PBMC 细胞膜 CD14 表达(P < 0.01 vs LPS). peptide 0 作用不显著(图 2).



^bP < 0.01 vs LPS

图 2 PBMC 膜 CD14 表达.

2.2 培养上清中 TNF α , IL-6 含量 LPS 刺激 PBMC 分泌 TNF- α 和 IL-6 显著增加, LPS 分别与 PMB 和 peptide1 预孵育后能显著减少细胞因子 TNF- α 和 IL-6 分泌. peptide 0 作用不显著(表 1).

表 1 培养上清中 TNF α , IL-6 含量($\bar{x} \pm s$, μ g/L)

分组	TNF- α	IL-6
对照	9.1 \pm 1.1	39.0 \pm 2.8
PMB 预处理	15.30 \pm 1.0 ^b	50.5 \pm 4.2 ^b
Peptide0 预处理	40.3 \pm 3.8	169.1 \pm 11.2
Peptide1 预处理	18.2 \pm 0.9 ^b	58.1 \pm 4.1 ^b
LPS	45.9 \pm 5.7	176.4 \pm 12.1

^bP < 0.01 vs LPS.

3 讨论

以往我们曾合成了2条PMB功能区模拟多肽: peptide 0: lys-phe-leu-lys-lys-thr, peptide 1: lys-phe-phe-lys-phe-phe-lys-phe-phe, 并用生物传感器 (affinity sensors)来检测多粘菌素B及其模拟肽与LPS, lipidA的结合特性, 发现peptide 0几乎没有LPS及lipidA结合活性, peptide 1与多粘菌素B均能和LPS, lipidA高亲和力结合. CD14是迄今唯一得到阐明的在机体识别内毒素和调控内毒素作用方面起关键作用的蛋白质分子, 作为LPS的受体已得到公认. LPS与LBP(LPS结合蛋白)形成复合物, 然后与单核/巨噬细胞膜CD14结合, 引起细胞内信号转导及细胞效应的产生, 触发一系列炎症反应综合征^[19-23]. TNF- α 是LPS刺激巨噬细胞产生的主要细胞因子, 他能模拟LPS的作用, 引起机体脓毒症反应. 本结果提示PBMC膜CD14表达上调, 随着CD14表达的上调, LPS与CD14的结合增加, 对PBMC的激活作用增强, 可诱导其合成释放过量的细胞因子(如TNF- α , IL-6等). LPS刺激使PBMC不断大量产生TNF- α 促使细胞因子发生连锁反应, IL-6, IL-8产生增多, 从而单独或共同发挥作用加重炎症反应.

由于发病机制的复杂性使内毒素血症的治疗一直成为困扰人们的一大难题. 尽管人们抱有很大希望, 但在内毒素血症的临床试验性治疗中并未能获得在动物模型中那样令人鼓舞的结果, 目前尚无安全有效的特异性中和LPS的制剂. 近年来LPS抑制性多肽的研究较多, 如BPI功能区模拟肽、PMB功能区模拟肽. 有研究者提出模拟PMB功能区结构合成的模拟肽, 可能在降低其毒性的情况下, 保留了PMB特异性中和LPS的特性. 用与PMB或peptide 1预孵育后的FITC-LPS刺激PBMC, 结果发现细胞膜平均通道荧光强度减少, 表明PMB和peptide 1可以抑制LPS与细胞膜受体结合. 而peptide 0的抑制作用与对照组比较无显著性差异. PMB和peptide 1预处理, 可以明显下调PBMC膜表面CD14表达, 减少细胞因子TNF- α 和IL-6水平, 而peptide 0的抑制作用并不显著. 结果提示PMB模拟肽peptide 0并无体外抗内毒素作用; 而peptide 1可能通过下调CD14表达, 降低细胞因子水平来减少LPS诱导的炎症反应.

4 参考文献

- Manigold T, Bocker U, Hanck C, Gundt J, Traber P, Antoni C, Rossol S. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:275-282
- Priego T, Ibanez de Caceres I, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Endotoxin decreases serum IGFBP-3 and liver IGFBP-3 mRNA: comparison between Lewis and Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol* 2003;199:23-28
- Jia DX, Xu L, Su F. Clinical study on effect of qihuang oral liquid to enteric flora disturbance and serum endotoxin level in patients of liver cirrhosis. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2001;21:495-497
- Kono H, Fujii H, Asakawa M, Yamamoto M, Matsuda M, Maki A, Matsumoto Y. Protective effects of medium-chain triglycerides on the liver and gut in rats administered endotoxin.

- Ann Surg* 2003;237:246-255
- Kurachi K, Suzuki S, Sakaguchi T, Yokoi Y, Konno H, Baba S, Nakamura S. Kupffer cells modulate splenic interleukin-10 production in endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *J Hepatol* 2003;38:193-199
- Li GQ. Endotoxin and cytokines change in alcoholic liver disease. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:474-475
- Kellogg TA, Lazaron V, Wasiluk KR, Dunn DL. Binding specificity of polymyxin B, BPI, LALF, and anti-deep core/lipid A monoclonal antibody to lipopolysaccharide partial structures. *Shock* 2001;15:124-129
- Nys M, Damas J, Damas P, Laub R, Cloes JM, Lamy M. Study of the protective effects of hyperimmune immunoglobulins G and M against endotoxin in mice and rats. *Med Microbiol Immunol* 1999;188:55-64
- Weiss CA 3rd, Wasiluk KR, Kellogg TA, Dunn DL. Bactericidal and endotoxin neutralizing activity of a peptide derived from Limulus antilipopolysaccharide factor. *Surgery* 2000; 128:339-344
- Vallespi MG, Glaria LA, Reyes O, Garay HE, Ferrero J, Arana MJ. A limulus antilipopolysaccharide factor-derived peptide exhibits a new immunological activity with potential applicability in infectious diseases. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7: 669-675
- Dankesreiter S, Hoess A, Schneider-Mergener J, Wagner H, Miethke T. Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF-alpha production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J Immunol* 2000;164:4804-4811
- Iwagaki A, Porro M, Pollack M. Influence of synthetic antiendotoxin peptides on lipopolysaccharide(LPS) recognition and LPS-induced proinflammatory cytokine responses by cells expressing membrane-bound CD14. *Infect Immun* 2000;68:1655-1663
- Samandari T, Kotloff KL, Losonsky GA, Picking WD, Sansonetti PJ, Levine MM, Sztein MB. Production of IFN-gamma and IL-10 to Shigella invasins by mononuclear cells from volunteers orally inoculated with a Shiga toxin-deleted Shigella dysenteriae type 1 strain. *J Immunol* 2000;164:2221-2232
- Hellman J, Warren HS. Antiendotoxin strategies. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:371-386
- Andersson M, Girard R, Cazenave P. Interaction of NK lysin, a peptide produced by cytolytic lymphocytes, with endotoxin. *Infect Immun* 1999;67:201-205
- Brandenburg K, Jurgens G, Muller M, Fukuoka S, Koch MH. Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin. *Biol Chem* 2001;382:1215-1225
- Iwagaki A, Porro M, Pollack M. Influence of synthetic antiendotoxin peptides on lipopolysaccharide(LPS) recognition and LPS-induced proinflammatory cytokine responses by cells expressing membrane-bound CD14. *Infect Immun* 2000;68:1655-1663
- Saito S, Matsuura M, Tominaga K, Fukuoka S, Koch M. Important role of membrane-associated CD14 in the induction of IFN-beta and subsequent nitric oxide production by murine macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 2000;267:37-45
- Uehara A, Sugawara S, Watanabe K, Echigo S, Sato M, Yamaguchi T, Takada H. Constitutive expression of a bacterial pattern recognition receptor, CD14, in human salivary glands and secretion as a soluble form in saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:286-292
- Schilling JD, Martin SM, Hunstad DA, Patel KP, Mulvey MA, Justice SS, Lorenz RG, Hultgren SJ. CD14- and toll-like receptor-dependent activation of bladder epithelial cells by lipopolysaccharide and type 1 piliated escherichia coli. *Infect Immun* 2003;71:1470-1480
- Vega VL, De Maio A. Geldanamycin treatment ameliorates the response to LPS in murine macrophages by decreasing CD14 surface expression. *Mol Biol Cell* 2003;14:764-773
- Kono H, Fujii H, Asakawa M, Yamamoto M, Matsuda M, Maki A, Matsumoto Y. Protective effects of medium-chain triglycerides on the liver and gut in rats administered endotoxin. *Ann Surg* 2003;237:246-255
- Chiang CY, Fu E, Shen EC, Chiu HC. Effects of CD14 receptors on tissue reactions induced by local injection of two gram-negative bacterial lipopolysaccharides. *J Periodontol Res* 2003;38:36-43

肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用

高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来

高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来, 武汉大学人民医院消化内科
湖北省武汉市 430060
高振军, 男, 1969-08-20 生, 山东省临沂市人, 汉族, 武汉大学人民医院消化内科硕士研究生.
武汉大学科技基金 No.301270058
湖北省回国留学人员科技资助项目基金资助课题
项目负责人: 操寄望, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科.
luotang@public.wh.hb.cn
电话: 027-88041919-2134
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-26

Effect of mast cell in pathogenesis of gastric eosinophilic granuloma

Zhen-Jun Gao, He-Sheng Luo, Ji-Wang Cao, Bao-Ping Yu, Liu-Lai Song

Zhen-Jun Gao, He-Sheng Luo, Ji-Wang Cao, Bao-Ping Yu, Liu-Lai Song,
Division of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University,
Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Ji-Wang Cao, Division of Gastroenterology,
People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province,
China. luotang@public.wh.hb.cn
Received: 2002-11-29 Accepted: 2002-12-26

Abstract

AIM: To investigate the function of mast cells in the pathogenesis of gastric eosinophilic granuloma.

METHODS: Paraffin embedded tissue sections from 23 gastric eosinophilic granuloma patients and 15 gastric ulcer patients were stained with anti-human mast cell tryptase to count the mast cells and degranulated mast cells. Anti-human CD34 antibody was used to detect the microvessel density with immunohistochemical technique. Mast cell degranulation was also studied by electron microscope.

RESULTS: The quantity of mast cells in gastric eosinophilic granuloma was similar to that in gastric ulcer (9.1 ± 3.0 vs 8.9 ± 3.0 , $P > 0.05$). The quantity and ratio of degranulated mast cells were significantly greater in gastric eosinophilic granuloma patients than in gastric ulcer control subjects (7.3 ± 2.4 vs 4.3 ± 1.4 , $80.3 \pm 15.7\%$ vs $48.4 \pm 15.7\%$, $P < 0.01$). Microvessel density was higher in the patients of high mast cell count than in patients of low mast cell count (57.3 ± 10.7 vs 32.4 ± 7.2 , $P < 0.01$). There was a positive relevance between the amount of mast cells and eosinophils ($r = 0.931$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Mast cells are important cells in the pathogenesis of gastric eosinophilic granuloma.

Gao ZJ, Luo HS, Cao JW, Yu BP, Song LL. Effect of mast cell in pathogenesis of gastric eosinophilic granuloma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1203-1206

摘要

目的: 探讨肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用。

方法: 应用免疫组化SP染色检测胃嗜酸性肉芽肿中的肥大细胞及微血管密度; HE染色计数嗜酸细胞; 电镜观察肥大细胞脱颗粒情况。

结果: 肥大细胞数量在胃溃疡和胃嗜酸性肉芽肿中差别无显著性(9.1 ± 3.0 vs 8.9 ± 3.0 , $P > 0.05$); 脱颗粒肥大细胞数量及比例在胃嗜酸性肉芽肿组明显高于胃溃疡组(7.3 ± 2.4 vs 4.3 ± 1.4 , $80.3 \pm 15.7\%$ vs $48.4 \pm 15.7\%$, $P < 0.01$); 肥大细胞高计数组微血管密度高于肥大细胞低计数组(57.3 ± 10.7 vs 32.4 ± 7.2 , $P < 0.01$); 脱颗粒肥大细胞与嗜酸细胞具有正相关性($r = 0.931$, $P < 0.01$)。

结论: 肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿中可促进嗜酸细胞浸润及血管新生, 可能在胃嗜酸性肉芽肿发病中起重要的作用。

高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来. 肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1203-1206

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1203.asp>

0 引言

胃嗜酸性肉芽肿(gastric eosinophilic granuloma, GEG)是一种以胃黏膜下层及肌层大量嗜酸细胞浸润为特征的良性病变。由 Kaizen 于 1937 年首次报道, 临床少见, 但近年来报道逐渐增多。临床易误诊为胃癌或胃溃疡(gastric ulcer, GU), 其病因及发病机制目前尚不清楚。肥大细胞(mast cell, MC)是变态反应和炎性反应中的关键效应细胞, 也是重要的调节细胞^[1-4]。嗜酸细胞是 GEG 的特征性细胞, 大量的小血管增生是胃嗜酸性肉芽肿的重要特点^[5]。通过 MC 与嗜酸细胞及微血管密度(microvessel density, MVD)的关系探讨 MC 在 GEG 发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 选取武汉大学人民医院 1997-2001 年手术及术后病理确诊的 GEG 之蜡块标本共 23 例, 男 20 例, 女 3 例, 年龄 19-64 岁(平均 39.2 岁)。电镜标本为 2001-09 我院门诊电子胃镜深挖活检 GEG 组织(为半月前病理确诊此次复查病例), 随机取同期 GU 手术切除标本 15 例作为对照组。鼠抗人肥大细胞类胰酶抗体(AA1)标记 MC, 鼠抗人 CD34 抗体标记血管内皮细胞, 免疫组化 SP 检测试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 方法 每例标本连续切取 4 μm 厚组织切片 3 片, 一片作 HE 染色, 其余两片做免疫组化染色. 免疫组化 SP 染色 MC 类胰酶染色经 10 g/L 胰蛋白酶消化, 抗 CD34 染色经微波抗原修复, 阴性对照采用 PBS 缓冲液做一抗, 其余步骤严格按 SP 染色试剂盒说明书进行. 所有细胞计数均由两名病理科医生在双盲下完成. 抗 MC 类胰酶染色为胞质着色, 阳性者胞质为棕黄色或棕褐色, 细胞呈圆形或类圆形、胞膜完整者视为未脱颗粒 MC, 细胞形态不规则, 胞膜不完整或周围组织有棕黄色颗粒者视为脱颗粒 MC. 在 MC 集中区域随机取 5 个高倍镜视野计数, 平均值为该标本的 MC 数($/\times 400$). 抗 CD34 抗体阳性为胞质或胞膜染成棕黄色或棕褐色. GEG 的 MVD 检测标准参照肿瘤 MVD 的标准^[6], 抗 CD34 抗体免疫组化染色阳性的与比邻微血管、细胞及其他结缔组织不相连的任何内皮细胞均作为一条独立的微血管, 每一标本在低倍镜($\times 100$)下选 3 个微血管最多的区域, 在每一个区域中计数一个高倍视野($\times 400$)下的微血管数, 取 3 个视野的均值即为 MVD, 有平滑肌包绕的大血管除外. 电镜标本送武汉大学医学院电镜

室, 在胃镜下于病变处深挖活检取材, 迅速浸入 25 g/L 戊二醛固定, 再经锇酸后固定, 梯度酒精脱水, 丙酮脱水, 环氧树脂包埋, LKB-V 型超薄切片机切片, 醋酸双氧铀、枸橼酸铅染色, 干燥后在日立 -600 型透射电镜下观察. 石蜡切片脱蜡至水, 冲洗后, 苏木精室温染色 5 min, 自来水洗, 10 ml/L 盐酸酒精分色, 冲洗后, 伊红室温下染色 5 min, 水洗、脱水、透明, 中性树脂封片, 光镜下观察, 嗜酸细胞呈圆形, 胞质红色, 胞核蓝色, 一般为双核. 在黏膜下层嗜酸细胞集中区域选取 5 个视野, 高倍镜($\times 400$)下计数, 取平均值即为该标本的嗜酸细胞数($/\times 400$).

统计学处理 数据用均数 \pm 标准差表示. 样本之间比较采取 t 检验或 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差别有显著性, 相关性分析采用 Spearman 相关.

2 结果

2.1 GEG 和 GU 中 MC 比较 GEG 组织中 MC 多位于黏膜下层、肌层和小血管周围, MC 计数($/\times 400$)为 9.1 ± 3.0 , 脱颗粒 MC 数($/\times 400$)为 7.3 ± 2.4 , 脱颗粒比为 $80.3 \pm 15.7\%$;

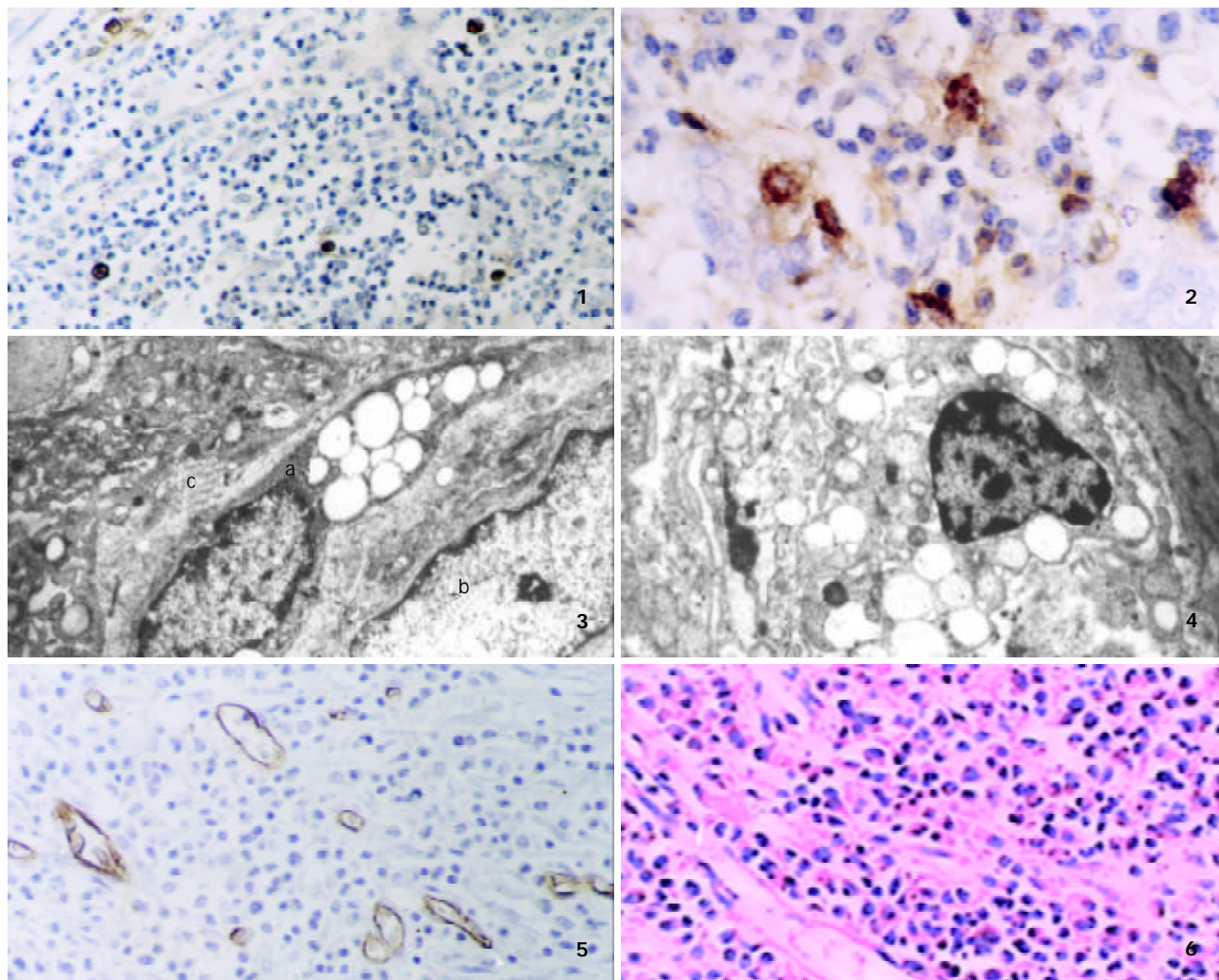


图 1 GEG 中肥大细胞 SP $\times 100$. 图 2 GEG 中肥大细胞 SP $\times 400$.
图 3 肥大细胞超微结构(电镜 $\times 7000$). a 肥大细胞 b 浆细胞 c 脱出的肥大细胞致密颗粒.
图 4 正脱颗粒的肥大细胞 电镜 $\times 8000$.
图 5 GEG 中微血管染色 SP $\times 100$. 图 6 GEG 病理组织学特点 HE $\times 100$.

GU 组织中 MC 多位于黏膜固有层及黏膜下层, MC 计数($/\times 400$)为 8.9 ± 3.0 , 脱颗粒 MC 数($/\times 400$)为 4.3 ± 1.4 , 脱颗粒比为 $48.4 \pm 15.7\%$. 二者之间比较: MC 计数之间差别无显著性($P > 0.05$), 脱颗粒 MC 计数二者之间比较差别有显著性($P < 0.01$), 脱颗粒细胞比例之间比较差别有显著性($P < 0.05$), (图 1, 2).

2.2 MC 超微结构 电镜标本中, 观察到 6 个 MC, MC 常与浆细胞相邻, 多有脱颗粒现象, 细胞周围可见到 MC 致密电子密度颗粒, 胞内颗粒电子密度变低, 膨胀变大, 呈空泡状 (图 3, 4).

2.3 MC 与 MVD 的关系 按 MC 计数的均数为标准把 GEG 组分为高计数组($MC \geq 9.07$)13 例和低计数组($MC < 9.07$)10 例, MC 高计数组 MVD($/\times 400$)为 57.3 ± 10.7 , MC 低计数组 MVD 为 32.4 ± 7.2 . 两组之间比较差别有显著性($P < 0.01$, 图 5).

2.4 MC 与嗜酸细胞的相关性 从连续切片的 HE 染色及 MC 胰酶染色的切片上发现 MC 集中区域也是嗜酸细胞的集中区域 (图 6). 二者的 Spearman 相关系数 $r = 0.931$, $P < 0.01$, 提示二者之间有明显正相关性 (图 7).

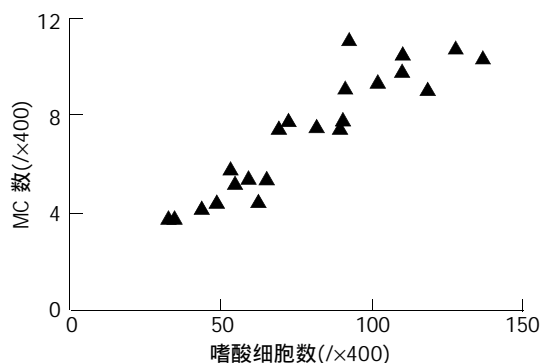


图 7 MC 与嗜酸细胞的相关性.

3 讨论

GEG 发病以男性青壮年为主, 在病理组织学上一般有溃疡形成, 黏膜下和肌层有大量嗜酸细胞、淋巴细胞浸润, 肉芽组织中有纤维组织围绕血管增生, 可见纤维瘢痕和玻璃样变, 小动脉、小静脉和淋巴管大量增生, 肌层被嗜酸细胞分割挤压, 甚至浆膜层亦有大量嗜酸细胞浸润. GEG 的病因有过敏反应学说, 炎症学说, 异物反应学说和家族遗传学说等推测, 但目前多数学者认为是胃组织对局部炎性刺激物产生的一种特殊反应和过敏反应^[5]. MC 由造血干细胞衍化而来, 是变态反应和炎性反应中的关键效应细胞, 也是重要的调节细胞. 其表面表达有与 IgE 抗体 Fc 段高度亲和力的受体 (Fc ϵ RI), 当 MC 受抗原结合的 IgE 抗体刺激会出现脱颗粒效应, 释放嗜酸性粒细胞趋化因子 (ECAF)、组胺、肝素、蛋白酶等, MC 脱颗粒后会分泌前列腺素 D₂, 白三烯 C₄, D₄, E₄, 血小板活化因子 (PAF), IL-4, 5, 6, 8 等^[7]. MC 不仅可通过释放炎性递质和血管活性递质引起机体重要的病理生理变化, 还可通过 TNF- α 及其

他一些细胞因子趋化其他炎症细胞^[8-10], 从而引起炎症的级联放大和持续过程.

正常人群胃壁中有 MC 存在, GU 与慢性活动性胃炎 MC 数量明显增多^[7, 11, 12]. MC 参与炎症的早期反应, 其在胃壁中的数量由趋化物质决定, 包括干细胞因子、IL-3、转化生长因子 β 1 等, 在炎症启动机制基础上由成纤维细胞、内皮细胞、淋巴细胞或巨噬细胞释放^[13, 14]. 我们发现, MC 数量在 GEG 和 GU 中差别无显著性, 可能 MC 的增多在 GEG 中与在 GU 中具有相似的炎症启动机制. 能引起 MC 脱颗粒的物质主要有 IgE、补体片断、细胞因子等^[9, 15]. GEG 中脱颗粒 MC 数量及比例均明显增多, 意味着在 MC 增多的基础上又有其他能使 MC 脱颗粒的因素介入. 在电镜检查中可观察到肥大细胞脱颗粒现象, 因 GEG 电镜标本搜集困难, 未与 GU 作对比研究, 但可证实 GEG 中 MC 确有脱颗粒现象. Nakajima et al^[7]已用电镜证实无症状志愿人员中极少有脱颗粒现象. 由此推测, MC 数量及脱颗粒增加, 可能与 GEG 的特殊病理表现有关.

新生血管在肿瘤、炎症的病情进展中起重要作用^[6, 16-29], GEG 在病理组织学上有大量的小血管存在, MVD 是新生血管的标志^[6, 27-30]. 在本研究中发现, MC 与 MVD 聚集区域一致, MC 高计数组 MVD 明显增加, 提示, MC 与 GEG 中的血管形成有关, 在一些实验中已证实 MC 与血管新生有关^[6, 17, 18]. MC 可引起 VEGF, bFGF, TGF- β , TNF- α 和 IL-8 等促血管生成因子的产生^[17, 18, 31], MC 颗粒中的组胺、肝素等具有促血管生成的作用, 能够趋化和激活单核巨噬细胞、淋巴细胞, 激活血小板进一步促进血管生成因子的释放. 血管新生与大量的炎性细胞浸润有关, 在 GEG 中也有可能嗜酸细胞的浸润有关, 尚待进一步证实.

嗜酸细胞是 GEG 的特征性细胞, 他是特异反应的标志, 也是重要的效应细胞. 嗜酸细胞可产生独特的损害性的炎性递质^[32], 嗜酸细胞在病变中的浸润由趋化物质决定, 主要由 MC 和淋巴细胞释放. 在胃部炎性病变中, MC 密度与单核和多核炎性细胞浸润的数量密切相关^[7]. MC 参与炎症的急性过程, 并且参与慢性炎症的持续过程, MC 浸润出现在嗜酸细胞之前^[33], 我们发现, 脱颗粒 MC 数量与病变中嗜酸细胞数量有明显的正相关性, 提示在 GEG 中 MC 与嗜酸细胞的浸润有关, 其机制可能是: (1) MC 脱颗粒时会释放 ECA-F, 白三烯, IL-5 等, 这些因子对嗜酸性粒细胞均有趋化作用^[7]; (2) MC 产生的 TNF- α 能够促进淋巴细胞的浸润^[6], 而 Th2 淋巴细胞会产生 IL-4, IL-5 等细胞因子^[34], 他们都是重要的嗜酸细胞趋化因子. MC 还可活化嗜酸细胞, 促进其活性递质的释放.

MC 可释放重要的炎性递质, 还可影响血管内皮细胞和其他炎性细胞, 通过一系列复杂机制使炎症持续, 肉芽肿形成, 血管生成和组织纤维化^[35]. MC, 嗜酸细

胞和淋巴细胞都是重要的过敏性和炎症疾病的效应细胞^[32], 病变中大量 MC、嗜酸细胞和淋巴细胞的存在提示 GEG 发病可能与过敏性和炎症因素有关, 而 MC 可能通过促进嗜酸细胞浸润及血管新生而在 GEG 发病中起重要作用, 并可能是其发病的关键效应细胞。

4 参考文献

- 迟晶, 傅宝玉, 九岛亮治, 中岛滋美, 服部隆则. 沙土鼠幽门螺杆菌感染胃炎、胃溃疡动物模型的建立及除菌治疗前后炎症和细胞增生的变化. *世界华人消化杂志* 1999;7:557-560
- 林谷珍, 王小众, 王平, 林峻, 杨发端. 脾虚泄泻患者健脾益肾汤治疗的疗效与免疫学研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:285-287
- Robbie-Ryan M, Brown M. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2002;14:728-733
- Kobayashi T, Ohta Y, Inui K, Yoshino J, Nakazawa S. Protective effect of omeprazole against acute gastric mucosal lesions induced by compound 48/80, a mast cell degranulator, in rats. *Pharmacol Res* 2002;46:75-84
- Yoh H, Natsugoe S, Ohsako T, Yamada K, Suenaga T, Hokita S, Ohi H, Nishimata Y, Nishimata H, Aikou T. Eosinophilic granuloma of the stomach mimicking gastric cancer, report of a case. *Hepatogastroenterology* 2001;48:606-608
- Viacava P, Gasperi M, Acerbi G, Manetti L, Cecconi E, Bonadio AG, Naccarato AG, Acerbi F, Parenti G, Lupi I, Genovesi M, Martino E. Microvascular density and vascular endothelial growth factor expression in normal pituitary tissue and pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest* 2003;26:23-28
- Krishnaswamy G, Martin R, Walker E, Li C, Hossler F, Hall K, Chi DS. Moraxella catarrhalis induces mast cell activation and nuclear factor kappaB-dependent cytokine synthesis. *Front Biosci* 2003;8:A40-47
- Latti S, Leskinen M, Shiota N, Wang Y, Kovanen PT, Lindstedt KA. Mast cell-mediated apoptosis of endothelial cells in vitro: A paracrine mechanism involving TNF-alpha-mediated down-regulation of bcl-2 expression. *J Cell Physiol* 2003;195:130-138
- Maciorkowska E, Dzieciol J, Kemona A, Kaczmarek M. Evaluation of selected cytokines and mononuclear cell infiltration in gastric mucosa of children with food allergy. *Med Sci Monit* 2000;6:567-572
- Wan MX, Wang Y, Liu Q, Schramm R, Thorlacius H. CC chemokines induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and recruitment in vivo: intermediary role of mast cells. *Br J Pharmacol* 2003;138:698-706
- Sulik A, Kemona A, Sulik M, Oldak E. Mast cells in chronic gastritis of children. *Pol Merkuriusz Lek* 2001;10:156-160
- Biernacka D, Muszynski J, Tomaszewska A, Moskalewski S. Relationship between mast cells/parietal cells and maximal/basal acid output ratio in chronic gastritis. *Res Exp Med (Berl)* 2000;200:35-41
- Olsson N, Piek E, Sundstrom M, ten Dijke P, Nilsson G. Transforming growth factor-beta-mediated mast cell migration depends on mitogen-activated protein kinase activity. *Cell Signal* 2001;13:483-490
- Bamba N, Nakajima S, Andoh A, Bamba M, Sugihara H, Bamba T, Hattori T. Stem cell factor expressed in human gastric mucosa in relation to mast cell increase in *Helicobacter pylori*-infected gastritis. *Dig Dis Sci* 2002;47:274-282
- Yamamoto J, Watanabe S, Hirose M, Osada T, Ra C, Sato N. Role of mast cells as a trigger of inflammation in *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:17-23
- Cianchi F, Palomba A, Messerini L, Boddi V, Asirelli G, Perigli G, Bechi P, Taddei A, Pucciani F, Cortesini C. Tumor angiogenesis in lymph node-negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Ann Surg Oncol* 2002;9:20-26
- Fukushima N, Satoh T, Sano M, Tokunaga O. Angiogenesis and mast cells in non-Hodgkin's lymphoma: a strong correlation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001;42:709-720
- Ranieri G, Labriola A, Achille G, Florio G, Zito AF, Grammatica L, Paradiso A. Microvessel density, mast cell density and thymidine phosphorylase expression in oral squamous carcinoma. *Int J Oncol* 2002;21:1317-1323
- 张燕敏, 邓长生, 朱尤庆, 毛永荣, 张可, 杨院平. 胃癌中缺氧诱导因子-1 α mRNA 表达和血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:633-637
- 彭林, 区金锐, 王卫东, 孙建, 简志祥. 原位种植肝癌新生血管的检测及血管内皮细胞生长因子 mRNA 的表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:717-718
- 高国林, 杨原, 杨思凤, 何净. MNNG 诱发大鼠胃癌与间质血管的反应. *华人消化杂志* 1998;6:109-111
- 李江, 王文亮, 刘斌. 人类肝细胞肝癌的细胞凋亡和癌组织内血管形成的调控. *华人消化杂志* 1998;6:1057-1060
- 贾玲, 陈天星, 孙建伟, 纳智明, 张会华. 大肠癌微血管密度及增生细胞核抗原与临床预后的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8:74-76
- 曹玮, 王执民, 梁志会, 张洪新, 王义清, 关彦, 李文献, 潘伯荣. 血管生成抑制剂 TNP-70 与碘化油混合栓塞肝癌的实验研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:629-632
- 刘灏, 吴金生, 李立宏, 要秀. 大肠癌的血管生成与血小板源生长因子的表达研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:661-664
- 王喜安, 王洛伟, 金冠球, 王晓熙, 谢宇野, 肖正达, 徐根兴. 血管内皮抑素转基因双歧杆菌抑瘤作用的实验研究. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊 8):29
- 陶厚权, 邹寿椿. Rg3 抑制人胃癌血管生成的临床研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1218-1219
- 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
- Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003;39:184-191
- Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, Decarli N, Tresoldi M, Raggi F, Baldessari C, Freschi M, Baldini L, Goldaniga M, Neri A, Carboni N, Bertolini F, Viale G. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2002;118:817-820
- Artuc M, Steckelings UM, Henz BM. Mast cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *J Invest Dermatol* 2002;118:391-395
- Park HS, Kim SS, Kim HA, Suh YJ, Lee SK, Nahm DH, Lee YM. Eosinophil inflammation of nasal polyp tissue: relationships with matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and transforming growth factor-beta1. *J Korean Med Sci* 2003;18:97-102
- Temkin V, Kantor B, Weg V, Hartman ML, Levi-Schaffer F. Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *J Immunol* 2002;169:2662-2669
- Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001;15:985-995
- von Stebut E, Metz M, Milon G, Knop J, Maurer M. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha /beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. *Blood* 2003;101:210-215

鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐 风

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐风, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 山东省济南市 250031
江学良, 男, 1967-08-26 生, 山东省安丘市人, 汉族, 医学博士, 科技部科技期刊评审专家, 中英国际炎症性肠病研究中心及济南军区总医院消化内镜中心负责人. 世界华人消化大会共同秘书长, 《Inflammatory Bowel Disease》, 《世界华人消化杂志》, 《中华腹部疾病杂志》等 8 家杂志常务编委和编委. 编著《溃疡性结肠炎的现代诊疗与进展》等专著 2 部. 在《World Journal of Gastroenterology》等杂志发表论文 50 篇, 5 篇被美国 SCI 收录. 主要研究方向为溃疡性结肠炎, 获军队及省部级科技成果奖 6 项. 应邀在世界消化学大会、世界华人消化大会等作《中国溃疡性结肠炎研究》的大会报告.
山东省卫生厅青年基金项目, No.2001CA2EFB2
项目负责人: 江学良, 250031, 山东省济南市师范路 25 号, 中国人民解放军济南军区总医院消化科. chfjxl@jn-public.sd.cninfo.net
电话: 0531-8381896
收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

Clinical efficacy of heartleaf houttuynia on ulcerative colitis

Xue-Liang Jiang, Qi-Zhen Quan, Zi-Qin Sun, Yao-Jun Wang, Rui-Lian Shang, Feng Qi

Xue-Liang Jiang, Qi-Zhen Quan, Zi-Qin Sun, Yao-Jun Wang, Rui-Lian Shang, Feng Qi, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital of Jinan Command Area, Jinan 250031, Shandong Province, China
Supported by Youth Research Foundation of the Bureau of Health of Shandong Province, No. 2001CA2EFB2
Correspondence to: Dr. Xue-Liang Jiang, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital of Jinan Command Area, 25 Shifanlu, Jinan 250031, Shandong Province, China. chfjxl@jn-public.sd.cninfo.net
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

Abstract

AIM: To study the clinical effects of Heartleaf houttuynia injection on patients with ulcerative colitis (UC).

METHODS: Forty-two first episode UC patients were randomly divided into two groups: Heartleaf houttuynia treatment group ($n=21$) and SASP group ($n=21$). Clinical effects were observed in the two groups while ultrastructure of colonic mucosa, ICAM-1 and the pressure of distant colon were studied in Heartleaf houttuynia treatment group.

RESULTS: The clinical efficacy of Heartleaf houttuynia group (complete remission in 20 cases, 95.2%; improvement in one patient, 4.8 %) was better than that in SASP group (complete remission in 15 cases, 72.4 %, improvement in 5 patients, 23.8 %; ineffective in one patient, 3.8 %, $P<0.01$). The days of stool frequency recovering to normal (5.6 ± 3.3 d), bloody stool disappearance (6.7 ± 3.8 d) and abdominal pain disappearance (6.1 ± 3.5 d) in Heartleaf houttuynia group were all shorter than those in SASP group (9.5 ± 4.9 d, 11.7 ± 6.1 d, 10.6 ± 5.3 d, $P<0.01$). Heartleaf houttuynia herb could inhibit the epithelial cells apoptosis of colonic mucous membrane and the expression of ICAM-1 (45.8 ± 5.7 vs 30.7 ± 4.1 %, $P<0.05$). Compared with the normal subject, the mean promotional speed of contraction wave accelerated (4.6 ± 1.6 vs 3.2 ± 1.8 cm/min, $P<0.05$) and the mean amplitude of

wave decreased (14.2 ± 9.3 vs 18.4 ± 8.0 kPa, $P<0.05$) in active UC patients, after treatment with Heartleaf houttuynia herb, these two indexes improved significantly (17.3 ± 8.3 kPa, 3.7 ± 1.7 cm/min, $P<0.05$). In normal person, the post-meal pressure of sigmoid (2.9 ± 0.9 kPa) > descending colon (2.0 ± 0.7 kPa) > splenic flexure (1.7 ± 0.6 kPa), while the colonic pressure (1.5 ± 0.5 kPa, 1.4 ± 0.6 kPa, 1.3 ± 0.6 kPa) decreased significantly ($P<0.05$) in active UC patients. After treatment with Heartleaf houttuynia herb, the colonic pressure (2.6 ± 0.8 kPa, 1.8 ± 0.6 kPa, 1.6 ± 0.5 kPa) recovered to normal. The pain threshold of distant colon (67.3 ± 18.9 mL) in active UC decreased significantly compared with that of normal person (216.2 ± 40.8 mL, $P<0.05$) and recovered to normal after treatment with Heartleaf houttuynia herb (187.4 ± 27.2 mL, $P<0.05$).

CONCLUSION: The clinical efficacy of heartleaf houttuynia herb injection on ulcerative colitis is superior to that of SASP with fewer side effects.

Jiang XL, Quan QZ, Sun ZQ, Wang YJ, Shang RL, Qi F. Clinical efficacy of heartleaf houttuynia on ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1207-1210

摘要

目的: 研究鱼腥草蒸馏液灌肠治疗初发型溃疡性结肠炎(UC)患者的疗效及对远端结肠动力的影响。

方法: 应用鱼腥草蒸馏液灌肠治疗 21 例活动期 UC 患者, 并与柳氮磺吡啶治疗组(21 例)作对照研究, 分别在治疗前后观察临床疗效. 鱼腥草治疗组还观察结肠黏膜超微结构及细胞间黏附分子-1 变化, 并采用 PC Polygraf HR 高分辨多道胃肠功能测定仪检测其远端结肠动力变化。

结果: 鱼腥草治疗组临床疗效(完全缓解 20 例, 95.2 %; 好转 1 例, 4.8 %)显著优于柳氮磺吡啶组(完全缓解 15 例, 72.4 %; 好转 5 例, 23.8 %; 无效 1 例, 3.8 %, $P<0.01$); 且大便次数恢复正常天数(5.6 ± 3.3 d)、血便消失天数(6.7 ± 3.8 d)及腹痛消失天数(6.1 ± 3.5 d)均明显短于柳氮磺吡啶组(9.5 ± 4.9 d, 11.7 ± 6.1 d, 10.6 ± 5.3 d, $P<0.01$). 鱼腥草还可使结肠黏膜上皮细胞线粒体肿胀减轻, 微绒毛和杯状细胞恢复正常, 细胞凋亡减少, 细胞间黏附分子-1 表达下调(鱼腥草治疗前, 结肠黏膜组织中 ICAM-1 阳性表达率为 45.8 ± 5.7 %, 鱼腥草治疗后为 30.7 ± 4.1 %, $P<0.05$). 活动期 UC 患者推进性收缩波数目较正常人增多, 平均推进速度(4.6 ± 1.6 vs 3.2 ± 1.8 cm/min, $P<0.05$)加快, 平均波幅降低(14.2 ± 9.3 vs 18.4 ± 8.0 kPa, $P<0.05$), 应用鱼腥草治疗后上述指标明显改善(17.3 ± 8.3 kPa, 3.7 ± 1.7 cm/min, $P<0.05$). 正常人结肠餐后压力乙状结

肠(2.9 ± 0.9 kPa) > 降结肠(2.0 ± 0.7 kPa) > 结肠脾曲(1.7 ± 0.6 kPa), 活动期 UC 患者各部位压力(1.5 ± 0.5 kPa, 1.4 ± 0.6 kPa, 1.3 ± 0.6 kPa)均较正常人降低($P < 0.05$), 不同部位压力无明显区别. 鱼腥草治疗后基本恢复正常(2.6 ± 0.8 kPa, 1.8 ± 0.6 kPa, 1.6 ± 0.5 kPa). 活动期 UC 患者远端结肠对气囊扩张引起的疼痛阈值(67.3 ± 18.9 mL)较正常人(216.2 ± 40.8 mL)明显下降($P < 0.05$), 经鱼腥草治疗后, 上述指标基本恢复正常(187.4 ± 27.2 mL, $P < 0.05$).

结论: 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎患者的疗效优于柳氮磺吡啶, 具有起效快、疗效好、无毒副作用等优点, 并可改善远端结肠动力, 抑制炎症反应.

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤. 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1207-1210
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1207.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)较常见, 近年来我国报道的病例数显著增加^[1]. 但由于该病病因不清, 治疗缺乏特异性^[2-4]. 我国初发型病例占34.8%, 并且病变主要位于直肠和乙状结肠^[1]. 柳氮磺吡啶目前仍是该型治疗的主要药物, 但其疗程长, 副作用多, 停药后易复发, 疗效并不理想. 因此, 结合我国 UC 发病特点, 寻找更为理想有效、副作用少的药物成为 UC 研究的重点^[3]. 我们以前的实验发现鱼腥草蒸馏液灌肠可改善 UC 大鼠结肠动力紊乱、减轻炎症, 使腹泻、黏液脓血便症状消失^[5,6], 现应用鱼腥草蒸馏液灌肠治疗初发型 UC, 报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 初发型 UC 患者 42 例, 均符合 1993 年太原全国慢性非感染性肠道疾病学术研讨会制订的标准^[7], 其中男 16 例, 女 26 例, 平均年龄 31.4 岁, 病程 1-12 mo, 均有不同程度的腹泻、腹痛、脓血便、里急后重等症状. 肠镜检查病变累及乙状结肠以上 2 例, 乙状结肠以下 40 例. 病理为糜烂溃疡、隐窝脓肿、非特异性炎症及不典型增生等改变. UC 患者随机分为鱼腥草蒸馏液(2 kg/L, pH 4.0-6.0, 南方制药厂生产, 川卫药准字 1981 第 001546 号)灌肠治疗组(鱼腥草 20 mL 加生理盐水 100 mL 每晚睡前排便后灌肠 1 次, 1 mo 为 1 疗程, 用 1-2 个疗程) 21 例, 柳氮磺吡啶口服对照组(1 g, 4 次/d, 1 mo 为 1 疗程, 用 1-2 个疗程) 21 例.

1.2 方法 临床症状变化包括大便次数、黏液脓血便、腹痛和全身症状. 疗效^[7]: 完全缓解: 症状消失, 肠镜检查肠黏膜恢复正常; 好转: 症状减轻, 肠镜检查肠黏膜病变较前明显改善, 大便常规检查有少量红、白细胞; 无效: 治疗前后, 临床症状和肠镜等检查无改善或无明显改善. 用电镜观察结肠黏膜上皮细胞线粒体、微绒毛和细胞凋亡^[8]. 按我们自己实验方法用流式细胞仪(becton

dickenson FACScan)检测肠黏膜组织中细胞间黏附分子-1(ICAM-1, CD54, 法国 Immunotech 产品)含量^[9]. 结肠动力检查采用瑞典 CTD-SYNECTICS 公司生产的 PC Polygraf HR 高分辨多道胃肠功能测定仪, 测压导管(8 通道)各通道之间相隔 5 cm, 外径 8 mm, 侧孔直径 1 mm, 沿 360° 开口. 检查前停服所有影响胃肠动力药物至少 3 d, 检查前 1 天下午清洁肠道, 检查当天禁食, 在结肠镜引导下将测压导管送至降结肠脾曲, 记录每位受试者餐前 1 h 和餐后 2 h 结肠动力, 检测结果利用计算机 Polygram and Windows Polygram 进行分析, 将收缩幅度 > 6.67 kPa, 传播距离 2 个侧孔以上(>10 cm)的收缩定义为推进性收缩, 除去 1.33 kPa 以下节段性收缩以去除呼吸的影响, 计算机自动设定基线, 分别计算餐前和餐后每 30 min 内收缩波平均振幅, 在研究中采用自制橡胶气囊, 用手持注射器充气, 20 mL/次, 间隔 30 s, 最大充气 120 mL, 记录受试者对气囊扩张的感觉(感觉阈值、排便阈值、疼痛阈值).

统计学处理 采用 t 检验和 Ridit 分析.

2 结果

2.1 临床观察 鱼腥草蒸馏液灌肠可以使初发型 UC 患者腹泻复常时间(5.6 ± 3.3 vs 9.5 ± 4.9 d, $P < 0.01$)、黏液脓血便消失时间(6.7 ± 3.8 vs 11.7 ± 6.1 d, $P < 0.01$)、腹痛消失时间(6.1 ± 3.5 vs 10.6 ± 5.3 d, $P < 0.01$)等症状迅速减轻、消失并恢复正常, 显著优于柳氮磺吡啶组. 两组完全缓解、好转和无效例数(%)分别为 20 (95.2%), 1 (4.8%), 0 和 15 (72.4%), 5 (23.8%), 1 (23.8%), 经 Ridit 分析, $P < 0.01$ vs 柳氮磺吡啶组. 柳氮磺吡啶组 5 例出现胃热、烧心症状, 2 例出现皮疹, 1 例肝功轻度异常, 1 例白细胞下降; 鱼腥草治疗组未发现副作用.

2.2 超微结构 鱼腥草治疗前, UC 患者可见病变黏膜表面和隐窝的上皮细胞线粒体肿胀、变圆, 嵴变小, 微绒毛缩短, 数目减少或不规则, 杯状细胞发育不成熟, 凋亡细胞明显增多(图 1). 应用鱼腥草治疗后, 线粒体肿胀减轻, 微绒毛和杯状细胞恢复正常, 凋亡细胞显著减少(图 2).

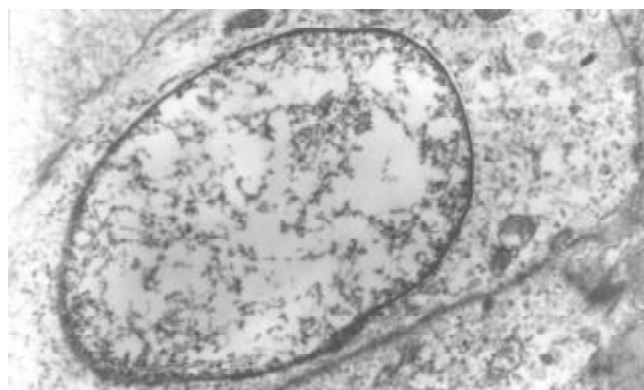


图 1 UC 患者黏膜上皮细胞凋亡, 线粒体肿胀, 嵴变小.

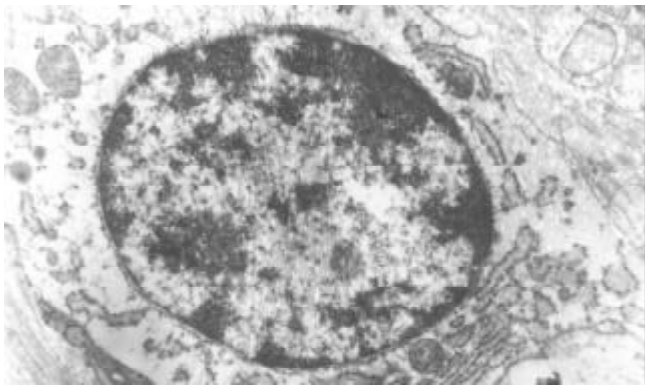


图2 UC患者应用鱼腥草治疗后, 黏膜上皮基本恢复正常, 线粒体肿胀减轻。

2.3 CD54 鱼腥草治疗前, UC 患者结肠黏膜组织中 CD54 阳性表达率为 $45.8 \pm 5.7\%$, 鱼腥草治疗后为 $30.7 \pm 4.1\%$, $P < 0.05$, 差异具有显著性(图 3, 图 4)。

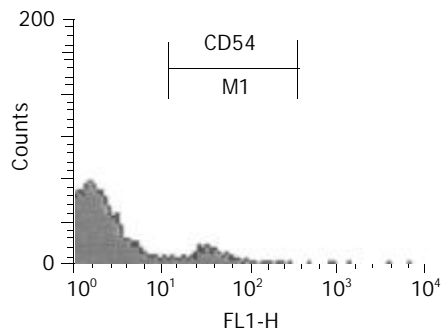


图3 UC患者结肠黏膜组织中 CD54 阳性表达率增多。

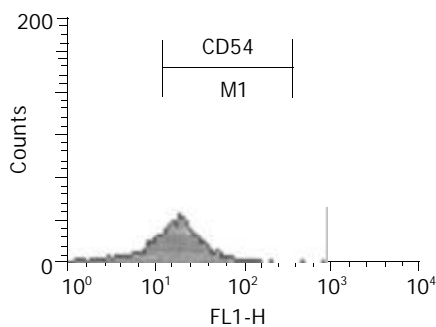


图4 鱼腥草治疗后, UC 患者组织中 CD54 阳性表达率显著下降。

2.4 结肠动力 活动期 UC 患者低幅的快速的推进性收缩波数目较正常人明显增加, 鱼腥草治疗后可基本恢复正常(表1)。正常人餐后远端结肠压力乙状结肠>降结肠>结肠脾曲, 存在压力梯度, 活动期 UC 患者各部位压力均较正常人明显降低, 不同部位压力无明显区别, 鱼腥草治疗后基本恢复正常(表2)。

表1 鱼腥草对 UC 患者结肠推进性收缩波的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	出现 (n)	波幅 (kPa)	推进速度(cm/min)
正常人	20	5	18.4 ± 8.0	3.2 ± 1.8
UC 患者				
治疗前	21	12	14.2 ± 9.3^a	4.6 ± 1.6^a
治疗后	21	6	17.3 ± 8.3^c	3.7 ± 1.7^c

^aP < 0.05, vs 正常人; ^cP < 0.05, vs 治疗前。

表2 鱼腥草对 UC 患者结肠节段性收缩波波幅的影响($\bar{x} \pm s$, kPa)

分组	n	结肠脾曲	降结肠	乙状结肠
正常人	16	1.7 ± 0.6	2.0 ± 0.7	2.9 ± 0.9
UC 患者				
治疗前	16	1.3 ± 0.6^a	1.4 ± 0.6^a	1.5 ± 0.5^b
治疗后	16	1.6 ± 0.5^c	1.8 ± 0.6^c	2.6 ± 0.8^d

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs 正常人; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01, vs 治疗前。

2.5 远端结肠对气囊扩张引起的感觉 UC 患者远端结肠感觉阈值、排便阈值、疼痛阈值较正常人明显下降($P < 0.05$), 应用鱼腥草治疗后上述指标基本恢复正常($P < 0.05$, 表3)

表3 鱼腥草对 UC 患者远端结肠气囊扩张引起的感觉变化($\bar{x} \pm s$, mL)

分组	n	感觉阈值	排便阈值	疼痛阈值
正常人	20	36.4 ± 12.6	119.0 ± 15.4	216.2 ± 40.8
UC 患者				
治疗前	16	26.7 ± 10.6^a	59.7 ± 19.4^a	67.3 ± 18.9^a
治疗后	16	33.9 ± 12.4^c	99.3 ± 21.1^c	187.4 ± 27.2^c

^aP < 0.05 vs 正常人; ^cP < 0.05 vs 治疗前。

3 讨论

柳氮磺吡啶目前仍是治疗轻度和中度 UC 的主要药物, 但由于其疗程长, 副反应多, 停药后易复发, 疗效并不理想。因为我国初发型 UC 病例占 334.8%, 并且病变主要位于直肠和乙状结肠, 采用鱼腥草灌肠治疗, 既可使药物直达病变, 又可避免上消化道酸碱度和酶对药物的影响, 保持药物性能, 使药物吸收更为完善, 并能延长药物作用时间, 从而使肠黏膜修复, 溃疡愈合而达治疗目的。鱼腥草蒸馏液是以鲜鱼腥草为原料提取挥发油, 有效成分(鱼腥草素、月桂醛、槲皮甙及异槲皮甙等 38 种)含量高, 药理作用广泛, 如其松弛肠道平滑肌作用可减轻肠痉挛, 延长肠内容物停留时间并有利于其吸收, 从而缓解腹痛和腹泻症状^[5, 6]; 槲皮甙及异槲皮甙具有改善毛细血管脆性作用而达止血功效, 使便血消失; 鱼腥草治疗前, UC 肠黏膜上皮细胞线粒体肿胀, 微绒毛变短小, 杯状细胞不成熟, 造成对水分等物质的吸收障碍, 出现腹泻症状, 而上皮细胞凋亡明显增多则可使肠黏膜上皮细胞屏障破损, 导致溃疡, CD54 表达增多则可加重炎症反应, 应用鱼腥草治疗后, 因其具有清热解毒排脓消炎作用, 可使线粒体肿胀减轻, 微绒毛和杯状细胞恢复, 细胞凋亡少^[10], CD54 表达下调, 从而使肠黏膜修复, 溃疡愈合, 其疗效明显优于经典的柳氮磺吡啶治疗法, 而且鱼腥草为药食兼用之品, 其 pH 值和渗透压与人体环境基本一致, 临床长期应用无明显毒副作用, 克服了柳氮磺吡啶的不足, 灌肠方法简便易行, 不受条件限制, 取效快, 疗

效显著, 值得进一步推广验证.

UC 一般都具有腹痛、腹泻、黏液脓血便及不同程度的里急后重等共同症状. 这些症状与结肠炎症和动力变化之间的关系怎样? 研究表明, UC 患者存在多种结肠动力紊乱: 活动期 UC 患者推进性收缩波数目增多, 推进速度加快, 这些低幅的快速推进性收缩增加导致排便次数增多, 出现腹泻, 即 UC 患者胃结肠反射亢进, 进食后出现腹痛、肠鸣、便意, 排便后症状缓解. 正常人餐后压力乙状结肠>降结肠>结肠脾曲, 存在压力梯度, 通过节段性收缩混合和碾磨结肠内容物, 使其与肠黏膜充分接触, 以促进水和电解质的重吸收, 而活动期 UC 患者远端结肠各部位压力均较正常人明显降低, 不同部位压力无明显差别, 使节段性收缩作用减弱, 再加上肠黏膜炎症, 不能充分吸收水分和电解质, 导致腹泻. 活动期 UC 患者远端结肠感觉阈值、排便阈值、疼痛阈值均较正常人明显下降^[11], 说明其远端结肠敏感性升高, 所以少量的肠内容物刺激即产生排便反射, 易导致便频、便急与腹泻、腹痛症状. 应用鱼腥草治疗后, 上述指标明显好转, 可能与以下因素有关: 鱼腥草具有松弛肠道平滑肌作用, 可减轻肠痉挛, 延长肠内容物停留并有利于其吸收, 从而缓解腹痛和腹泻症状, 我们前期的实验也证实鱼腥草蒸馏液可改善 UC 大鼠结肠动力紊乱, 使腹泻症状缓解, 本研究中患者腹痛、腹泻症状缓解可能部分与此有关; 鱼腥草具有抗炎作用, 鱼腥

草有清热解毒排脓消炎功能, 抗炎作用强, 我们前期的实验证明鱼腥草可使 UC 大鼠炎症指数明显降低, 随着炎症减轻, UC 患者结肠动力紊乱逐渐恢复, 从而使黏液脓血便和里急后重感等症候缓解.

4 参考文献

- 1 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- 2 江学良, 王志奎, 秦成勇. 中国溃疡性结肠炎的研究现状与对策. *世界华人消化杂志* 2000;8:610-613
- 3 江学良, 秦成勇, 李国庆. 溃疡性结肠炎的其他治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:341-342
- 4 江学良, 权启镇, 刘涛, 董兴成. 溃疡性结肠炎研究的新进展. *世界华人消化杂志* 2000;8:216-218
- 5 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军, 齐凤. 鱼腥草治疗溃疡性结肠炎的实验研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:786
- 6 江学良, 权启镇, 董兴成, 刘涛. 鱼腥草对溃疡性结肠炎患者直肠肛门动力学的影响. *中医药学报* 2000;4:43-44
- 7 江学良, 权启镇, 王志奎. 溃疡性结肠炎的诊断、分型及疗效标准. *世界华人消化杂志* 2000;8:332-334
- 8 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军. 复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型及其免疫和超微结构变化. *世界华人消化杂志* 1999;7:381
- 9 江学良, 权启镇, 陈桂荣, 尹格平, 孙自勤, 王要军. 溃疡性结肠炎组织中黏附分子 CD54, CD44 的检测. *中华消化内镜杂志* 1998;15:292-294
- 10 江学良, 权启镇, 陈桂荣, 孙自勤, 王要军, 王玉萍. 凋亡调控蛋白在溃疡性结肠炎活检组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:107-108
- 11 江学良, 权启镇, 王要军, 孙自勤. 溃疡性结肠炎患者直肠容量、顺应性和肛门压力测定. *中华消化内镜杂志* 2000;17:170-171

奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎随机对照研究

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐 风

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐风, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 山东省济南市 250031

江学良, 男, 1967-08-26 生, 山东省安丘市人, 汉族, 医学博士, 科技部科技期刊评审专家, 中英国际炎症性肠病研究中心及济南军区总医院消化内镜中心负责人. 世界华人消化大会共同秘书长, 《Inflammatory Bowel Disease》, 《世界华人消化杂志》, 《中华腹部疾病杂志》等 8 家杂志常务编委和编委. 编著《溃疡性结肠炎的现代诊疗与进展》等专著 2 部. 在《World Journal of Gastroenterology》等杂志发表论文 50 篇, 5 篇被美国 SCI 收录. 主要研究方向为溃疡性结肠炎, 获军队及省部级科技成果奖 6 项. 应邀在世界消化大会、世界华人消化大会等作《中国溃疡性结肠炎研究》的大会报告. 山东省卫生厅青年基金项目, No.2001CA2EFB2

项目负责人: 江学良, 250031, 山东省济南市师范路 25 号, 中国人民解放军济南军区总医院消化科. chfjxl@jn-public.sd.cninfo.net

电话: 0531-8381896

收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

A control study on treatment of ulcerative colitis with olsalazine sodium

Xue-Liang Jiang, Qi-Zhen Quan, Zi-Qin Sun, Yao-Jun Wang, Rui-Lian Shang, Feng Qi

Xue-Liang Jiang, Qi-Zhen Quan, Zi-Qin Sun, Yao-Jun Wang, Rui-Lian Shang, Feng Qi, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital of Jinan Command Area, Jinan 250031, Shandong Province, China. Supported by Youth Research Foundation of the Bureau of Health of Shandong Province, No. 2001CA2EFB2

Correspondence to: Dr. Xue-Liang Jiang, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital of Jinan Command Area, 25 Shifanlu, Jinan 250031, Shandong Province, China. chfjxl@jn-public.sd.cninfo.net
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

Abstract

AIM: To study the clinical efficacy and safety of olsalazine sodium in patients with ulcerative colitis (UC).

METHODS: Forty-two chronic intermittent UC patients were randomly divided into two groups: olsalazine sodium treatment group ($n=21$) and SASP group ($n=21$). Clinical effects and safety were compared between the two groups.

RESULTS: The overall clinical efficacy of olsalazine sodium group (complete remission in 16 cases, improvement in 4 patients, ineffective in one case) was better than that in SASP group (complete remission in 10 cases, improvement in 4 patients, ineffective in 7 cases, $P<0.05$). The clinical symptoms relieve of olsalazine sodium group (complete remission in 15 cases, partly in 5 patients, ineffective in one case) was better than that in SASP group (complete remission in 10 cases, partly in 5 patients, ineffective in 6 cases, $P<0.05$). The colonoscopic remission of olsalazine sodium group (complete remission in 11 cases, partly in 9 patients, ineffective in one case) was better than that in SASP group (complete remission in 7 cases, partly in 8 patients, ineffective in 6 cases, $P<0.05$). The histologic remission of olsalazine sodium group (complete remission in 13 cases, partly in 7 patients, ineffective in one case) was better than that in SASP group (complete remission

in 6 cases, partly in 10 patients, ineffective in 5 cases, $P<0.05$). The side effects of gastrointestinal tract in olsalazine sodium group were fewer than that of SASP group except for frequency of watery diarrhea. No other side effect was observed in olsalazine sodium group, while an elevated ALT, decreased WBC and skin eruption were observed in SASP group. Two patients relapsed in olsalazine sodium group while 8 cases relapsed in SASP group during follow-up period (from 6 months to one year).

CONCLUSION: The clinical efficacy and safety of olsalazine sodium in patients with ulcerative colitis is superior to that of SASP.

Jiang XL, Quan QZ, Sun ZQ, Wang YJ, Shang RL, Qi F. A control study on treatment of ulcerative colitis with olsalazine sodium. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1211-1213

摘要

目的: 研究国产奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎(UC)患者的疗效及其安全性.

方法: 应用奥沙拉秦钠治疗 21 例活动期 UC 患者, 并与柳氮磺吡啶(SASP)治疗组 21 例作随机对照研究, 观察两组临床总疗效, 临床症状缓解情况, 肠镜缓解情况, 组织学缓解情况, 复发情况及不良反应.

结果: 临床总疗效: 奥沙拉秦钠(完全缓解 16 例, 有效 4 例, 无效 1 例)显著优于 SASP (完全缓解 10 例, 有效 4 例, 无效 7 例, $P<0.05$). 临床症状缓解情况: 奥沙拉秦钠(完全缓解 15 例, 部分缓解 5 例, 无效 1 例)显著优于 SASP (完全缓解 10 例, 部分缓解 5 例, 无效 6 例, $P<0.05$). 肠镜缓解情况: 奥沙拉秦钠(完全缓解 11 例, 部分缓解 9 例, 无效 1 例)显著优于 SASP (完全缓解 7 例, 部分缓解 8 例, 无效 6 例, $P<0.05$). 组织学缓解情况: 奥沙拉秦钠(完全缓解 13 例, 部分缓解 7 例, 无效 1 例)显著优于 SASP (完全缓解 6 例, 部分缓解 10 例, 无效 5 例, $P<0.05$). 胃肠道反应情况: 奥沙拉秦钠组上腹部不适、烧心、恶心等反应例数少于 SASP 组, 水样大便次数增多例数较 SASP 组多. 奥沙拉秦钠组未见其他不良反应, 而 SASP 组则有 ALT 升高、WBC 下降、皮疹等不良反应. 复发情况随访 6 mo-1 a, 奥沙拉秦钠治疗组 21 例中有 2 例复发, 而 SASP 治疗组 21 例中有 8 例复发.

结论: 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎患者的疗效及其安全性优于 SASP.

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐风. 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎随机对照研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1211-1213
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1211.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)较常见,近年来我国报道的病例数显著增加^[1].但由于该病因不清^[2-13],治疗缺乏特异性^[14-19],导致病情迁延,反复发作,严重危害人民群众的健康.我国慢性反复发作型病例占52.6%^[1],柳氮磺吡啶(SASP)目前仍是该病治疗的主要药物,但其疗程长,副反应多,停药后易复发,疗效并不理想.因此,结合我国UC发病特点,寻找更为理想有效,副反应少的药物成为UC研究的重点^[14-19].奥沙拉秦钠由二分子5-氨基水杨酸经偶氮键相连接而成,在结肠部位被细菌裂解后成为二分子5-氨基水杨酸而发挥作用,是一种治疗溃疡性结肠炎的新药,我们报告其对慢性反复发作型UC的疗效及其安全性.

1 材料和方法

1.1 材料 慢性反复发作型UC患者42例,均符合1993年太原全国慢性非感染性肠道疾病学术研讨会制定的标准,其中男19例,女23例,平均年龄32.6岁,病程6 mo-5 a年,均有不同程度的腹泻、腹痛、脓血便、里急后重等症状.肠镜检查病变累及乙状结肠以上12例,乙状结肠以下30例.病理为糜烂溃疡、隐窝脓肿、非特异性炎症及不典型增生等改变. UC患者随机分为奥沙拉秦钠胶囊治疗组(0.5 g, 2次/d, 8 wk, 由天津力生制药股份有限公司生产. 畅美®为奥沙拉秦钠的胶囊剂,每粒250 mg,批准文号:国药准字X20000247)21例,柳氮磺吡啶口服对照组(1 g, 4次/d, 8 wk)21例. SASP组和奥沙拉秦钠组患者病情轻、中、重程度分别为13, 7, 1和11, 8, 2例,差异无显著性(Ridit分析, $P > 0.05$). 对用药过程中腹泻次数增加2-3次/d的患者,不能耐受者可加用易蒙停1-2粒/d,但在整个疗程中,用药不得超过10 d.

1.2 方法 治疗前和治疗后1, 2, 4, 6, 8 wk随访,病例记录表记录有关的症状和体征. 治疗前及治疗结束后3 d内镜观察以下7项指标,其中脓性分泌物和假息肉分为两级;溃疡、糜烂、黏膜出血、充血水肿和血管模糊按其程度分为0, 1, 2, 3, 4级(0-无, 1-轻, 2-中, 3-较重, 4-重),严格按照观察表项目填写. 治疗前及治疗后1, 2, 4, 6, 8 wk检查大便常规及血常规. 治疗前和治疗后第4, 8周检查出凝

血时间及血沉. 治疗前及治疗后8 wk各检查血清钾、钠、氯、肌酐、尿素氮、谷丙转氨酶及总胆红素. 治疗前及治疗后内镜活检标本进行组织学检查和分级(0级:无多形核细胞;1级:固有层有少量多形核细胞浸润;2级:固有层有明显多形核细胞浸润,累及50%以上隐窝;3级:有大量多形核细胞浸润伴隐窝脓肿;4级:明显急性炎症伴溃疡形成). 采用中华医学会消化病学分会对炎症性肠病诊断治疗规范的建议提出的疗效标准^[24](完全缓解:临床症状消失,结肠镜检查黏膜大致正常;有效:临床症状基本消失,结肠镜复查,黏膜轻度炎症反应或假息肉形成;无效:经治疗后临床症状、内镜及病理检查无改善). 临床症状完全缓解:治疗8 wk后大便0-2次/d,无肉眼血便和镜下红细胞;部分缓解:治疗8 wk后大便3-4次/d,无肉眼血便,镜下红细胞(10个/高倍镜);无变化:治疗8 wk后大便次数5次/d以上,肉眼可见血便. 肠镜完全缓解:内镜7项指标中五项或以上在治疗后比治疗前下降一个等级;部分缓解:内镜7项指标中3-4项在治疗后比治疗前下降一个等级;无变化:肠镜7项指标中0-2项在治疗后比治疗前下降一个等级. 组织学完全缓解:治疗后病理分级比治疗前下降,治疗后病理分级0-1级;部分缓解:治疗后病理分级比治疗前下降,治疗后病理分级>1级;无变化:治疗前后无变化. 观察有无常见不良反应,如恶心、纳差、腹泻、失眠、上腹痛、头晕、皮疹、腰酸、浮肿等. 记录不良事件的发生时间、严重程度、持续时间、采取的措施和转归.

统计学处理 采用Ridit分析.

2 结果

奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎的临床总疗效显著优于SASP,完全缓解、有效和无效分别为16, 4, 1例和10, 4, 7例($P < 0.05$, vs SASP组);奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎的临床症状缓解情况显著优于SASP,完全缓解、部分缓解和无效分别为15, 5, 1和10, 5, 6例($P < 0.05$, vs SASP组);奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎肠镜缓解情况显著优于SASP,完全缓解、部分缓解和无效分别为11, 9, 1和7, 8, 6例($P < 0.05$, vs SASP组),奥沙拉秦钠治疗前后肠镜检查图像见图1和图2;奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎

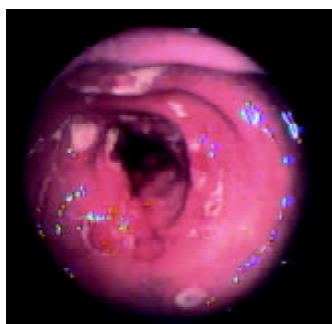


图1 奥沙拉秦钠治疗前肠镜检查图像.

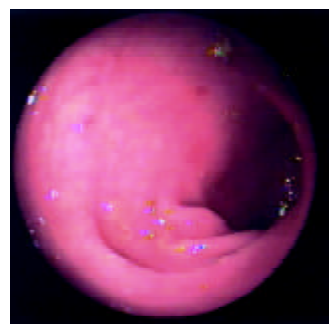


图2 奥沙拉秦钠治疗4 wk后肠镜检查图像.

的组织学缓解情况显著优于 SASP, 完全缓解、部分缓解和无效分别为 13, 7, 1 和 6, 10, 5 例($P < 0.05$, vs SASP 组). 除水样大便次数增多外(5 vs 1 例), 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎的胃肠道反应少于 SASP (上腹部不适、烧心和恶心分别为 3, 1, 2 和 15, 7, 5 例). 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎未见其他不良反应, 而 SASP 组则有 ALT 升高 1 例, WBC 下降 1 例, 皮疹 2 例等不良反应. 随访 6 mo-1 a, 奥沙拉秦钠治疗组 21 例中有 2 例复发, 而 SASP 治疗组 21 例中有 8 例复发.

3 讨论

SASP 目前仍然是治疗溃疡性结肠炎的主要药物, 具有起效快、近期临床缓解率高等优点, 但停药后易复发, 长期用药副反应增多, 部分顽固性患者疗效并不理想. 因此, 寻找更为理想有效、副反应少的药物和方法成为 UC 研究的重点^[14-19]. 在目前病因和发病机制还未完全阐明的情况下^[2-13], 非特异性抗炎药物在相当长时间内仍是 UC 治疗的主要药物, 鉴于传统的氨基水杨酸类药物疗效肯定, 副反应多, 因此, 通过开发新剂型, 改变给药途径等方法以提高其疗效, 减少副反应仍是一个主要方向^[2]. SASP 经口服后在结肠内被细菌分解为 5-氨基水杨酸(5-ASA)和磺胺吡啶, 前者为 SASP 的有效成分, 后者为 5-ASA 的载体, 可出现磺胺过敏、胃肠道反应、肝肾功能损害等副反应, 影响了其临床应用. 本研究再次证实 SASP 治疗组有不同程度的上述副反应. 为了在得到满意疗效的同时尽可能降低药物的毒性, 合理治疗 UC 的方法是使用不含磺胺吡啶的 5-ASA, 并使之直接作用于病变的肠段. 但 5-ASA 在口服后会被快速吸收, 不能达到发生炎症的黏膜局部. 为了解决这个问题, 最新治疗 UC 的药物开发方向主要是如何使 5-ASA 到达病灶部位并发挥作用^[2]. 奥沙拉秦钠就具有类似特点, 他是 5-ASA 的前体药物, 由两分子 5-ASA 以偶氮键相连接, 口服后在结肠前吸收极少(口服剂量的吸收率不到 5%), 且不会分解, 全身的生物利用度极低, 代谢部位主要是结肠, 到结肠后, 在结肠细菌的作用下偶氮键断裂, 分裂为 2 分子的 5-ASA, 具有与 SASP 相同的药效而无其副作用. 奥沙拉秦已经在国外上市 10 a, 其治疗 UC 的疗效和安全性已经有报道. 国产奥沙拉秦钠是由天津力生制药股份有限公司与天津药物研究院联合开发的四类新药. 畅美为奥沙拉秦钠的胶囊剂, 是 IV 类新药, 2000 年正式在国内上市. 我们应用国产奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型 UC, 证明其临床总疗效、临床症状缓解情况、肠镜缓解情况、组织学缓解情况均显著优于 SASP, 而且具有胃肠道反应少、未见对肝功、WBC 及皮肤有损害等优点, 水样大便次数增多例数较 SASP 组多可能与钠盐抑制小肠水分吸收有关, 主要发生在开始用药或增加剂量时, 一般不影响继续用药, 向患者解释说明原因消除顾虑,

饭后给药或增加给药次数可使该症状减轻或消失, 个别患者可临时加服易蒙停.

我国 UC 主要以慢性反复发作型为主(占 52.6 %)^[1], 如何减少复发是 UC 治疗的难点. 在目前尚无特异性治疗药物的情况下, 对这些患者进行维持治疗非常重要, 若能坚持维持治疗, 有望降低复发, 但由于患者依从性差、经济条件无法承受、医师对此认识不足、药物副反应多等多种原因, 维持治疗在国内没有很好落实, 特别是长期(>1 a)维持治疗没有引起重视, 导致病情反复. 我们研究显示, 与 SASP 相比, 国产奥沙拉秦钠具有疗效高、副反应少、复发低等优点. 因此, 只要条件许可, 尽量采用 5 氨基水杨酸类药物长期维持治疗以减少复发.

总之, 本随机对照研究证明国产奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎患者的疗效及其安全性优于 SASP. 具有提高缓解率、减少复发、副反应少、耐受性好、改善生活质量等优点, 可适应于 SASP 效果不好或 SASP 不能耐受以及经济条件许可的患者.

4 参考文献

- 1 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- 2 江学良, 王志奎, 秦成勇. 中国溃疡性结肠炎的研究现状与对策. *世界华人消化杂志* 2000;8:610-613
- 3 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军. 复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型及其免疫和超微结构变化. *世界华人消化杂志* 1999;7:381
- 4 江学良, 权启镇, 陈桂荣, 尹格平, 孙自勤, 王要军. 溃疡性结肠炎组织中黏附分子 CD54, CD44 的检测. *中华消化内镜杂志* 1998;15:292-294
- 5 Jiang XL, Cui HF. A new chronic ulcerative colitis model produced by combined methods in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:742-746
- 6 江学良, 权启镇, 刘同亭, 王要军, 孙自勤, 齐风, 任洪波, 张维莉, 张力. 溃疡性结肠炎患者血小板活化的检测. *新消化病学杂志* 1997;5:736
- 7 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 齐风. 溃疡性结肠炎患者黏附分子的变化意义. *华人消化杂志* 1998;6:54-55
- 8 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 齐风, 王东, 张修礼. 溃疡性结肠炎患者淋巴细胞凋亡调控蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 1999;7:903-904
- 9 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军. 溃疡性结肠炎并发急性心肌梗塞 1 例. *世界华人消化杂志* 1999;7:963
- 10 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 齐风, 王东, 张修礼. 炎症性肠病患者外周血可溶性 CD44v6 检测. *世界华人消化杂志* 1999;7:1028
- 11 江学良, 权启镇, 陈桂荣, 孙自勤, 王要军, 王玉萍. 凋亡调控蛋白在溃疡性结肠炎活检组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:107-108
- 12 江学良, 权启镇, 王要军, 孙自勤. 溃疡性结肠炎患者直肠容量、顺应性和肛门压力测定. *中华消化内镜杂志* 2000;17:170-171
- 13 江学良, 潘伯荣, 马景云, 冀振华, 马连生. 世纪之交的消化 - 回顾与展望. *世界华人消化杂志* 2000;8:1161-1176
- 14 江学良. 溃疡性结肠炎的诊断和治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:332
- 15 江学良. 溃疡性结肠炎的治疗. *消化病诊断和治疗* 2001;1:41-42
- 16 江学良, 秦成勇, 李国庆. 溃疡性结肠炎的其他治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:341-342
- 17 江学良, 权启镇, 刘涛, 董兴成. 溃疡性结肠炎研究的新进展. *世界华人消化杂志* 2000;8:216-218
- 18 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军, 齐风. 鱼腥草治疗溃疡性结肠炎的实验研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:786
- 19 江学良, 权启镇, 董兴成, 刘涛. 鱼腥草对溃疡性结肠炎患者直肠肛门动力学的影响. *中医药学报* 2000;4:43-44

抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐 风

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐风, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 山东省济南市 250031

江学良, 男, 1967-08-26 生, 山东省安丘市人, 汉族, 医学博士, 科技部科技期刊评审专家, 中英国际炎症性肠病研究中心及济南军区总医院消化内镜中心负责人. 世界华人消化大会共同秘书长, 《Inflammatory Bowel Disease》, 《世界华人消化杂志》, 《中华腹部疾病杂志》等 8 家杂志常务编委和编委. 编著《溃疡性结肠炎的现代诊疗与进展》等专著 2 部. 在《World Journal of Gastroenterology》等杂志发表论文 50 篇, 5 篇被美国 SCI 收录. 主要研究方向为溃疡性结肠炎, 获军队及省部级科技成果奖 6 项. 应邀在世界消化大会、世界华人消化大会等作《中国溃疡性结肠炎研究》的大会报告.

山东省卫生厅青年基金项目, No.2001CA2EFB2

项目负责人: 江学良, 250031, 山东省济南市师范路 25 号, 中国人民解放军济南军区总医院消化科. chfjxl@jn-public.sd.cninfo.net

电话: 0531-8381896

收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

Treatment of refractory ulcerative colitis with Kangshuangling

Xue-Liang Jiang, Qi-Zhen Quan, Zi-Qin Sun, Yao-Jun Wang, Rui-Lian Shang, Feng Qi

Xue-Liang Jiang, Qi-Zhen Quan, Zi-Qin Sun, Yao-Jun Wang, Rui-Lian Shang, Feng Qi, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital of Jinan Command Area, Jinan 250031, Shandong Province, China
Supported by Youth Research Foundation of the Bureau of Health of Shandong Province, No. 2001CA2EFB2

Correspondence to: Dr. Xue-Liang Jiang, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital of Jinan Command Area, 25 Shifanlu, Jinan 250031, Shandong Province, China. chfjxl@jn-public.sd.cninfo.net
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

Abstract

AIM: To study the therapeutic effects and mechanism of Kangshuanling in patients with refractory ulcerative colitis (UC).

METHODS: Eighteen patients (8 males, 10 females) with refractory UC unresponsive to high-dose prednisolone and sulfasalazine therapy for more than one month were treated with Kangshuanling (7 200 U/d). Prednisolone was gradually stopped and sulfasalazine maintained. Stool frequency, rectal bleeding, colonoscopy and histology, as well as general well-being were observed and CD62p, CD63, CD54, Pgp-170 (flow cytometry), TXA2 (RIA), blood platelet aggregation rate and thrombosis length *in vitro* were assessed.

RESULTS: After more than 4 weeks of combined Kangshuanling and sulfasalazine therapy, sixteen patients achieved clinical remission, with a highly significant statistical difference ($P < 0.01$) between pre- and post-treatment mean scores for all disease parameters: stool frequency (8.2/d vs 1.6/d), rectal bleeding (2.7 vs 0.3), colonoscopy (2.6 vs 1.1), histology (12.0 vs 5.0), general well being (4.0 vs 0.6). And CD62p (8.0 ± 3.1 % vs 4.1 ± 1.8 %), CD63 (6.3 ± 2.1 % vs 3.2 ± 1.6 %), TXA2 (548 ± 85 ng/L vs 390 ± 67 ng/L), platelet aggregation rate

(43.2 ± 10.7 % vs 34.8 ± 8.1 %), thrombosis length *in vitro* (2.3 ± 0.6 cm vs 1.8 ± 0.3 cm), CD54 in blood (26.9 ± 6.9 % vs 14.4 ± 5.1 %), CD54 in tissues (51.1 ± 6.2 % vs 23.1 ± 4.1 %), Pgp-170 in blood (10.4 ± 2.7 % vs 18.9 ± 3.9 %), Pgp-170 in tissues (10.2 ± 2.3 % vs 16.5 ± 3.2 %) decreased significantly ($P < 0.01$ or 0.05).

CONCLUSION: Kangshuanling may be effective in treating refractory UC, the mechanism is partly related to inhibition of platelet activation, hypercoagulable state, MDR expression and anti-inflammatory effects.

Jiang XL, Quan QZ, Sun ZQ, Wang YJ, Shang RL, Qi F. Treatment of refractory ulcerative colitis with Kangshuangling. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1214-1218

摘要

目的: 研究抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎(UC)的疗效和机制.

方法: 常规应用激素和/或柳氮磺吡啶(SASP)治疗 1 mo 以上无效或恶化的 UC 患者 18 例 (男 8 例, 女 10 例, 平均年龄 32.4 岁), 加用抗栓灵含片, 2 片 (相当于 2 400 U 低分子肝素钠) 含化, 2 次/d, 观察大便次数、便血情况、自觉症状、肠黏膜肠镜下和组织病理学改变, 并在治疗前和治疗后 4 wk 用流式细胞仪测定血液中黏附分子 P 选择素 (CD62p), 溶酶体膜糖蛋白 (CD63), 血液和组织中细胞间黏附分子 (CD54), 多药耐药基因 (MDR) 产物 P-糖蛋白 170 (Pgp-170), 用放射免疫法测定血栓素 A2 代谢产物 TXB2 含量, 用血小板黏附仪测定血小板黏附率.

结果: 应用抗栓灵含片治疗后, 与治疗前相比, 大便次数 (1.6 vs 8.2 次/d)、便血情况 (范围 0-3, 0.3 vs 2.7 分)、肠镜下情况 (范围 0-3, 1.1 vs 2.6 分)、病理组织学观察 (范围 0-15, 5.0 vs 12.0 分)、自觉症状 (范围 0-5, 0.7 vs 3.9 分) 均明显改善或缓解 ($P < 0.05$). CD62p (4.1 ± 1.8 % vs 8.0 ± 3.1 %), CD63 (3.2 ± 1.6 % vs 6.3 ± 2.1 %), TXA2 (390 ± 67 ng/L vs 548 ± 85 ng/L), 血小板黏附率 (34.8 ± 8.1 % vs 43.2 ± 10.7 %), 体外血栓形成长度 (1.8 ± 0.3 cm vs 2.3 ± 0.6 cm), 血液中 CD54 (14.4 ± 5.1 % vs 26.9 ± 6.9 %), 组织中 CD54 (23.1 ± 4.1 % vs 51.1 ± 6.2 %), 血液中多药抗性基因 (MDR) 产物 P-糖蛋白 170 (Pgp-170) (10.4 ± 2.7 % vs 18.9 ± 3.9 %), 组织中 Pgp-170 (10.2 ± 2.3 % vs 16.5 ± 3.2 %) 明显下降 ($P < 0.01$ 或 0.05).

结论: 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎有效, 可抑制血小板活化和高凝状态, 减轻炎症, 抑

制多药耐药基因表达.

江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤. 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1214-1218
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1214.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)病因和发病机制尚不完全清楚, 应用激素和柳氮磺吡啶(SASP)进行非特异性抗炎治疗可使许多患者得到缓解, 但对激素治疗无效甚至恶化的部分顽固性复发性或重症患者目前还没有理想的治疗方法^[1]. 由于这些患者存在高凝状态^[2-4], 有学者应用抗凝药物肝素治疗, 取得了一定疗效^[5-7], 但普通肝素半衰期短, 注射给药很不方便, 限制了其临床应用. 我们应用低分子肝素口服制剂^[8,9]治疗激素抵抗型UC取得了较好效果^[10], 克服了普通肝素的缺点, 除具有抗凝抗血栓作用外, 还有一定的抗炎作用^[11,12], 但口服制剂常无法避免肝脏首过效应, 为此, 我们应用抗栓灵含片(低分子量肝素钠)治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎, 观察其临床疗效并探讨作用机制^[13].

1 材料和方法

1.1 材料 常规应用激素和/或柳氮磺吡啶(SASP)治疗1 mo以上无效或恶化的UC患者18例, 男8例, 女10例, 平均年龄32.4岁, 均符合1993年太原全国慢性非感染性肠道疾病学术研讨会制订的溃疡性结肠炎诊断标准^[14]. 其中重度10例, 中度8例, 病程7 mo-10 a, 平均4.3 a, 临床表现为便血、腹泻、黏液脓血便及腹痛症状. 3例患者伴有相关的血栓性疾病. 舌下含服抗栓灵含片(低分子肝素钠, 山东淄博松龄制药厂生产, 鲁卫药准字1996-072523)2片(相当于低分子肝素钠2 400 U), 3次/d, 15d后改为1片/次, 继续同时维持SASA现用量, 逐渐减少激素用量. 正常人对照组20例, 平均年龄30.6岁, 均为健康查体者.

1.2 方法

1.2.1 临床指数评价^[7] 分别在治疗前和治疗后对下列临床指数进行量化, 以评价治疗效果: (1)大便次数(过去1wk每天的大便次数); (2)便血(0分: 无; 1分: 偶尔有少许血便; 2分: 经常有明显的血便; 3分: 全部为血便); (3)肠镜下表现根据改良的Baron评分标准分为0分: 正常黏膜图像; 1分: 轻度病变(血管纹理模糊, 黏膜充血但无出血); 2分: 中度病变(黏膜呈颗粒样变化); 3分: 重度病变(黏膜溃疡并自发性出血); (4)组织学分级: 将UC的5项组织学特征(炎性细胞浸润, 隐窝炎, 隐窝脓肿形成, 杯状细胞不成熟, 黏膜上皮增生)每项分为4级(0分: 无; 1分: 轻度; 2分: 中度; 3分: 重度), 总分小于5分为轻度病变, 5-10分为中度病变, 10-15分为重度病变; (5)全身健康(0=很好, 1=好, 2=较差, 3=差, 4=很差, 5=极差).

1.2.2 血小板活化的检测^[2,4] 血小板活化的膜标志物可溶性黏附分子P选择素(CD62p)及GP53(CD63)采用流式

细胞仪(FACScan型, 美国Becton Dickinson)测定. 主要试剂: 异硫氰酸荧光素(FITC), 标记的鼠抗人P选择素(CD62p-FITC), 鼠抗人GP53(CD63-FITC), 同种荧光素标记的阴性对照羊抗鼠IgG1-FITC, 均为法国Immunotech产品. 取静脉血2 mL, 20 g/L EDTA抗凝, 1 500 r/min离心5 min, 取上清液, 以80 g/L多聚甲醛室温固定15 min, 用PBS漂洗3次, 2 000 r/min, 离心5 min, 调整血小板浓度为 $300 \times 10^9/L$, 将20 μL CD62p-FITC, CD63-FITC及IgG1-FITC分别加入上述富含血小板血浆100 μL 中, 混匀室温避光30 min, 用PBS洗一遍, 弃上清, 上机. 上机前先以标准微球调整仪器, 使变异系数在2%以内, 上机后收集20 000-50 000个细胞, 荧光强度以对数放大, 光散射数据存软盘, 结果采用Macintosh 650型计算机及Cell Quest Plot软件进行数据分析, 以阳性细胞百分数表示. TXA2稳定的代谢产物TXB2(药盒由苏州医学院提供)采用放免法测定, 按操作说明进行. 血小板黏附率(PAR)采用XSNR II血栓形成、血小板黏附两用仪(无锡电子仪器二厂)测定.

1.2.3 血液和组织中CD54^[15], Pgp-170^[16,17]检测 试剂来源: 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人CD54(CD54-FITC), Pgp-170(Pgp-170-FITC), 同种荧光素标记的阴性对照羊抗鼠IgG1-FITC均由法国国际免疫公司生产; 淋巴细胞分离液由中国医学科学院血液研究所生产. 血液样本Pgp-170, CD54的制备: 分别取肝素抗凝血2 mL, 重层于淋巴细胞分离液上, 1 500 r/min, 离心15 min, 提取其中淋巴细胞层, 再以PBS 3 mL洗2次, 弃上清后用700 mL/L乙醇固定, 4℃备用. 将制备的细胞悬液分3管, 每管100 μL , 一管加入20 μL Pgp-170-FITC单抗溶液, 一管加入20 μL CD54-FITC, 另一管为阴性对照, 加20 μL 羊抗鼠IgG1-FITC, 室温避光反应5 min, PBS洗1次, 弃上清液, 以除去未结合的抗荧光抗体. 组织样品处理: UC患者肠镜检查时用活检钳钳取结肠溃疡边缘新鲜组织约0.2 g, 正常人在乙状结肠处取新鲜组织约0.2 g, 置于重叠的100目铜网及260目尼龙网上, 用眼科剪剪成 $1 \times 1 \times 1$ mm碎块, 然后用眼科剪轻搓, 边搓边用磷酸缓冲液(PBS)冲洗入小烧瓶中, 直至组织搓净. 1 500 r/min离心5 min, 再用PBS洗2次, 1 000 r/min, 离心2 min, 重层于淋巴细胞分离液上, 再以PBS 3 mL洗2次, 弃上清后用700 mL/L乙醇固定, 4℃备用. 免疫反应: 反应前调整细胞数至 $10^{12}/L$, 分取100 μL 放入3支试管内, 试管内分别加20 μL CD54-FITC, Pgp-170-FITC和IgG1-FITC, 室温避光反应30 min, 上机. 流式细胞检测: 流式细胞仪为FACScan型, 美国Becton Dickinson生产. 上机前先以标准荧光微球调整仪器变异系数在2.0%以内, 上机后收集10 000个细胞, 荧光强度以对数放大, 测定光散射数据, 结果采用Macintosh 650型计算机及Cell Quest Plot软件进行数据分析, 以阳性细

胞百分数表示.

统计学处理 采用两样本均数的 t 检验和等级资料的 Riddit 分析.

2 结果

2.1 临床疗效 UC 患者 16 例在加用抗栓灵含片治疗后获得临床缓解,大便次数正常,2 例患者仅表现为便血减少,症状显著改善的平均时间为 3 (1-5) wk,临床缓解的平均时间为 6 (1-12) wk,4 例患者便血在 1-2 wk 停止,其余患者 2-6 wk 停止(表 1).

表 1 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性 UC 的临床疗效

分组	大便次数	便血(分)	内镜下表现(分)	组织学(分)	全身症状(分)
治疗前	8.2	2.7	2.6	12.0	3.9
治疗后	1.6 ^b	0.3 ^b	1.1 ^b	5.0 ^b	0.7 ^b

^bP < 0.01 vs 治疗前.

2.2 CD_{62p}, CD₆₃, TXA₂, PAR 和体外血栓长度(TL)变化 与正常人(图 1)相比,难治性 UC 患者血小板活化的膜标志物 P 选择素(图 2),GP53,血小板活化的衍生物 TXB₂ 及血小板活化后聚集反应血小板黏附率均明显升高(P < 0.01, 表 2),应用抗栓灵含片治疗后较治疗前显著下降(P < 0.05, 表 2),但 CD_{62p}, CD₆₃ 仍明显高于正常人(P < 0.05, 表 2).

表 2 抗栓灵含片对 CD_{62p}, CD₆₃, TXA₂, PAR 和体外血栓长度 (TL) ($\bar{x} \pm s$) 影响

分组	CD _{62p} (%)	CD ₆₃ (%)	TXA ₂ (ng/L)	PAR (%)	TL (cm)
UC 治疗前	8.0 ± 3.1 ^b	6.3 ± 2.1 ^b	548 ± 85 ^b	43.2 ± 10.1 ^b	2.3 ± 0.6 ^b
UC 治疗后	4.1 ± 1.8 ^{a,d}	3.2 ± 1.6 ^{a,d}	390 ± 67 ^d	34.8 ± 8.1 ^d	1.8 ± 0.3 ^d
正常人	1.9 ± 0.4	1.6 ± 0.8	340 ± 40	34.1 ± 9.1	1.7 ± 0.4

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 正常人; ^dP < 0.01 vs 治疗前.

表 3 抗栓灵含片对血液和组织中 CD₅₄, Pgp-170 ($\bar{x} \pm s$, %) 影响

组别	血液中 CD ₅₄	组织中 CD ₅₄	血液中 Pgp-170	组织中 Pgp-170
UC 患者				
治疗前	26.9 ± 6.9 ^b	51.1 ± 6.2 ^b	18.9 ± 3.9 ^b	16.5 ± 3.2 ^b
治疗后	14.4 ± 5.1 ^{a,d}	23.1 ± 4.1 ^{a,d}	10.4 ± 2.7 ^{a,c}	10.2 ± 2.3 ^{a,c}
正常人	6.2 ± 3.7	8.8 ± 3.2	6.2 ± 2.2	6.8 ± 3.1

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 正常人; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 治疗前.

2.3 血液和组织中 CD₅₄, MDR 产物 Pgp-170 变化 与正常人(图 3)相比,难治性 UC 患者血液中 CD₅₄ 明显升高,尤以组织中升高更为明显(图 4, 表 3),应用抗栓灵含片治疗后较治疗前显著下降(P < 0.05, 表 3),但仍明显高于正常人(P < 0.05). 与正常人(图 5)相比,血液中 MDR 产物 Pgp-170 明显升高(图 6, 表 3),血液和组织中无显著性差异,应用抗栓灵含片治疗后较治疗前显著下降(P < 0.05, 表 3),但仍明显高于正常人(P < 0.05).

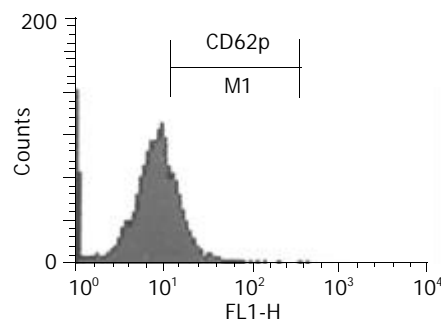


图 1 正常人外周血 CD_{62p} 含量.

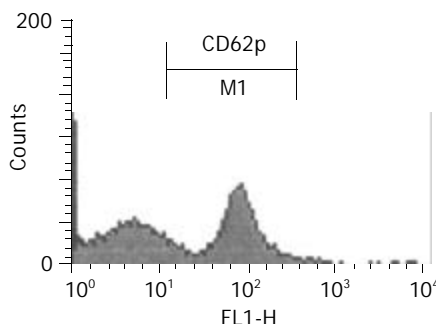


图 2 活动期 UC 患者外周血 CD_{62p} 含量明显升高.

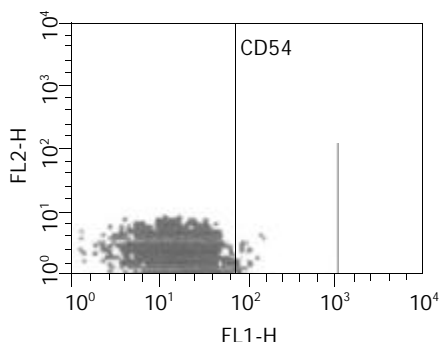


图 3 正常人组织中 CD₅₄ 含量.

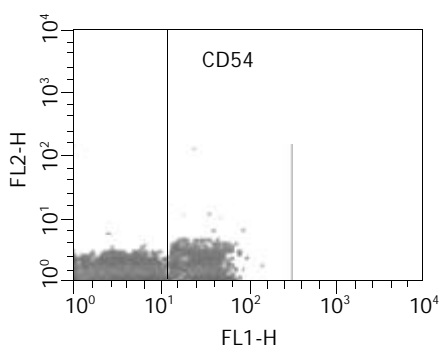


图 4 活动期 UC 组织中 CD₅₄ 含量明显升高.

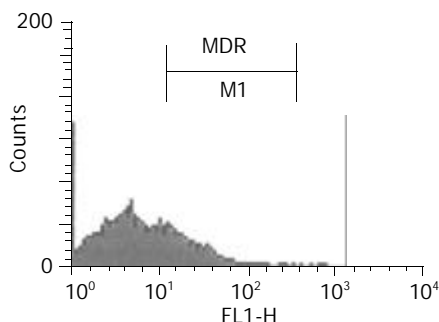


图 5 正常人血液中 MDR 含量.

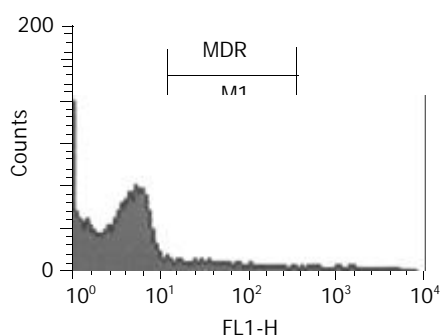


图6 激素治疗无效的UC患者血液中MDR明显升高。

3 讨论

抗栓灵含片是以低分子量肝素类物质(M_r 5 000-15 000, 峰值5 000-8 000)为主要成分的舌下含服制剂, 为白色或类白色, 每片相当于1 200 IU的低分子肝素钠, 所含肝素经特殊加工, M_r 小, 舌下黏膜吸收, 既避免了口服制剂的首过效应^[10], 生物利用度高, 又避免了注射给药的不便, 出血副作用少。肝素除具有抗凝、抗血栓、抗过敏、抗内毒素血症和免疫活性外, 还有较强的抗炎作用^[18], 低分子肝素含有大量8-16单糖单位的糖链, 具有抗血栓作用强, 出血倾向小, 安全性高, 半衰期长和生物利用度高等优点^[8,9]。肝素类药物治疗顽固性UC有肯定疗效的报道^[10]启发我们应用抗栓灵含片是否更为方便和有效, 结果显示, 18例伴血小板活化的顽固性UC患者有16例获得临床缓解, 症状消失。同传统的观点认为应用肝素类药物有可能加重出血倾向相反, 应用抗栓灵含片治疗后, 便血消失往往是治疗有效的最早反应, 这同其他应用肝素类药物治疗的结果类似。

研究抗栓灵含片的作用机制可能对阐明UC的部分发病机制具有一定作用。UC患者易合并血栓形成^[19], 发生率可高达45.2%, 并认为这与UC患者伴发高凝状态有关。由于血小板不仅参与止血和血栓形成, 而且是一种炎症递质, 其在UC发病机制中的作用开始引起人们的重视^[3,4]。P选择素属黏附分子选择素家族的组分之一, 由活化血小板和内皮细胞分泌表达, 并可作为这些细胞活化的标志, 介导中性粒细胞和单核细胞对活化血小板和内皮细胞的黏附。CD63抗原为53 ku的溶酶体膜粘蛋白, 在血小板激活跨位于浆膜, 主要见于单核细胞和巨噬细胞, 可用于活化血小板的检测。我们发现, 难治性UC患者P选择素及GP53较正常人明显升高, 表明血小板处于高活化状态^[3,4], 其可能机制: (1)肠系膜血管系统内皮细胞损伤暴露于血小板极敏感的基底膜胶原, 并激发血小板活化。炎症性肠病患者血清中vonWillebrand因子(内皮细胞损伤的一种标志)增多与这一可能性相符; (2)内毒素和其他吸收的细菌产物激活的单核细胞和中性粒细胞也可激活血小板; (3)血小板和活化的中性粒细胞在肠道病变部位将TXA₂和PAF释放至肠系膜循环, 可加速和促进血小板活化, 本研究中

TXA₂明显升高与这一可能性相符。血小板活化在UC发病机制中可能的作用: (1)活化的血小板通过局部释放炎症递质, 化学趋化物(如PF₄, PAF)及激活其他炎症细胞参与和增强肠黏膜炎症过程。P选择素在中性粒细胞黏附分子中起关键作用, 血小板表达此种抗原使中性粒细胞更易在炎症部位聚集; (2)血小板活化及其衍生的TXA₂易使血小板聚集阻塞肠黏膜微循环, 加重肠黏膜缺氧和损伤, 本研究也证实血小板黏附率升高。另外, TXA₂通过引发局部血管收缩可加重缺血; (3)血小板衍生因子(成纤维细胞和单核细胞的化学诱导剂)从活化的血小板释放出来, 在组织损伤后的修复机制中起重要作用^[3,4]。我们还发现, 应用抗栓灵含片治疗后, 难治性UC患者P选择素、GP53、TXB₂及血小板黏附率较活动期有所下降, 说明抗栓灵含片可抑制血小板活化, 改善高凝状态, 从而减轻临床症状, 但P选择素、GP53仍明显高于正常人, 提示部分难治性UC患者仍存在血小板激活状态, 是否对疾病复发或预后预测意义尚待进一步探讨。

CD54抗原也称细胞间黏附分子-1(ICAM-1), 表达于内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞、白细胞和多种类型的肿瘤细胞^[15]。1991年Sethetal用免疫印迹方法首次证实人血清中存在可溶性CD54, 并具有以下特征: (1)含有膜表面CD54分子的大部分细胞外功能区; (2)具有与其配体淋巴细胞功能相关抗原(LFA-1)结合的能力; (3)与白细胞表面的LFA-1配体结合能阻止白细胞与组织固有细胞之间的黏附。我们采用流式细胞免疫学方法检测UC患者循环中可溶性CD54及组织中CD54, 较正常人明显升高, 尤以组织中升高更为明显, 由于CD54主要介导细胞与细胞间的黏附作用, 在组织炎症的产生过程中, 随着浸润的炎症细胞及组织固有细胞的活化, CD54的表达被上调, 高表达的CD54又可进一步促进炎症细胞的浸润, 引起并加重组织损伤, 因此CD54与UC活动和转归有一定关系。应用抗栓灵含片后, CD54显著下降, 表明难治性UC患者炎症反应明显减轻, 由于这些患者均为长期(>4 wk)应用激素和/或SASP治疗无效, 因此炎症减轻与加用抗栓灵含片有关, 其他学者也报道肝素类药物可抑制UC患者C-反应蛋白、TNF和L选择素, 确切机制还需进一步探讨。

P-糖蛋白是170 ku的多药抗性基因(MDR)产物(Pgp-170), 被看作具有广谱底物特异性的ATP-依赖性药物排出的作用^[16,17]。MDR在肠上皮细胞和淋巴细胞均有表达。我们发现, 与正常人相比, 难治性UC患者血液中Pgp-170明显升高, 由于糖皮质激素是Pgp-170的底物, 药物治疗无效的UC患者与MDR表达有关。血液和组织中无显著性差异, 提示外周血MDR表达稳定, 不受疾病活动或激素治疗影响, 且与结肠上皮细胞表达呈正相关。应用抗栓灵含片治疗后较治疗前显著下降($P < 0.05$), 说明抗栓灵含片对多药抗性有一定的抑制作用, 但Pgp-170仍明显高于正常人($P < 0.05$)。因此

MDR 在 UC 患者对激素治疗的反应中可能起重要作用。

总之, 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性 UC 有肯定的疗效, 其机制可能与部分抑制血小板活化和高凝状态、减轻炎症、抑制多药耐药基因表达有关。结合我国 UC 发病特点, 探讨适合不同类型的 UC 治疗方法, 仍是当前研究的重点和难点^[20]。

4 参考文献

- 1 Jiang XL, Quan QZ, Sun ZQ, Wang YJ, Qi F. Effect of glucocorticoid on lymphocyte adhesion molecule phenotype expression in patients with ulcerative colitis. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 1998;10:366-368
- 2 Collins CE, Cahill MR, Newland AC, Rampton DS. Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106:840-845
- 3 Jiang XL, Quan QZ, Liu TT, Wang YJ, Sun ZQ, Qi F, Ren HB, Zhang WL, Zhang L. Detection of platelet activity in ulcerative colitis patients. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:736
- 4 Jiang XL, Quan QZ, Sun ZQ, Wang YJ, Qi F. Relationship between syndrome-typing of ulcerative colitis and activation of platelet. *Zhongyi Zazhi* 1997;38:730-731
- 5 Folwaczny C, Frike H, Endres S, Hartmann G, Jochum M, Loeschke K. Anti-inflammatory properties of unfractionated heparin in patients with highly active ulcerative colitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 1997;92:911-912
- 6 Evans RC, Wong VS, Morris AI, Rhodes JM. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with heparin: a report of 16 cases. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:1037-1040
- 7 Gaffney PR, Doyle CT, Gaffney A, Hogen J, Hayes DP, Annis P. Paradoxical response to heparin in 10 patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1995;90:220-223
- 8 Cui HF, Zhang TM. Studies of oral preparation of low molecular weight heparin. *Zhongguo Yaoxue Zazhi* 1995;4:51-52
- 9 Cui HF, Zhang TM. Studies of oral preparation of low molecular weight heparin from low anticoagulant activity heparin. *Zhongguo Shenghua Yaowu Zazhi* 1993;4:10-15
- 10 Cui HF, Jiang XL. Treatment of corticosteroid resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heparin. *World J Gastroenterol* 1999;5:448-450
- 11 Jiang XL, Cui HF, Wang YJ, Quan QZ, Sun ZQ. Effects of oral low molecular weight heparin on hemorrheology of rabbit liver damaged by D-galactosamine. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:355-356
- 12 Jiang XL, Zhang JZ, Cui HF, Dong ZL, Wang JY. Treatment on acute hepatitis with oral low molecular weight heparin. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5(Suppl 6):296
- 13 Jiang XL, Wang ZK, Qin CY. Current research and strategy on ulcerative colitis in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:610-613
- 14 Jiang XL. Diagnosis and treatment of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:332
- 15 Jiang XL, Quan QZ, Chen GY, Yin GP, Sun ZQ, Wang YJ. Expression of adhesion molecules on tissues and peripheral lymphocytes in patients with ulcerative colitis. *Zhonghua Xiaohua Neijing Zazhi* 1998;15:292-294
- 16 Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Cherikuri A, O'Toole D, Mahumnd N, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D. High multidrug resistance(P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology* 2000;118:279-288
- 17 Yacyshyn B, Maksymowych W, Bowen-Yacyshyn MB. Differences in P-glycoprotein -170 expression and activity between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol* 1999;60:677-687
- 18 Tyrrell DJ, Kilfeather S, Page CP. Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Tips* 1995;16:198-204
- 19 Koenigs KP, Mcphedran P, Spiro HM. Thrombosis in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1987;9:627-631
- 20 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161

胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和PCNA的表达意义

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 中国人民解放军解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
祝庆孚, 中国人民解放军解放军总医院病理科 北京市 100853
伍银桥, 男, 1964-12-01 生, 湖北省京山县人, 汉族. 1988 年同济医科大学医疗系本科毕业, 现为解放军总医院南楼消化科博士研究生, 主要从事胃癌及癌前病变中癌相关基因异常的研究.
“十五”军队科研基金资助项目, No.01Z035
项目负责人: 王孟薇, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军解放军总医院南楼消化科. wu_yq56@hotmail.com
电话: 010-66937393 传真: 010-66935470
收稿日期: 2003-04-04 接受日期: 2003-05-17

Expression of apoptosis-associated proteins and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in precancerous lesions of stomach

Yin-Qiao Wu, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Qing-Fu Zhu

Yin-Qiao Wu, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Department of Gastroenterology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China
Qing-Fu Zhu, Department of Pathology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China
Supported by Key Project Grant in Medical Sciences from the tenth five-year Plan of Chinese PLA, No. 01Z035
Correspondence to: Meng-Wei Wang, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China. wu_yq56@hotmail.com
Received: 2003-04-04 Accepted: 2003-05-17

Abstract

AIM: To investigate the role of apoptosis-associated protein P53, Bcl-2, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in different transformation in precancerous lesions of the stomach.

METHODS: Immunohistochemical method (LSAB) was used to assess P53, Bcl-2, and PCNA expressions in specimens from patients with (cancerous group, $n=52$) and without (non-cancerous group, $n=56$) gastric cancer.

RESULTS: The occurrence of gastric carcinoma had close correlation with the expression intensity of P53, Bcl-2 and PCNA. PCNA LI in cancerous group was significantly higher than that in non-cancerous group ($P<0.01$). In cancerous group, the majority (88.5 %) had altered expression in one or more genes; multiple altered expression was found in 51.9 %. The difference of multiple altered expression between cancerous group and non-cancerous group was statistically significant ($P<0.05$).

CONCLUSION: Multiple altered expression of P53, Bcl-2 and PCNA and their synergistic action might play a promotional role in the pathogenesis of gastric carcinoma, and the cell proliferative activity was significantly increased in gastric cancer.

Wu YQ, Wang MW, Wu BY, You WD, Zhu QF. Expression of apoptosis-associated proteins and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in precancerous lesions of stomach. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(8):1219-1222

摘要

目的: 探讨凋亡相关蛋白 P53、Bcl-2 和增生细胞核抗原 (PCNA) 在胃癌前病变不同转归中的作用以及在胃癌早期诊断中的意义.

方法: 采用免疫组化 (LSAB) 法检测 52 例胃癌患者癌前病变组织标本及 56 例非胃癌患者组织标本的 P53、Bcl-2 和 PCNA 的表达.

结果: 发生癌变者与 P53、Bcl-2 和 PCNA 阳性强度有密切关系; PCNA 标记指数 (PCNA LI) 在癌变组表达明显高于非癌变组, 差异有显著性 ($t=5.261$, $P<0.01$); 在癌变组, 88.5 % 的病例有单一或多种基因表达异常, 51.9 % 为两种或两种以上基因同时表达, 与非癌变组相比有显著性差异 ($\chi^2=4.393$, $P<0.05$).

结论: 在胃癌发生过程中, P53、Bcl-2 表达强度明显增加, 细胞增殖活性升高, 且为多基因协同作用, 说明在胃癌演变过程中他们起重要作用.

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚. 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和 PCNA 的表达意义. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1219-1222
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1219.asp>

0 引言

胃黏膜的肠上皮化生和异型增生是胃癌发生过程中重要的癌前病变, 但并非所有的肠上皮化生和异型增生均演变为癌. 其具有双向转化的特点, 既可发展为癌, 亦可恢复正常. 胃癌的发生、发展是一个多基因变异累积逐渐演变的复杂过程, 包括癌基因的激活和抑癌基因的失活而导致无限制增生^[1,2], 同时, 肿瘤的发展与凋亡也有密切关系^[3-6]. 细胞增生与凋亡的失衡导致细胞的过度积聚, 可能是胃癌发生的病理基础^[7-9]. 为探讨癌相关基因在胃癌前病变不同转归中的作用, 我们检测了凋亡相关基因 P53、Bcl-2 以及增生细胞核抗原 (PCNA) 在发生和不发生癌变的中重度肠上皮化生及异型增生标本中的表达.

1 材料和方法

1.1 材料 癌变组: 在诊断胃癌之前, 与癌发生部位相同的黏膜活检病理诊断为中重度肠上皮化生 (18 例) 或中重度异型增生 (34 例) 的标本, 共 52 例, 均为男性, 年龄 60-79 岁 (平均 67.3 岁), 随访时间为 1-11.4 a (平均为 3.7 a). 非癌变组: 所有标本均取自与癌变组同期检查

的患者,经随访未发生癌变、且与癌变组年龄相当的病例,共56例,其中中重度肠上皮化生36例,中重度异型增生20例,均为男性,年龄为60-82岁(平均67.0岁),随访时间为1.8-11.9 a(平均6.8 a),明显长于胃癌组。抗P53单克隆抗体(DO-1)和抗Bcl-2单克隆抗体购于北京中山生物技术有限公司,PCNA单克隆抗体和LSAB试剂盒为DAKO公司产品。

1.2 方法 P53、Bcl-2蛋白表达及PCNA均采用免疫组化LSAB法检测。实验步骤按试剂盒说明书进行。阳性对照为已知阳性组织切片在同一条件下反应,阴性对照以正常兔血清代替第一抗体。结果判断:P53、Bcl-2结果按如下方法进行评分:(1)阳性着色程度:无着色为0,浅着色为1,深着色为2;(2)阳性着色范围:无着色为0,着色<1/3为1,着色>1/3为2,弥漫性着色为3。然后将以上两项相加为最后结果:阴性(-)为0,弱阳性(+)为2,阳性(++)为3-4,强阳性(+++)为5。PCNA计数用PCNA标记指数(PCNA LI): $LI = \frac{\text{PCNA阳性细胞数}}{\text{计数细胞总数}} \times 100\%$ 。按阳性细胞百分率分为4级:阳性细胞数<25%为(-),25-40%为(+),40-55%为(++),>55%为(+++)。

统计学处理 所得数据采用 χ^2 检验、t检验、秩和检验。

2 结果

2.1 不同转归胃组织间P53、Bcl-2的表达 P53阳性着色位于细胞核,呈棕黄色颗粒状。Bcl-2阳性着色位于细胞质,呈棕黄色。各切片显色分布不均,以片状和局灶性为主,少数为弥漫性分布。癌变组52例中,P53表达18例(34.6%),Bcl-2表达23例(44.2%),而在56例非癌变组中,P53表达16例(28.5%),Bcl-2表达20例(35.7%),P53、Bcl-2阳性率在癌变组与非癌变组间差异无显著性($P > 0.05$)。但P53在癌变组有6例表达为强阳性,而在非癌变组无强阳性表达;Bcl-2在癌变组有5例为强阳性表达,在非癌变组仅1例表达为强阳性。P53、Bcl-2表达强度在癌变组与非癌变组比较有显著性差异($P < 0.05$),以后发生癌变者与P53、Bcl-2阳性强度呈正相关(表1)。

表1 不同转归胃组织间P53、Bcl-2的表达

组别	n	P53				Bcl-2			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
癌变组	52	34	5	7	6	29	7	11	5
非癌变组	56	40	13	3	0	36	15	4	1

2.2 PCNA在不同转归胃组织间的表达 PCNA阳性着色位于细胞核,呈棕黄色细颗粒状。癌变组PCNA LI高于非癌变组,有显著性差异($t = 5.261$, $P < 0.01$);PCNA在癌变组阳性率为80.77%,明显高于非癌变组的55.36%,有显著性差异($u = 3.789$, $P < 0.01$),发生癌变与PCNA

阳性强度也呈正相关(表2)。

表2 PCNA在不同转归胃组织间的表达

组别	n	PCNA LI $\bar{x} \pm s$	PCNA			
			-	+	++	+++
癌变组	52	45.60 \pm 10.87 ^a	10	15	11	16
非癌变组	56	34.07 \pm 11.63	25	19	9	3

^a $P < 0.01$ vs 非癌变组。

2.3 不同转归胃组织与多种基因共表达的关系 在52例癌前病变中,46例有基因表达异常,且其中27例(51.9%)出现两种或两种以上基因同时表达,而在非癌变组,出现两种或两种以上基因同时表达为14例(25.0%),有显著性差异($\chi^2 = 4.393$, $P < 0.05$,表3)。

表3 不同转归胃组织与多种基因共表达的关系

组别	n	无基因表达异常(%)	基因表达异常		
			单基因	多基因	合计
癌变组	52	6 (11.5)	19 (36.5)	27 (51.9) ^a	46 (88.5) ^a
非癌变组	56	17 (30.4)	25 (44.6)	14 (25.0)	39 (69.6)

^a $P < 0.05$ vs 非癌变组。

3 讨论

正常人胃黏膜上皮组织更新较快,以细胞凋亡和增生维持着细胞总数的平衡,倘若这一平衡失常,就有可能导致许多疾病发生^[9]。细胞凋亡与细胞增生平衡的失调在胃癌的发生、发展过程中起重要作用^[3,6-8]。细胞凋亡受众多基因调控,其中最为重要的是Bcl-2家族和p53,这些基因的产物表达异常可促使细胞恶性增生并阻止细胞凋亡。p53基因的主要生物学功能是监护细胞基因的完整性,DNA受损时,p53基因编码产生的蛋白积聚,复制终止,利于DNA修复,如修复失败,则诱发细胞凋亡。p53基因的突变则丧失其功能,还具有促进细胞恶性转化的功能,导致细胞恶性增生。用免疫组化法可检出P53蛋白的异常表达且与p53基因突变有良好的相关性^[10]。p53基因的突变常见于胃癌中,且P53蛋白的异常表达与胃癌的进展及预后有关^[11-15]。在胃癌前病变中也有异常表达,多数研究结果认为p53基因突变于癌变后期才发生^[3,16,17],但也有人在肠化生阶段检测到p53基因突变,认为其属于胃癌变过程中的早期事件^[18,19]。在胃癌的组织发生过程中,肠上皮化生和异型增生均是胃癌发生、发展的一个重要阶段,而p53基因异常可能在胃黏膜肠上皮化生、异型增生及其癌变中起一定作用^[20-23]。本研究中,p53基因在癌变组和非癌变组中的阳性表达率分别为34.6%和28.5%,在癌变和未癌变之间无显著性差异,但在实验中发现,癌变组p53表达强度明显高于未癌变组,差异有显著

性意义, 提示 p53 阳性表达强度与发生癌变有关。

Bcl-2是目前公认的一种重要的调节细胞凋亡的基因^[24], 他的激活和过表达能抑制细胞正常的凋亡. Bcl-2 基因并不影响细胞的增生, 而是通过抑制细胞凋亡而延长细胞寿命, 从而增加了肿瘤发生的机会并促进肿瘤的发展. Bcl-2 表达与胃癌发生有关^[25-30]. 本实验显示, Bcl-2在癌变组和未癌变组中的阳性表达率分别为 44.2 %和 35.7 %, 在是否癌变之间无显著性差异, 但进一步分析仍显示其表达强度与发生癌变有关。

肿瘤细胞的最基本特征是增生失控所致的持续不断的增生. PCNA 是一种核蛋白, 几乎所有处于增生状态的细胞核均有表达. 他是 DNA 合成酶 δ 的辅助蛋白, 为细胞合成 DNA 所必需, 细胞动力学研究表明其表达及合成与细胞增生周期有关, G₁ 期 PCNA 逐渐增多, S 期达高峰, 因此他能准确地反映细胞的生长速度和状态. 在肿瘤的发生过程中, 细胞增生活跃, 处于增生状态, 其 PCNA 表达明显增强, 且随着疾病的发展 PCNA LI 也逐渐增加^[31]. PCNA 阳性细胞的多少与肿瘤发展、预后均有密切关系^[32-35]. 本实验结果提示, 以后发展为胃癌的癌变组的 PCNA LI 增高明显, 与非癌变组相比有显著性差异, 且其与 PCNA 阳性强度相关. 说明胃癌患者在不典型增生和肠化生阶段细胞增长迅速, 增生活性已明显升高。

肿瘤的发生、发展是一个多阶段的过程, 往往是致病因素、多种癌基因或抑癌基因同时或先后协同作用的结果^[36,37]. 为此, 我们也进一步研究了 3 种基因相互之间出现阳性表达的相关性以及胃与胃癌发生的关系. 在癌变组, 88.5 %的病例有单一或多种基因表达异常, 51.9 %为两种或两种以上基因同时表达, 与非癌变组相比有显著性差异. 说明一个癌基因的激活或者抑癌基因的失活尚不足以引起细胞的恶性转化, 而需要两个或两个以上癌基因的激活或者抑癌基因的失活, 甚至还需要其他因素的参与才能促进肿瘤的形成。

胃癌前病变的演变是一个多因素参与的过程. 胃癌的发生涉及多种癌基因和抑癌基因的协同作用, 且与基因表达强度相关. 本实验中, 非癌变组与癌变组同属胃癌前病变, 基础病变相同, 虽截止到观察为止未发生癌变, 但仍不能排除以后恶变的可能, 特别是那些基因阳性表达程度强且(或)有多基因共表达者, 需密切随访, 警惕恶变。

4 参考文献

- 1 Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2002;17:323-329
- 2 Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35(Suppl 12):111-115
- 3 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, P⁵³ and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 4 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF- κ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis in-

- duced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
- 5 张学军, 郭礼和. 细胞凋亡失调与疾病关系的研究. *中华医学杂志* 1998;78:565-566
- 6 Tu SP, Zhong J, Tan JH, Jiang XH, Qiao MM, Wu YX, Jiang SH. Induction of apoptosis by arsenic trioxide and hydroxy camptothecin in gastric cancer cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2000;6:532-539
- 7 Xu AG, Li SG, Liu JH, Shen JG, Jiang B, Gan AH. Correlation between apoptosis and proliferation in gastric pre-carcinoma. *Natl Med J China* 1999;79:185-186
- 8 Pan CJ, Zhong P, Huang XR, Liu KY, Wang SX. Study on the correlation between proliferation and apoptosis in atrophy and intestinal metaplasia of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:143-146
- 9 Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998;54:151-162
- 10 Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Caronde Fromentel C, Gouyer V, Jacrot M, Brambilla C. Immunohistochemical study of P⁵³ in human lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:199-210
- 11 Kikuyama S, Inada T, Shimizu K, Miyakita M, Ogata Y. P⁵³, Bcl-2 and thymidine phosphorylase as predictive markers of chemotherapy in patients with advanced and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2149-2153
- 12 Meng FJ, Dai WS, Pan BR. P⁵³ genes expression and its correlation with metastasis and prognosis in gastric carcinoma. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1996;4:677-678
- 13 Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of P⁵³ protein expression for patients with gastric cancer-a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999;79:1255-1261
- 14 Zhang L, Fu HM, Jin SZ, Huang R, Zhou CG. Overexpression of P⁵³ and relationship between extracellular matrix and differentiation, invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:992-996
- 15 Liu XP, Tsushimi K, Tsushimi M, Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Sasaki K. Expression of P⁵³ protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma. *Pathol Int* 2001;51:440-444
- 16 Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN. Chronology of P⁵³ protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1995;36:848-852
- 17 Wu MS, Shun CT, Sheu JC, Wang HP, Wang JT, Lee WJ, Chen CJ, Wang TH, Lin TL. Overexpression of mutant P⁵³ and c-erbB-2 proteins and mutations of the p15 and p16 genes in human gastric carcinoma: with respect to histological subtypes and stages. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:305-310
- 18 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 19 Wang DX, Fang DC, Liu WW, Luo YH, LU R. Study on the loss of heterozygosity at YNZ22 gene and P⁵³ gene alteration in the gastric intestinal metaplasia. *Med J Chin PLA* 2001;26:36-38
- 20 Testino G, Cornaggia M. P⁵³ protein expression in epithelial high-grade dysplasia from the stomach. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:370-371
- 21 Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. P53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* 1994;144:511-517
- 22 李晓清, 郝丽萍, 张小丽, 龚飞跃, 郭惠学, 伍尤星. 胃黏膜不典型增生 P53 基因表达及其癌变率的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1216-1217
- 23 费素娟, 陈玉林, 林志发, 陈淑敏, 刘广珍. 胃癌及癌前病变 ras P21, P53 的表达意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:465-466
- 24 Chou HK, Chen SL, Hsu CT, Chao YC, Tsao YP. Bcl-2 accelerates retinoic acid-induced growth arrest and recovery in human gastric cancer cells. *Biochem J* 2000;348(Pt 2):473-479
- 25 戴洁, 于淑霞, 祁晓莉, 簿爱华, 许永利, 郭中英. Bcl-2, c-myc 蛋白在胃癌前病变、胃癌中的表达. *华人消化杂志* 1998;6(特刊 7):494-495
- 26 Walker C, Robertson L, Myskow M, Dixon G. Expression of the BCL-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 1995;72:164-169
- 27 Wang YK, Ji XL, Ma NX. Expressions of P⁵³, Bcl-2 and c-erbB-2 genes in precarcinomatous gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:114-116

- 28 Inada T, Kikuyama S, Ichikawa A, Igarashi S, Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18:2003-2010
- 29 Muller W, Schneiders A, Hommel G, Gabbert HE. Prognostic value of BCL-2 expression in gastric cancer. *Anticancer Res* 1998;18:4699-4704
- 30 Gao HJ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Lü XZ, Zhao ZQ, Xiao SD. Expression and mutual relationship of tumor suppression gene and apoptosis regulating gene in gastric carcinoma and paracancerous tissues. *Chin J Dig* 2000;20:178-181
- 31 Chiang CP, Lang MJ, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Hahn LJ, Kuo MY. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. *Oral Oncol* 2000; 36:353-359
- 32 Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased proliferative activity caused by loss of p21(WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94: 2107-2112
- 33 Konno S, Takebayashi Y, Aiba M, Akiyama S, Ogawa K. Clinicopathological and prognostic significance of thymidine phosphorylase and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *Cancer Lett* 2001;166:103-111
- 34 Maeda K, Chung YS, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Yamada N, Kondo Y, Sowa M. Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis. *Cancer* 1994;73:528-533
- 35 吴华星, 赵玉兰, 潘林娜, 武春龙, 冯占军. 内镜下胃癌活检标本 PCNA 的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:92-93
- 36 李建国, 王春连, 黄国帆, 黄晓川. 癌基因、抑癌基因产物在肺癌组织中的表达. *肿瘤* 1998;18:278-279
- 37 Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* 1995;75(6 Suppl): 1410-1417

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

• 临床经验 •

一氧化碳中毒伴筋膜间隙综合征的综合治疗

郭淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰

郭淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰, 中国人民解放军解放军第 465 医院消化内科 吉林省吉林市 132013

项目负责人: 郭淑杭, 132013, 吉林省吉林市大街 5 号, 中国人民解放军解放军第 465 医院消化内科.

电话: 0432-6950781 传真: 0432-6950613

收稿日期: 2003-04-03 接受日期: 2003-05-19

摘要

目的: 根据一氧化碳(CO)中毒后出现筋膜间隙综合征的发病机制, 探索有效、可行的治疗方法.

方法: 在治疗原发病的基础上, 结合临床表现给予制动、脱水、改善微循环、抗炎等综合治疗.

结果: 本组 14 例经治疗后意识全部转清. 12 例肿胀肢体感觉和运动恢复正常, 2 例出现痛觉, 肾功能未完全恢复, 运动功能未恢复出院而失访. 9 例张力性水泡全部治愈.

结论: 根据 CO 中毒后出现筋膜间隙综合征临床表现的不同给予制动、脱水、改善微循环、抗炎等综合治疗, 是一种有效、可行的治疗方法.

郭淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰. 一氧化碳中毒伴筋膜间隙综合征的综合治疗. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1222

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1222.asp>

0 引言

筋膜间隙综合征系肢体创伤后在肢体特定的筋膜间隙内的进行性病变, 既有间隙内容物的增加, 压力增高, 致使间隙内容物主要是肌肉与神经干发生进行性缺血性坏死. 筋膜间隙综合征是四肢急性创伤的严重合并症之一. 在战时和平时均可见到, 但 CO 中毒自体压伤所致的筋膜间隙综合征并不多见, 临床医生往往忽视其检查和治疗而导致严重后果. 我院收入的 CO 中毒伴筋膜间隙综合征患者 14 例, 现报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料 本组 14 例, 男 9 例, 女 5 例; 年龄 22-41 岁, 平均 35 岁, 受伤部位均为四肢, 昏迷 14 例、尿便失禁 13 例, 尿失禁 1 例, 一侧上下肢同时受累 3 例, 单侧肢体受累 11 例, 伴有张力性水泡 9 例. 临床表现主要是畏寒、高热、受伤肢体剧痛, 局部肿胀严重, 皮肤苍白, 发亮, 紫绀, 有大小不等的张力性水泡, 触之湿冷, 有异样紧张感. 肢体远端感觉障碍、运动麻痹, 足背动脉搏动减弱或消失, 伸屈伤肢时受累肌群有剧烈疼痛. 实验室检查白细胞总数及中性粒细胞增高, 重

者肾功能有改变、血钾增高.

1.2 方法 对 CO 中毒伴有筋膜间隙综合征患者, 在治疗原发病的基础上, 立即给予肢体制动、20 % 甘露醇 250 mL 加 654-2 10 mg 快速静滴, 体外反搏治疗, 同时应用抗生素抗感染、密切观察病情变化, 做好手术准备, 如病情不缓解, 立即行筋膜切开减压. 病情较重者注意保护肾功能, 必要时给予血液透析治疗. 纠正水和电解质平衡紊乱. 有水泡者局部换药、抗炎治疗.

2 结果

本组 14 例经治疗后意识全部转清. 12 例肿胀肢体感觉和运动恢复正常, 2 例出现痛觉, 肾功能未完全恢复, 运动功能未恢复出院而失访. 9 例张力性水泡全部治愈.

3 讨论

在 CO 中毒后, 肢体可因固定体位而长时间受压, 尤其昏迷患者, 使受压肢体静脉回流障碍, 渗出增加, 使筋膜间区内压增高, 发展为筋膜间区综合征. 对多间区的肌肉丰富部位的筋膜间隙综合征不仅是局部表现, 还可出现全身反应, 故应引起重视, 我们报告的 14 例 CO 中毒患者都因意识障碍, 长期固定体位而造成肢体肿胀、剧烈疼痛、活动受限. 其中 12 例肢体制动、密切观察, 临床症状无进展. 经过 7-5 d 的治疗, 受累肢体肿胀消失, 感觉和运动完全恢复正常. 其余 2 例入院时发现一侧上肢肿胀, 但未引起重视, 直到出现高血钾, 急性肾功能衰竭才立即行筋膜切开减压, 部分肌肉已变黑. 如再不行筋膜切开减压, 大量肌肉将坏死. CO 中毒的患者出现筋膜间隙综合征在临床上少见, 1950 年以来对本病屡有报道, 但仍不为医师普遍认识, 内科医师往往注意 CO 中毒的抢救而忽视对肢体的检查和治疗, 延误了筋膜间隙综合征的诊断和治疗. 所以, 对 CO 中毒尤其是昏迷患者, 应注意躯干及肢体的检查, 如发现肢体肿胀, 应密切观察, 以早期诊断和治疗, 如临床症状不缓解立即行筋膜切开, 充分减压, 这对筋膜间区综合征的治疗和预后是非常重要的. 如果肌肉、神经缺血时间过长, 则会发生永久性功能丧失. 应在不同的阶段采取不同的治疗措施, 以综合治疗为主.

我们报告的 14 个病例中有 9 例出现张力性水泡. 我们认为, 在 CO 中毒时机体高度缺氧, 导致有氧代谢减少, 无氧酵解增加, 酸性代谢产物增多, 致使毛细血管扩张、通透性增强, 浆液渗出增多. 可能为 CO 中毒伴张力性水泡的发病机制.

汉防己甲素抑制肝癌细胞增生的作用

荆绪斌, 李 涛, 杨绮华, 郭光华, 胡 辉, 陈素钻

荆绪斌, 李涛, 杨绮华, 郭光华, 胡辉, 陈素钻, 汕头大学医学院第一附属医院消化内科 广东省汕头市 515041

荆绪斌, 男, 1961-11-18 生, 山东省平度市人, 汉族, 1996 年上海第二医科大学博士研究生毕业, 2000 年留学日本, 副教授, 主要从事肝硬化及肝癌防治的研究, 发表论文 12 篇。

项目负责人: 荆绪斌, 515041, 广东省汕头市长平路 57 号, 汕头大学医学院第一附属医院消化内科. xbjing@stu.edu.cn

电话: 0754-8520164

收稿日期: 2002-03-14 接受日期: 2002-05-24

Inhibitory mechanism on proliferation of hepatocellular carcinoma cell line by tetrandrine

Xu-Bin Jing, Tao Li, Qi-Hua Yang, Guang-Hua Guo, Hui Hu, Su-Zhuan Chen

Xu-Bin Jing, Tao Li, Qi-Hua Yang, Guang-Hua Guo, Hui Hu, Su-Zhuan Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China
Correspondence to: Dr. Xu-Bin Jing, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China. xbjing@stu.edu.cn
Received: 2002-03-14 Accepted: 2002-05-24

Abstract

AIM: To study the mechanism of tetrandrine (TTD) on proliferation and apoptosis of hepatic cell carcinoma (HCC) cell line.

METHODS: MTT colorimetry was used to evaluate the influence of TTD on proliferation of cells. Flow cytometry was used to test reactive oxygen species (ROS) levels in cells. Electrophoresis in 1.5 % agarose gels was used to assess the DNA ladder.

RESULTS: Proliferation rate of HCC cell line stimulated by 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ TTD at 24 h, 48 h, and 72 h was $90.1 \pm 1.0\%$, $77.5 \pm 2.0\%$, $70.2 \pm 2.9\%$ and $56.6 \pm 1.6\%$, $61.6 \pm 2.0\%$ and $47.2 \pm 1.9\%$, respectively ($F = 40.025$, $P < 0.001$). O_2^- and H_2O_2 generated by HCC cell lines incubated with 0, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ TTD for 2 hours were 35 and 24.5 %, 36.6 and 40.5 %, 63.2 and 84.6 %, respectively. Typical DNA ladder was observed after the cell line was incubated in 20 $\mu\text{mol/L}$ TTD for 48 hours.

CONCLUSION: TTD can induce the apoptosis of ROS of hepatic cell carcinoma cell line by generation of ROS in a dose dependent manner.

Jing XB, Li T, Yang QH, Guo GH, Hu H, Chen SZ. Inhibitory mechanism on proliferation of hepatocellular carcinoma cell line by tetrandrine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1223-1226

摘要

目的: 研究汉防己甲素(tetrandrine, TTD)对肝癌细胞的作用及其机制。

用及其机制。

方法: 采用MTT比色法观察了TTD对肝癌细胞增生的影响; 采用流式细胞仪法观察了TTD对肝癌细胞内活性氧的影响; 采用琼脂凝胶电泳法观察了DNA片断化的梯形条带。

结果: 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ TTD 作用于肝癌细胞系 24, 48, 72 h 后其增生率分别为 $90.1 \pm 1.0\%$ and $77.5 \pm 2.0\%$, $70.2 \pm 2.9\%$ and $56.6 \pm 1.6\%$, $61.6 \pm 2.0\%$ and $47.2 \pm 1.9\%$ ($F = 40.025$, $P < 0.001$); 0、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ TTD 作用于肝癌细胞系 2 h 后 O_2^- 为 35 %、36.6 %、63.2 %; H_2O_2 为 24.5 %、40.5 %、84.6 %。48 h 后 20 $\mu\text{mol/L}$ TTD 组肝癌细胞出现典型的凋亡表现。

结论: TTD 能够通过诱导肝癌细胞内活性氧的产生, 而引起细胞凋亡, 呈明显的剂量依赖性。

荆绪斌, 李涛, 杨绮华, 郭光华, 胡辉, 陈素钻. 汉防己甲素抑制肝癌细胞增生的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1223-1226
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1223.asp>

0 引言

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一^[1-9], 发病率在恶性肿瘤中居第二位. 因为起病隐匿, 病情发展迅速, 临床诊断时多为中晚期, 化学治疗仍是重要的治疗手段之一, 许多化疗药物如 5-FU、阿霉素、顺铂、长春新碱等通过细胞凋亡的途径杀死肿瘤细胞^[10-25], 但其毒副作用及多药耐药限制了其临床应用. 恶性肿瘤细胞凋亡的研究不仅对认识肿瘤的发病机制有积极意义, 而且在肿瘤治疗及预后方面具有重要意义. 汉防己甲素(tetrandrine, TTD)是传统中药汉防己中的主要成分, 近年研究证实, 其具有抑制肿瘤细胞增生的作用^[26-31]. 我们探讨了 TTD 对肝癌细胞作用的可能机制, 为防治肝癌探索新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 汉防己甲素和噻唑蓝(MTT)购于 Sigma 公司; DMEM 培养基购于 Gibco 公司; 核酸抽提试剂盒购于日本 Sepa Gene 公司; 2', 7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)和 Dihydroethidium (HE)分子探针 购于 Eugene, OR 公司. 人的肝癌细胞系 Mahlavu 被培养在含 100 mL/L 的胎牛血清(FCS; Gibco)、100 KU/L 青霉素(Gibco)和 100 mg/L 链霉素(Gibco)的 DMEM 培养液中; 培养条件为 37 °C、50 mL/L CO_2 /950 mL/L 空气。

1.2 方法 培养细胞长满单层后,用胰蛋白酶消化并混悬于含 100 mL/L FCS 的 DMEM 培养液中,调整细胞数为 2×10^7 /L,以每孔 100 μ L 加入 96 孔培养板中,置于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂/950 mL/L 空气的培养箱,24 h 后加入不同浓度的 TTD,并设对照组加入等量 DMEM(每组设 5 个复孔),继续分别孵育 24、48、72 h 后,加入 2 g/L 的 MTT 溶液 50 μ L,振荡后继续培养 4 h,于每孔内加入 DMSO 200 μ L,使形成的甲月赞 Formazan 充分溶解,用酶标仪(NJ-2300, Japan)双波长测定其 A 值,测定波长为 570 nm,参考波长为 630 nm. 酶标仪所示 A 值为 570 减去 630 nm,以消除非特异性光吸收效应 A 值换算成细胞增生率:实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ ^[24]. HE 是一个特异性的 O₂⁻ 染料^[33]; DCFH-DA 常用于检测细胞内 H₂O₂^[34]. HE 和 DCFH-DA 溶解于 DMSO,用 PBS 稀释成 5 μ mol/L 备用. 细胞被接种在 6 孔培养板中,生长至 90% 融合时,加入不同浓度的 TTD,1 h 后细胞被胰蛋白酶消化、PBS 洗涤 2 次,用流式细胞仪(becton dickinson, san jose, CA)检测细胞荧光强度. 在检测 30 min 前分别加入 5 μ mol/L 的 HE 和 DCFH-DA. 激发波长 488 nm,发射波长 530 nm. 将细胞数调整为 2×10^9 /L 接种到 100 mm 培养板中,生长至 90% 融合时,加入不同浓度的 TTD,48 h 后贴壁和黏附细胞被收集,采用硫氰酸胍/酚/氯仿法抽提核酸,按说明书进行. 抽提的 DNA 被悬浮在 70 mL/L 乙醇中,于 -20 $^{\circ}$ C 过夜后,高速离心 2 500 g,5 min 除去乙醇,再悬浮 DNA 于含 RNA 酶(Rnase, 100 mg/L, Sigma)的 Tris/EDTA 缓冲液 30 μ L,37 $^{\circ}$ C 2 h 孵育后,使用 15 g/L 凝胶电泳,1 h 后在紫外灯下观察细胞凋亡的 DNA 梯形条带.

2 结果

经 TTD 处理的肝癌细胞,在 24、48、72 h 后,其抑制效应与 TTD 剂量有良好的相关关系(图 1). 与对照组(图 2A)比较,TTD 10 μ mol/L 组(图 2B)和 20 μ mol/L 组(图 2C) O₂⁻ 和 H₂O₂ 阳性细胞百分比增加,20 μ mol/L 组增加明显. TTD 处理的肝癌细胞 20 μ mol/L 组 48 h 后引起了 DNA 片断化,出现了典型的梯形条带(图 3),这是细胞凋亡的晚期表现.

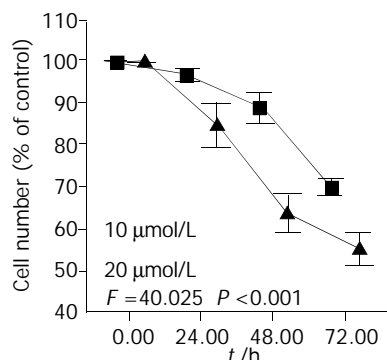


图 1 采用 MTT 比色法观察了 TTD 对肝癌细胞增生的影响,从 5 组实验数据中可知 TTD 对 Mahlavu 增生抑制呈时间和剂量依赖关系.

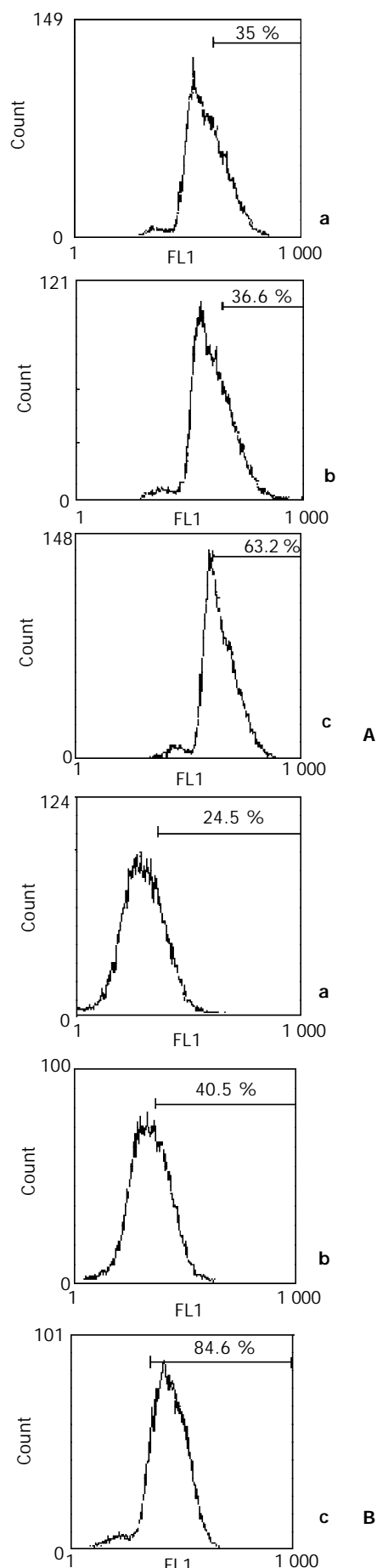


图 2 用 HE 和 DCFH-DA 染色检测细胞内 O₂⁻, H₂O₂. 细胞被接种在 6 孔培养板中,生长至 90% 融合时,加入不同浓度的 TTD 作用 2 h, (a 为对照, b 为 10 μ mol/L, c 为 20 μ mol/L), PBS 洗涤 2 次,用流式细胞仪检测细胞荧光强度,在检测 30 min 前分别加入 5 μ mol/L 的 HE 和 DCFH-DA.

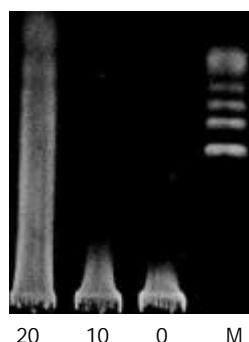


图3 TTD处理的肝癌细胞48h后引起了DNA片断化,在15g/L凝胶电泳中出现了典型的梯形条带。M为100单位碱基对标记组,带1为对照组,带2,3为TTD(10 μ mol/L and 20 μ mol/L)处理组

3 讨论

细胞凋亡是真核生物细胞最基本的生命过程之一,肿瘤生长是由于异常的细胞分裂和凋亡的失衡,肿瘤诱导分化中的细胞凋亡、肿瘤治疗中的细胞凋亡、肿瘤浸润中的细胞凋亡是近年研究的热点^[24, 25]。TTD对艾氏腹水癌细胞、小鼠淋巴细胞白血病细胞、小鼠肉瘤细胞、Burkitt淋巴瘤细胞等增生具有抑制作用^[35],其对肝癌细胞的作用及机制,尚未见报道。我们发现,TTD呈明显的剂量依赖性抑制肝癌细胞的增生、引起肝癌细胞DNA片断化,提示TTD可以诱导肝癌细胞的凋亡,从而抑制肝癌细胞的生长、增生。ROS是指氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物,其中含 O_2^- 、 O 、 OH 、 H_2O_2 等。生理状态下,机体产生的自由基与抗氧化防御系统处于相对平衡;在各种病理因子作用下,机体产生大量自由基,或机体抗氧化防御系统受到破坏,造成细胞结构和功能的破坏,诱导细胞凋亡的发生^[34]。ROS可能通过引起细胞脂质过氧化、损伤DNA分子或调节细胞凋亡相关基因而诱导凋亡^[35]。TTD作用于肝癌细胞后,在2 h内,迅速引起细胞内ROS的增加,48 h后20 μ mol/L TTD组出现DNA片断化,具有典型的梯形条带;10 μ mol/L TTD组未见明显梯形条带变化,具有明显的量效关系,提示TTD可能通过干扰细胞线粒体的功能而产生活性氧,进一步诱导肝癌细胞凋亡。

总之,本研究提示,TTD能够通过诱导细胞内活性氧的产生,而引起细胞凋亡,为临床应用TTD治疗肝癌细胞肝癌提供了理论依据,也为进一步寻找更有效的治疗药物提供了新的思路。

致谢:感谢日本兵庫医科大学第三内科波田寿一教授、上木升先生的指导。

4 参考文献

- 1 Zhao WH, Ma ZM, Zhou XR, Feng YZ, Fang BS. Prediction of recurrence and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after resection by use of CLIP score. *World J Gastroenterol* 2002;8:237-242
- 2 Tang ZY, Sun FX, Tian J, Ye SL, Liu YK, Liu KD, Xue Q, Chen J, Xia JL, Qin LX, Sun HC, Wang L, Zhou J, Li Y, Ma ZC, Zhou XD, Wu ZQ, Lin ZY, Yang BH. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with meta-

- static potential. *World J Gastroenterol* 2001;7:597-601
- 3 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
- 4 Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Chen J, Gao DM, Bao WH. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001;7:630-636
- 5 Li G, Ma HH, Lau GK, Leung YK, Yao CL, Chong YT, Tang WH, Yao JL. Prevalence of hepatitis G virus infection and homology of different viral strains in Southern China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1081-1087
- 6 Tang YC, Li Y, Qian GX. Reduction of tumorigenicity of SMMC-7721 hepatoma cells by vascular endothelial growth factor antisense gene therapy. *World J Gastroenterol* 2001; 7:22-27
- 7 Fan J, Wu ZQ, Tang ZY, Zhou J, Qiu SJ, Ma ZC, Zhou XD, Ye SL. Multimodality treatment in hepatocellular carcinoma patients with tumor thrombi in portal vein. *World J Gastroenterol* 2001;7:28-32
- 8 Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Zile MH. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2001;7:542-546
- 9 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001; 7:208-215
- 10 Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, Miyamoto A, Kondo M, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon alpha is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000;6: 2881-2890
- 11 Zhang YM, Zhao YQ, Pan YL, Shi YQ, Jin XH, Yi H, Fan DM. Effect of ZNRD1 gene antisense RNA on drug resistant gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:894-898
- 12 Huang Y, Horvath CM, Waxman S. Regrowth of 5-fluorouracil-treated human colon cancer cells is prevented by the combination of interferon gamma, indomethacin, and phenylbutyrate. *Cancer Res* 2000;60:3200-3206
- 13 Betticher DC, Hsu Schmitz SF, Totsch M, Hansen E, Joss C, von Briel C, Schmid RA, Pless M, Habicht J, Roth AD, Spiliopoulos A, Stahel R, Weder W, Stupp R, Egli F, Furrer M, Honegger H, Wernli M, Cerny T, Ris HB. Mediastinal lymph node clearance after docetaxel-cisplatin neoadjuvant chemotherapy is prognostic of survival in patients with stage IIIA pN2 non-small-cell lung cancer: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 2003;21:1752-1759
- 14 Sadzuka Y, Yamashita Y, Kishimoto S, Fukushima S, Takeuchi Y, Sonobe T. Glutamate transporter mediated increase of antitumor activity by theanine, an amino acid in green tea. *Yakugaku Zasshi* 2002;122:995-999
- 15 Northrup NC, Rassnick KM, Snyder LA, Stone MS, Kristal O, Cotter SM, Moore AS. Neutropenia associated with vincristine and L-asparaginase induction chemotherapy for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 2002;16:570-575
- 16 Misaki T, Iwata M, Iida Y, Kasagi K, Konishi J. Chemo-radio-nuclide therapy for thyroid cancer: initial experimental study with cultured cells. *Ann Nucl Med* 2002;16:403-408
- 17 Szmigielska-Kaplon A, Smolewski P, Najder M, Robak T. Evaluation of apoptosis induced in vitro by cladribine (2-CdA) combined with anthracyclines in lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 2002;81:508-513
- 18 Liu ZL, Onda K, Tanaka S, Toma T, Hirano T, Oka K. Induction of multidrug resistance in MOLT-4 cells by anticancer agents is closely related to increased expression of functional P-glycoprotein and MDR1 mRNA. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;49:391-397
- 19 Shimizu H, Fukuda T, Ghazizadeh M, Nagashima M, Kawanami O, Suzuki T. Molecular cytogenetic characteriza-

- tion of drug-resistant leukemia cell lines by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:902-910
- 20 Yuan S, Wang Y, Jiang S, Yang Y, Song Y, Chen X, Tu C. Study on chemosensitivity assay in vitro in the peripheral blood lymphocyte and the tumor cells. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2000;31:338-340
- 21 Baez F, Fossati Bellani F, Ocampo E, Conter V, Flores A, Gutierrez T, Malta A, Mendez G, Pacheco C, Palacios R, Sala A, Galimberti S, Cavalli F, Masera G. Treatment of childhood Wilms' tumor without radiotherapy in Nicaragua. *Ann Oncol* 2002;13:944-948
- 22 Markman M. Intraperitoneal antineoplastic drug delivery: rationale and results. *Lancet Oncol* 2003;4:277-283
- 23 Eton DT, Fairclough DL, Cella D, Yount SE, Bonomi P, Johnson DH. Early change in patient-reported health during lung cancer chemotherapy predicts clinical outcomes beyond those predicted by baseline report: results from eastern cooperative oncology group study 5592. *J Clin Oncol* 2003;21:1536-1543
- 24 Jiang S, Song MJ, Shin EC, Lee MO, Kim SJ, Park JH. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways. *J Hepatology* 1999;29:101-110
- 25 Huang M, Lin G. The study of innate drug resistance of human hepatocellular carcinoma Be17402 cell line. *J Cancer Lett* 1999;135:97-105
- 26 Ye ZG, Wang JH, Sun AX, Liang AH, Xue BY, Li CY, Wang L. Poteintation of vincristine-induced apoptosis by tetrandrine, neferine and dauricine in the human mammary MCF-7 multidrug-resistant cells. *Yaoxue Xuebao* 2001;36:96-99
- 27 Nortier JL, Vanherweghem JL. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Aristolochia fangchi). *Toxicology* 2002;181-182:577-580
- 28 Lee JH, Kang GH, Kim KC, Kim KM, Park DI, Choi BT, Kang HS, Lee YT, Choi YH. Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Int J Oncol* 2002;21:1239-1244
- 29 Fu LW, Zhang YM, Liang YJ, Yang XP, Pan QC. The multidrug resistance of tumour cells was reversed by tetrandrine in vitro and in xenografts derived from human breast adenocarcinoma MCF-7/adr cells. *Eur J Cancer* 2002;38:418-426
- 30 Ransom CB, Sontheimer H. BK channels in human glioma cells. *J Neurophysiol* 2001;85:790-803
- 31 Jin Q, Kang C, Soh Y, Sohn NW, Lee J, Cho YH, Baik HH, Kang I. Tetrandrine cytotoxicity and its dual effect on oxidative stress-induced apoptosis through modulating cellular redox states in Neuro 2a mouse neuroblastoma cells. *Life Sci* 2002;71:2053-2066
- 32 Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986;94:57-63
- 33 Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 1992;267:5317-5323
- 34 Gorman A, McGowan A, Cotter TG. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Letters* 1997;404:27-33
- 35 Song QZ, Baxter GD, Kovacs EM, Findik D, Lavin MF. Inhibition of apoptosis in human tumour cells by okadaic acid. *J Cellular Physiol* 1992;153:550-556

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

• 消 息 •

WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology® (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003 年由双月刊改为月刊, 加快刊出周期, 展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、*Hp* 等方面基础和临床研究的成果。

WJG 1998 年被美国科学引文索引(SCI-E)收录。SCI-E 收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外, 还收录论文的参考文献, 从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来, 也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点。作为一种比较客观和定量的评价方式之一, 已愈来愈受到科学界的重视。当 WJG 出版 20 天后, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998 年被美国《医学索引》(*Index Medicus* / MEDLINE)收录。WJG 电子版摘要及全文在印刷版出版前 15 天, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文, 包括彩色、黑白、线条图照片。世界胃肠病学杂志社将 WJG 和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在 www.wjgnet.com 上供国际和国内消化病学者免费使用。WJG 是惟一全面反映我国消化学专家研究成果的平台之一, 让世界更多的学者在 PubMed 或 www.wjgnet.com 上免费看到来自我国胃肠病学和肝病专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之, WJG 提供了一个与世界胃肠病学和肝病专家进行有效的学术交流平台, 促进消化病学研究成果的快速发展。

(世界胃肠病学杂志社)

美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系

苏 鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈 芳, 洪梅燕

苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕, 海南省工人医院消化内镜科 海南省海口市 570311

苏鲁, 男, 1953-04 生, 内蒙古科左后旗人, 蒙古族, 主任医师。

项目负责人: 苏鲁, 570311, 海南省海口市白水塘路 48 号, 海南省工人医院消化内镜科. lusuendoscopy@yahoo.com.cn

电话: 0898-66826177

收稿日期: 2002-11-11 接受日期: 2002-12-02

Relationship between histopathology and surface microstructure of colorectal polyps under chromo-magnifying endoscope with methylene blue

Lu Su, Hong-Zhen Pan, Jing-Biao Weng, Yi-Hua Xu, Fang Chen, Mei-Yan Hong,

Lu Su, Hong-Zhen Pan, Jing-Biao Weng, Yi-Hua Xu, Fang Chen, Mei-Yan Hong, Department of Digestive Endoscopy, The Worker's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, Hainan Province, China. Correspondence to: Dr. Lu Su, Department of Digestive Endoscopy, The Worker's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, Hainan Province, China. lusuendoscopy@yahoo.com.cn Received: 2002-11-11 Accepted: 2002-12-02

Abstract

AIM: To study the relationship between histopathology and the surface microstructure of colorectal polyps detected by the chromo-magnifying endoscopy with methylene blue.

METHODS: After 5 g/L methylene blue solution was sprayed to the surface of colorectal polyps, the normal mucosa and polypoid lesions were observed with the magnifying electronic colonoscope. The pit pattern of colorectal mucosa and polypoid lesion were recorded according to Kudo's criteria. Then the polyps biopsy specimen or resected samples were sent for histopathologic evaluation.

RESULTS: By conventional colonoscopy, 67 patients had 180 visible polypoid lesions, another 90 lesions with a size of 1-3 mm were discovered by chromoendoscopy with methylene blue. The detection rate of adenomatous lesion can be raised obviously by chromomagnifying endoscopy ($\chi^2=88.01$, $P<0.001$). The pit pattern of 270 polypoid lesions were classified into six categories. Two adenomas were type II (0.7 %); 203 polypoid lesions are type III_s (75.2 %), 49 adenomas (18.1 %) showed type III_L, low or moderate grade dysplasia were found in 7 cases; 11 adenomas displayed type IV (4.1 %), low grade dysplasia were found in 2 and 1 (9.1 %) mucosal carcinoma was discovered; 5 lesions showed type V_n (1.9 %), in which one was found moderate grade dysplasia, 2 (40 %) mucosal carcinomas were discovered. Each polyp was resected for histopathologic evaluation.

CONCLUSION: After the methylene blue was sprayed, type I pit pattern of normal mucosa can be observed clearly by the magnifying colonoscope, which consists of roundish pit, with a regular distribution. The agreement rate of the pit patterns of the adenomatous lesion under magnifying colonoscope and histological findings was 96.7 %. Magnifying colonoscope can improve the detection rate of adenomatous lesions and can confirm that there is no tumor tissue left.

Su L, Pan HZ, Weng JB, Xu YH, Chen F, Hong MY. Relationship between histopathology and surface microstructure of colorectal polyps under chromo-magnifying endoscope with methylene blue. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1227-1229

摘要

目的: 研究美蓝染色后用放大电子结肠镜观察结肠息肉的微观结构类型与组织病理学的关系。

方法: 使用 0.5 % 美蓝对电子结肠镜检查到有息肉的部位进行息肉及邻近的黏膜进行染色, 然后用放大电子结肠镜观察。按 Kudo's 标准记录正常结肠黏膜和息肉, 然后行活检或息肉电切术, 以便组织病理学评价。

结果: 本组共 67 人, 普通电子结肠镜检查发现息肉 180 颗, 经美蓝染色后又发现了 1-3 mm 大小的息肉 90 颗, 共计 270 颗息肉。放大结肠镜可明显提高腺瘤性病变的检出率, $P<0.001$ 。270 颗病变的隐窝类型分为 6 种, 呈 II 型者 2 颗 (0.7 %); III_s 型 203 颗 (75.2 %); III_L 型 49 颗 (18.1 %), 其中伴有轻、中度非典型增生者 7 颗; IV 型 11 颗 (4.1 %), 伴有轻度非典型增生者 2 颗、黏膜癌 1 颗 (9.1 %), V_n 共 5 颗 (1.9 %), 伴有中度非典型增生者 1 颗, 黏膜癌 2 颗 (40 %)。本组息肉均进行了电切术。

结论: 美蓝染色后用放大电子结肠镜可清晰地观察到结肠隐窝, 其大小一致, 呈圆形或椭圆形; 诊断为腺瘤性息肉与病理组织学的符合率为 96.7 %, 可明显提高息肉的检出率, 并可鉴别电切息肉术后残留的基底部是否残留腺瘤组织或癌灶。

苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕. 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1227-1229

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1227.asp>

0 引言

结肠镜的广泛使用, 使得早期结直肠癌的检出率明显提高^[1-6]。研究表明早期癌多由腺瘤性息肉转变而来^[7,8]。因

此, 如何发现小的腺瘤性息肉病变和及早发现癌变的腺瘤是提高早期癌检出率和治愈率的关键. 现报告我们使用放大电子结肠镜进行腺瘤性息肉检查及治疗的结果.

1 材料和方法

1.1 材料 经电子结肠镜确诊为结直肠息肉 67 例. 男 48 例, 女 19 例, 年龄 3-81, 平均 54 ± 17 岁. 放大电子结肠镜为日本富士能 EC-450ZH 型. 染色液为 5 g/L 美蓝溶液, 新鲜配制后使用.

1.2 方法 经电子结肠镜检查发现某段结直肠有息肉时, 用喷洒管喷洒 5 g/L 美蓝溶液 5-10 ml, 于息肉表面及其环周肠腔约 10-20 cm 长范围. 3 min 后进行放大电子结肠镜观察息肉的微细结构, 按 Kudo's^[9] 方法分型. 记录息肉部位、大小、肉眼分型. 对于 ≤ 3 mm 的息肉行活检病理学检查. 对于 >3 mm 的息肉待 3-7 d 后行息肉电切术, 取出标本全瘤做切片. 对于肉眼观察为山田 III 型或 IV 型的息肉, 在电切前仔细观察息肉头部及颈部微细结构有无差别, 电切时应切掉属于腺瘤部分的组织, 而留下染料为正常黏膜的部分. 对于腺瘤性

息肉合并轻 - 重度非典型增生者, 在电切术后 1-3 mo 复查结肠镜并用美蓝染色观察. 特别是电切息肉后的底部, 观察染色是否为正常黏膜.

2 结果

本组 67 例中单发息肉 26 例, 多发 41 例, 3 例合并有结肠癌. 普通电子结肠镜发现息肉 180 颗, 经美蓝染色后用放大电子结肠镜检查又发现了 1-3 mm 大小的息肉 90 颗, 共计 270 颗. 美蓝染色后放大电子结肠镜检查明显提高了息肉的检出率 ($P < 0.001$, $\chi^2 = 88.01$)^[10]. 息肉位于直肠 31.1%; 乙状结肠 24.4%; 降结肠 11.5%; 横结肠 24.8%; 升结肠 7.5%; 盲肠 0.7%. 肉眼观察为山田 I 型息肉 68.9%; 山田 II 型息肉 18.1%; 山田 III 型息肉 7.8%; 山田 IV 型息肉 5.2%. 正常黏膜染色后用放大电子结肠镜观察隐窝开口呈均匀一致分布的圆形或类圆形结构(图 1). 呈 II 型(图 2)者 2 颗(0.7%); III_s 型(图 3)者 203 颗(75.2%); III_L 型(图 4)者 49 颗(18.1%); IV 型(图 5)者 11 颗(4.1%); Vn 型(图 6)共 5 颗(1.9%), 美蓝染色后电子放大结肠镜观察与组织病理学关系详见表 1. 腺瘤

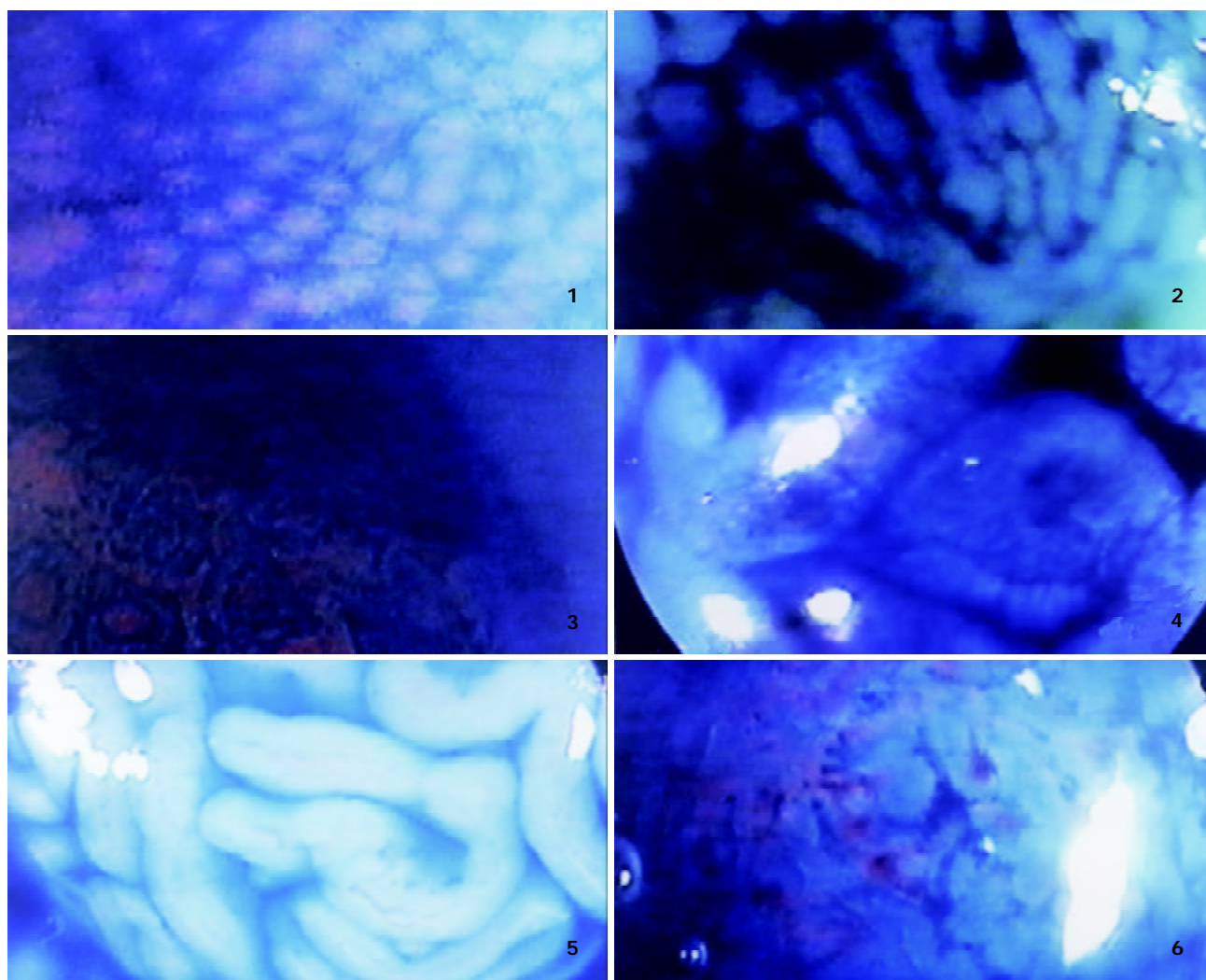


图 1 I 型: 正常结肠黏膜美蓝染色后可见隐窝呈圆形、分布规则、大小一致. 图 2 II 型: 染色后放大结肠镜观察见相对大的洋葱样隐窝. 图 3 III_s 型: 染色后放大结肠镜观察见小于正常黏膜的管状或类圆形隐窝. 图 4 III_L 型: 染色后放大结肠镜观察见大于正常黏膜的管状或类圆形隐窝. 图 5 IV 型: 染色后放大结肠镜观察见脑回状隐窝. 图 6 V_n 型: 染色后放大结肠镜观察见无结构型或类型不清隐窝.

性息肉大小与非典型增生及癌变的关系见表 2. 13 例腺瘤性息肉并非典型增生及癌变者, 于内镜电切术后 1-3 mo 行息肉残端染色放大电子结肠镜观察, 结果仅 1 例原为 30 mm 的息肉并中度非典型增生者, 其残端尚存 10 mm 大的腺瘤组织. 再次电切术, 术后未见再发. 其余患者病变残端均平坦, 美蓝染色后未见异常.

表 1 放大分型与组织病理学关系

放大分型	非瘤 <i>n</i>	腺瘤性 息肉 <i>n</i>	低度 非典型增生 <i>n</i>	中度 非典型增生 <i>n</i>	黏膜癌 <i>n</i>
II		2			
III _s	7	196			
III _L		42	5	2	
IV		8	2		1
Vn	1	1		1	2

表 2 腺瘤性息肉大小与非典型增生及癌变的关系 *n*(%)

息肉最大径	非瘤	腺瘤	轻非典	中非典	癌变
≥ 2 mm	1 (1.1)	89 (88.9)			
3 mm-	3 (2.6)	116 (96.6)			1 (0.8)
6 mm-	2 (5.0)	35 (87.5)	3 (7.5)		
10 mm-		5 (71.4)	2 (28.6)		
20 mm-	1 (9.1)	5 (45.5)	2 (18.2)	2 (18.2)	1 (9.1)
30 mm-	1 (33.3)			1 (33.3)	1 (33.3)

3 讨论

近来使用高分辨的电子结肠镜已使鉴别腺瘤性息肉成为可能^[11]或将 0.35 g/L 靛蓝液加压喷洒到结肠息肉表面, 观察其渗血与否来判断是否为腺瘤^[12], 其敏感性为 92 %, 大于普通结肠镜. 使用染色剂染色后再用放大结肠镜进行观察结肠黏膜隐窝形态对确定腺瘤性息肉更具有指导性意义^[13]. 靛蓝胭脂染色是一种色素对比法, 他可显示出黏膜微细的凹凸变性, 再用放大结肠镜观察, 可较准确地预测腺瘤性息肉^[14-19]、有无癌变^[20,21]以及确定早期结肠癌浸润的深度, 对于制定治疗方法的选择也有指导意义. 美蓝染色剂是一种可吸收色素, 而腺管开口不染色, 这样可清楚显示腺管开口形态, 根据其形态变化帮助鉴别病灶的性质. 我们介绍的美蓝染色并经放大结肠镜观察后见正常结肠黏膜隐窝呈一致类圆形开口, 其他染色后类型也清晰地表现出来, 并且与组织学病理的结果相当一致. 我们检查的腺瘤性息肉中 III_s 型占 75.2 %; III_L 型占 18.1 %, 其中伴有轻中度非典型增生者占 14.3 % (7/49); IV 型占 4.1 %, 其中伴有非典型增生 18.2 %, 早期癌占 9.1 %; V_N 型占 1.9 %, 其中伴有中度非典型增生占 20 %, 早期癌占 40 %. 此结果与既往的报告类似. 即随着染色类型从 III 至 V 型, 则早期癌的检出率逐渐增多. 由于染色放大观察对癌变的腺瘤有较易识别的特性, 因此, 也可用于多发息肉特别是息肉病患者检查癌变息肉提供准确的方法. 染色

后用放大结肠镜确定腺瘤性息肉的准确率达到 96.7 %, 说明在进行病理检查前可预测其组织学类型. 对于发现癌变的腺瘤也有较高的价值. 由于我国腺瘤性息肉癌变的组织病理学诊断标准与日本相比存在较大差异. 因此, 早期癌的检出率低于日本文献报告的结果. 这也是今后进一步深入研究的方向. 本结果显示经美蓝染色放大电子结肠镜检查后明显提高了 <3 mm 的腺瘤性息肉的检出率, 这对于发现小的腺瘤并及早治疗起到了关键的作用.

4 参考文献

- 于皆平, 董卫国. 大肠癌早期诊断的现状. 世界华人消化杂志 1999; 7:553-554
- 吴云林, 范嵘. 变焦扩大内镜诊断结直肠癌. 世界华人消化杂志 2000;8:98-99
- 苏鲁. 中国消化内镜治疗水平现状. 世界华人消化杂志 2002;10: 252-257
- 韩英. 大肠癌早期内镜的诊断. 世界华人消化杂志 2001;9:789-790
- 李世荣. 大肠癌的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2001;7:780
- 王燕斌, 杨昭徐. 大肠癌的常规诊断. 世界华人消化杂志 2001;9: 792-793
- 吕愈敏, 顾芳, 李改英, 林三仁, 周丽雅. 早期大肠癌的内镜治疗. 中华消化内镜杂志 2000;17:134-136
- 杨天赐, 陈宝英, 孙木泉, 林淑惠, 刘麒麟, 施至乾, 赖亚栋. 大肠腺瘤性息肉 766 例分析. 中华消化内镜杂志 2001;18:92
- Kudo S, Rubio CA, Teixeira CR, Kashida H, Kogure E. Pit pattern in colorectal neoplasia: endoscopic magnifying view. *Endoscopy* 2001;33:367-373
- 上海第一医学院卫生统计教研组. 医学统计方法. 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1979:128-129
- Eisen GM, Kim CY, Fleischer DE, Kozarek RA, Carr-Locke DL, Li TC, Gostout CJ, Heller SJ, Montgomery EA, Al-Kawas FH, Lewis JH, Benjamin SB. High-resolution chromoendoscopy for classifying colonic polyps: a multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2002;55:687-694
- Kanamori T, Itoh M, Yoshimi N. Pressuredye-spray: a simple and reliable method for differentiating adenomas from hyperplastic polyps in the colon. *Gastrointest Endosc* 2000;55: 695-700
- Kudo S, Tamura S, Nakajima T, Yamano H, Kusaka H, Watanabe H. Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1996;44:8-14
- Kiesslich R, Von Bergh M, Hahn M, Hermann G, Jung M. Chromoendoscopy with indigocarmine improves the detection of adenomatous and nonadenomatous lesions in the colon. *Endoscopy* 2001;33:1001-1006
- Szaloki T. Indigo carmine contrast staining in combination with high resolution electronic endoscopy. *Orv Hetil* 2002; 143:25-29
- Togashi K, Konishi F, Ishizuka T, Sato T, Senba S, Kanazawa K. Efficacy of magnifying endoscopy in the differential diagnosis of neoplastic and non-neoplastic polyps of the large bowel. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1602-1608
- 施华秀, 吴云林. 经放大电子结肠镜喷洒靛蓝胭脂对结直肠小息肉的鉴别价值. 中华消化内镜杂志 1999;16:135-137
- Jaramillo E, Watanabe M, Slezak P, Rubio C. Flat neoplastic lesions of the colon and rectum detected by high-resolution video endoscopy and chromoscopy. *Gastrointest Endosc* 1995; 42:114-122
- Matsumoto T, Iida M, Mizuno M, Shimizu M, Nakamura S, Fujishima M. In vivo observation of the ileal microadenoma in familia adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 3354-3358
- Tung SY, Wu CS, Su MY. Magnifyipg colonoscopy in differentiating neoplastic from noneoplastic colorectal lesions. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2628-2632
- Tamura S, Yokoyama Y, Tadokoro T, Higashidani Y, Kohsaki T, Onishi S. Depressed type submucosal invading colon cancer with type V pit pattern. *Gastrointest Endosc* 2001;53:340-341

肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变

张 蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田 力

张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科 陕西省西安市 710038

张蓉, 女, 1970-05-17 生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 主治医师, 讲师。

全军归国人员科研启动基金资助课题, No.6008

项目负责人: 闻勤生, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科。 zhangrong517@yahoo.com.cn

电话: 029-3377721 传真: 029-3377597

收稿日期: 2003-01-03 接受日期: 2003-02-18

Plasma levels of motilin, cholecystokinin and somatostatin and gastric electrical activity in patients with liver cirrhosis

Rong Zhang, Qin-Sheng Wen, Yun-Xin Huang, Hai-Feng Zhao, Li Tian

Rong Zhang, Qin-Sheng Wen, Yun-Xin Huang, Hai-Feng Zhao, Li Tian, Department of Gastroenterology of Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.

Supported by the Start-up Funds of Scientific Research for Returned Overseas Scholars of Chinese PLA, No.6008

Correspondence to: Dr. Qin-Sheng Wen, Department of Gastroenterology of Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. Zhangrong517@yahoo.com.cn

Received: 2003-01-03 Accepted: 2003-02-18

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of gastrointestinal dysfunction in patients with liver cirrhosis (LC) by determining the plasma levels of motilin (MTL), cholecystokinin (CCK) and somatostatin (SS) and gastric electrical activity.

METHODS: Plasma levels of MTL, CCK and SS were determined with radioimmunoassay in 38 LC patients and 30 healthy volunteers. Gastric electrical activities in all the 68 subjects were observed with the electrogastrograph (3 CPM, USA) before and after water load tests. The indexes of the gastric electrical activities included the percentage of frequency, the main frequency, the ratio of power of postprandial to preprandial, and the frequency spectrum analysis.

RESULTS: Compared with those in the control group, the levels of MTL and CCK in LC patients were increased (287 ± 81 ng/L. 3.3 ± 1.4 ng/L vs 131 ± 27 ng/L. 1.1 ± 0.5 ng/L. $P < 0.01$, $t = 11.150$, $n = 38$; $P < 0.01$, $t = 9.146$, $n = 38$). There was a significant difference between the levels of MTL and CCK with different liver functions ($P < 0.05$, $F = 87.570$; $P < 0.05$, $F = 47.506$). The levels of MTL and CCK tended to increase with the liver function from Child-Pugh A to B to C. The levels of SS in LC patients with Child-Pugh B and C liver function were increased, which showed a significant difference compared

with those in the control groups (67 ± 10 ng/L vs 28 ± 13 ng/L. $P < 0.01$, $t = 7.652$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = 9.428$, $n = 12$). But the levels of SS in the patients with Child-Pugh A were not apparently increased. At the same time, the degree of disorder of gastric electrical activity in the patients with Child-Pugh B and C of liver function was higher than that in the control group ($P < 0.01$, $t = -8.088$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = 7.697$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = -10.178$, $n = 12$; $P < 0.01$, $t = 9.817$, $n = 12$). The main frequency ($P < 0.01$, $t = -7.575$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = -11.623$, $n = 12$) and the ratio of postprandial power to preprandial power ($P < 0.01$, $t = -3.987$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = -4.330$, $n = 12$) in patients with Child-Pugh B and C of liver function were lower than that in the control group

CONCLUSION: The percentage of disorder of gastric electrical activity in LC patients is increased compared with that in healthy volunteers. The variation of the levels of gastrointestinal hormone is one of the important causes of gastrointestinal dysfunction in patients with liver cirrhosis.

Zhang R, Wen QS, Huang YX, Zhao HF, Tian L. Plasma levels of motilin, cholecystokinin and somatostatin and gastric electrical activity in patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1230-1233

摘要

目的: 通过测定肝硬化患者血浆胃动素(MTL)、胆囊收缩素(CCK)、生长抑素(SS)及其胃电的变化, 探讨肝硬化患者胃肠功能障碍的主要机制。

方法: 应用放免法分别测定38例肝硬化患者和30名健康志愿者空腹血浆 MTL、CCK 及 SS 浓度。采用美国 3CPM 胃电图仪观察所有入选者水负荷试验前后胃肌电活动情况, 观察指标包括频率百分比、主频、餐后和餐前功率比以及运行性频谱分析。

结果: 肝硬化患者 MTL、CCK 水平较对照组明显升高(287 ± 81 ng/L, 3.3 ± 1.4 ng/L vs 131 ± 27 ng/L, 1.1 ± 0.5 ng/L; $P < 0.01$, $t = 11.150$, $n = 38$; $P < 0.01$, $t = 9.146$, $n = 38$), 且不同肝功能状态时 MTL、CCK 水平之间差异显著($P < 0.05$, $F = 87.570$; $P < 0.05$, $F = 47.506$), 呈现 Child-Pugh C 级 > B 级 > A 级的趋势。血浆 SS 水平在 Child-Pugh B 级和 C 级患者明显升高, 与对照组差异显著(67 ± 10 ng/L vs 28 ± 13 ng/L; $P < 0.01$, $t = 7.652$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = 9.428$, $n = 12$), 而在 Child-Pugh A 级患者升高不明显。同时, Child-Pugh B 级, C 级患者胃电节律紊乱率明显高于对照组($P < 0.01$, $t = -8.088$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = 7.697$, $n = 16$;

$P < 0.01$, $t = -10.178$, $n = 12$; $P < 0.01$, $t = 9.817$, $n = 12$), 主频($P < 0.01$, $t = -7.575$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = -11.623$, $n = 12$)、餐后和餐前功率比($P < 0.01$, $t = -3.987$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = -4.330$, $n = 12$)低于对照组, 差异显著。

结论: 肝硬化患者胃电节律紊乱百分比较正常人明显升高。胃肠激素的变化是肝硬化患者胃运动功能障碍的重要原因之一。

张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力. 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1230-1233

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1230.asp>

0 引言

胃肠激素主要分布在消化系统和中枢系统, 有着很广泛的生物活性。作为全身最大脏器的肝脏, 不仅是多种胃肠激素的靶器官, 还是灭活降解许多胃肠激素的主要场所。胃肠激素与肝纤维化和肝硬化的关系早在 20 a 前就有学者开始关注, 尤以 MTL、血管活性肽(VIP)、SS 及促胃液素/促胆囊收缩素族等的研究较多。胃电图是利用腹部体表电极记录胃肌电活动的电信号, 通过对胃电幅值、频率百分比、主频及运行性频谱分析的研究以了解胃运动的情况。我们测定了肝硬化患者和健康对照组空腹血浆 MTL, CCK 及 SS 水平, 同时进行餐前、餐后胃电描记, 旨在结合胃肠激素和胃电的变化趋势更加合理的解释肝硬化患者胃运动异常的一些临床表现, 为临床诊治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 肝硬化组患者 38 例, 男 30 例, 女 8 例, 年龄 31-70(平均 45.5)岁, 诊断符合 2000 年西安第 10 次全国病毒性肝炎与肝病学术会议的标准。其中肝炎后肝硬化 34 例, 酒精性肝硬化 4 例。按肝功能 Child-Pugh 分级 A 级 10 例, B 级 16 例, C 级 12 例, 主要临床表现为纳差、腹胀、嗝气、上腹疼痛、恶心等症状。无上消化道大出血、肝性脑病、肝性肾病及恶性肿瘤, 观察前 1wk 内未使用过抑酸剂和促胃肠道动力药物。正常对照组 30 例, 男 18 例, 女 12 例, 平均年龄 38.5 岁, 均为 1 a 内无任何消化系统症状的志愿者, 肝功能及血清各型肝炎病毒标志物检测为阴性。

1.2 方法 所有入选人员均予清晨空腹抽血测定 MTL,

CCK 及 SS 浓度, 检测方法采用放射免疫分析法。检测试剂盒由海军放免中心提供, 具体操作过程严格按说明书由同一操作者进行。采用美国 3CPM 公司胃电图(EGG)仪进行胃电检测。入选者禁食一夜后, 于 EGG 记录开始 2 h 前摄入苹果汁 120 ml 和面包 2 片(总热量为 837.36 kJ), 然后再禁食 2 h。进行 EGG 记录前应按操作说明正确放置各个电极和连接胸带, 以提高胃电信号的信噪比。受试者置于安静环境, 避免说话、咳嗽及肢体的移动。记录大约 15 min 的餐前胃电活动, 采用水负荷试验(受试者喝水至感觉胃饱)刺激胃肌电活动, 并记录 30 min 餐后胃电活动。3CPM 胃电图仪电脑分析系统自动打印出相关检测资料: (1)EGG 信号 4 种频率的百分比: 过缓(1.0-2.5 次/min)、正常(2.5-3.75 次/min)、过速(3.75-10.0 次/min)及十二指肠肌电-呼吸频段(10.0-15.0 次/min); (2)运行性频谱分析; (3)某一频率段餐后和餐前功率比、主频及平均功率等。

统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本的 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析。采用 SPSS10.0 统计包进行数据处理。

2 结果

2.1 血浆 MTL, CCK 及 SS 浓度的变化 肝硬化患者空腹血浆 MTL, CCK 浓度明显高于对照组($P < 0.01$, $t = 11.150$, $n = 38$; $P < 0.01$, $t = 9.146$, $n = 38$)。随着肝功能的进行性减退 MTL 和 CCK 水平呈增加趋势, 且不同肝功能状态下二者浓度水平之间也存在显著差异($P < 0.05$, $F = 87.570$; $P < 0.05$, $F = 47.506$), 即 Child-Pugh C 级 > B 级 > A 级。血浆 SS 水平在 Child-Pugh B, C 级患者明显升高, 与对照组比较差异显著($P < 0.01$, $t = 7.652$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = 9.428$, $n = 12$), 而在 Child-Pugh A 级患者升高不明显(表 1)。

表 1 肝硬化患者血浆 MTL, CCK 及 SS 浓度变化 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

分组	<i>n</i>	MTL	CCK	SS
Child-Pugh A 级	10	204 \pm 22 ^b	2.4 \pm 1.0 ^b	30 \pm 9
Child-Pugh B 级	16	285 \pm 56 ^{bd}	3.2 \pm 1.0 ^{bc}	58 \pm 12 ^{bd}
Child-Pugh C 级	12	359 \pm 74 ^b	4.4 \pm 1.3 ^b	67 \pm 10 ^b
对照组	30	131 \pm 27	1.1 \pm 0.5	28 \pm 13

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs A, C 级。

表 2 肝硬化患者胃电各指标变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	餐前				餐后				餐后 / 餐前功率
		正常(%)	过缓(%)	过速(%)	主频	正常(%)	过缓(%)	过速(%)	主频	
A	10	54.5 \pm 11.3	32.1 \pm 9.0	10.0 \pm 7.8	2.9 \pm 0.6	58.8 \pm 14.2	27.4 \pm 8.5	10.2 \pm 8.6	2.8 \pm 0.5	4.9 \pm 3.8
B	16	36.5 \pm 5.4 ^b	49.3 \pm 9.2 ^b	10.9 \pm 7.3	2.0 \pm 0.5 ^b	33.9 \pm 9.9 ^b	52.3 \pm 13.6 ^b	9.9 \pm 9.2	1.9 \pm 0.4 ^b	0.9 \pm 0.8 ^b
C	12	29.8 \pm 10.5 ^b	56.8 \pm 32.7 ^b	9.9 \pm 9.8	1.5 \pm 0.4 ^b	20.4 \pm 13.2 ^b	56.8 \pm 10.1 ^b	19.6 \pm 4.9 ^b	1.4 \pm 0.3 ^b	0.5 \pm 0.5 ^b
D	30	56.8 \pm 12.8	30.3 \pm 11.1	10.4 \pm 3.2	3.1 \pm 0.4	61.8 \pm 11.3	25.1 \pm 12.3	9.9 \pm 6.4	3.0 \pm 0.4	5.3 \pm 6.5

^b $P < 0.01$ vs D (对照组)。

2.2 胃电变化 肝硬化患者餐前、餐后正常胃电节律百分比降低,胃动过缓节律百分比增加。其中 Child-Pugh B, C 级患者二者的变化与对照组比较差异显著($P < 0.01$, $t = -8.088$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = 7.697$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = -10.178$, $n = 12$; $P < 0.01$, $t = 9.817$, $n = 12$)。而 Child-Pugh A 级患者的变化不显著。Child-Pugh C 级患者餐后胃动过速百分比增加,与对照组比较差异显著($P < 0.01$)。Child-Pugh B, C 级患者餐前、餐后的主频均低于对照组($P < 0.01$, $t = -7.575$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = -11.623$, $n = 12$),餐后和餐前功率比下降,与对照组比较差异显著($P < 0.01$, $t = -3.987$, $n = 16$; $P < 0.01$, $t = -4.330$, $n = 12$ 表 2)。

3 讨论

肝硬化患者存在消化功能的减退及胃动力障碍,表现为上腹饱胀、嗝气、恶心及呕吐等症状^[1-3]。大多数研究表明,肝硬化患者存在餐后胃窦动力异常,胃固体和液体排空延迟^[4]。由于已知消化道的正常胃肌电活动受肌肉特性、神经及胃肠激素等多种因素调节,因此许多学者在观察到肝硬化患者胃动力异常的同时研究了多种胃肠激素的变化,发现肝硬化时血浆中多种肽类激素浓度均升高^[5,6]。我们测定了肝硬化患者血浆 MTL, CCK 及 SS 浓度较对照组升高,与多数文献报道一致。MTL 是消化间期的调节激素,诱发 MMC III 相胃的强烈收缩和小肠分节运动,在胃肠道起着“清道夫”的作用,同时促进胃窦、幽门、小肠和胆道运动的协调性^[7-10]。肝硬化时由于肝脏灭活能力和肾脏排泄功能下降、侧枝循环的作用以及因胃肠道瘀血水肿,消化间期胃肠动力减低,胃动素反馈性分泌增加而使血浆 MTL 升高。但高浓度 MTL 并未发挥正常的生理功能,推测与胃肠壁上 MTL 受体减少,对 MTL 敏感性降低有关^[11]。CCK 对胃运动调节有生理性意义,有文献报道:生理浓度的 CCK 对餐后胃运动有抑制作用,从而延缓胃排空^[12,13]。SS 对胃肠道内分泌、外分泌、小肠的吸收和运动具有广泛作用,对多种胃肠道激素分泌具有抑制作用,他能抑制 MTL 的释放,使 MTL 刺激胃内固体食物排空受影响从而抑制胃排空^[14,15]。肝硬化时 CCK 及 SS 浓度升高,其升高的原因也与激素灭活减少、侧枝循环作用等有关^[5,6,16]。在本实验中 Child A 级患者血浆 SS 水平升高不明显,推测是与样本较小有关系。研究表明,胃排空的动力是胃的收缩活动,胃十二指肠连接部的协调运动是胃排空的生理基础。正常胃电节律的破坏不仅影响胃的收缩,而且影响胃肠道不同部位收缩在时间和空间上的协调性,从而导致胃排空延迟。EGG 是检测胃肌电活动的一种体表非创伤性方法,他能反映胃肌电活动的节律和振幅变化。EGG 的主频可反映胃的慢波频率,决定着胃的最大收缩频率,餐前餐后振幅的相对变化与胃的收缩有关,而餐后餐前功率比反映的是餐后的胃动力。所以正常的胃电节律与正常胃动力有关,胃电节律紊乱与

胃动力障碍有较好的相关性,甚至可作为胃排空的一项有用的间接预测指标^[17-23]。本实验显示肝硬化患者胃电节律紊乱百分比正常人高,且肝功能愈差的患者,其胃电节律紊乱发生率愈高。我们观察到随着肝硬化患者胃动过缓百分比的增加,其主频多介于 1-2.5 cpm,而餐后餐前功率比较对照组明显减少,提示肝硬化患者尤以 Child B, C 级患者餐后胃排空能力明显下降,这与大多数文献报道一致。肝硬化患者胃电节律紊乱发生的机制^[24-31]:(1)肝功能受损后胆红素排泄障碍、各类激素灭活减少;(2)门脉高压导致胃肠道长期淤血缺氧,胃肠道平滑肌间神经元功能受阻,直接影响神经递质的传递;(3)肝硬化内毒素血症,血清中 NO 浓度升高导致胃排空延缓;(4)肝硬化患者易发生水、电解质紊乱从而影响胃肠道平滑肌的电生理特性也是原因之一。

4 参考文献

- 1 Wang SZ, Ma QJ, Chu YK, Wang JJ, Wang Q, Yao X. Effects of liver transplantation on gastric function and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:182-186
- 2 Sun DL, Sun SQ, Li TZ, Lu XL. Serologic study on extracellular matrix metabolism in patients with viral liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:55-56
- 3 Chang CS, Kao CH, Yeh HZ, Lien HC, Chen GH, Wang SJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric emptying in cirrhotic patients with symptoms of dyspepsia. *Hepatogastroenterology* 1999;30:3166-3171
- 4 Schoonjans R, Van Vlem B, Vandamme W, Van Vlierberghe H, Van Heddeghem N, Van Biesen W, Mast A, Sas S, Vanholder R, Lameire N, De Vos M. Gastric emptying of solids in cirrhotic and peritoneal dialysis patients: influence of peritoneal volume load. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;4:395-398
- 5 Junquera F, Lopez-Talavera JC, Mearin F, Saperas E, Videla S, Armengol JR, Esteban R, Malagelada JR. Somatostatin plus isosorbide 5-mononitrate versus somatostatin in the control of acute gastro-oesophageal variceal bleeding: a double blind, randomised, placebo controlled clinical trial. *Gut* 2000;46:127-132
- 6 Siegel EG, Seidenstucker A, Gallwitz B, Schmitz F, Reinecke-Luthge A, Kloppel G, Folsch UR, Schmidt WE. Insulin secretion defects in liver cirrhosis can be reversed by glucagon-like Peptide-1. *J Endocrinol* 2000;164:13-19
- 7 张航向, 任平, 黄熙, 李源. 中药对胃肠激素及胃肠运动的调节作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:1141-1144
- 8 Wang CD, Mo JZ, Xiao SD. Changes of gastric emptying and gut hormones in patients with active duodenal ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:948-950
- 9 Tang HW, Huang YX, Gao W. The relationship between dysfunction of gastric motility of dyspepsia and gastrointestinal hormones. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:694-697
- 10 Pan XZ, Cai LM. The status in quo of study of gastrointestinal hormones. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:464-466
- 11 Frossard JL, Spahr L, Queneau PE, Giostra E, Burckhardt B, Ory G, De Saussure P, Armenian B, De Peyer R, Hadengue A. Erythromycin intravenous bolus infusion in acute upper gastrointestinal bleeding: a randomized, Controlled, double-blind trial. *Gastroenterology* 2002;1:123
- 12 Zhu JZ, Chen DF, Leng ER. The effect of gastrointestinal peptides on gastrointestinal motility. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:687-688
- 13 Li W, Zheng TZ, Qu SY. Effect of cholecystokinin and secretin on contractile activity of isolated gastric muscle strips in guinea pigs. *World J Gastroenterol* 2000;6:93-95

- 14 Yao YL, Song YG, Zhang WD, Zhang DQ. Relationship between gastrin, somatostatin and functional disturbance of gastrointestinal tract. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1016-1017
- 15 Zhou YN, Peng GY, Wu J, Xu CP. Comparison of octreotide, vasopressin, and omeprazole in patients with acute bleeding portal hypertensive gastropathy: a controlled study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:197-200
- 16 Usami A, Mizukami Y, Onji M. Abnormal gastric motility in liver cirrhosis: roles of secretin. *Dig Dis Sci* 1998;43:2392-2397
- 17 Endo J, Nomura M, Morishita S, Uemura N, Inoue S, Kishi S, Kawaguchi R, Iga A, Ito S, Nakaya Y. Influence of mosapride citrate on gastric motility and autonomic nervous function: evaluation by spectral analyses of heart rate and blood pressure variabilities, and by electrogastrography. *J Gastroenterol* 2002;37:888-895
- 18 Maule S, Lombardo L, Rossi C, Crocella L, Masoero G, Della Monica P, Catalfamo E, Calvo C, Mecca F, Quadri R. *Helicobacter pylori* infection and gastric function in primary autonomic neuropathy. *Clin Auton Res* 2002;12:193-196
- 19 Wang J, Hou JY. Effect of granulae Li Wei on gastrointestinal activity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:377-381
- 20 Qi Q, Cao P, Han Y. The changes of electrogastragram and gastrointestinal pressure following cholecystectomy. *Zhonghua Waike Zazhi* 1998;36:611-613
- 21 Kamiy T, Kobayashi Y, Hirako M, Misu N, Nagao T, Hara M, Malsuhisa E, Ando T, Adachi H, Sakuma N, Kimura G. Gastric motility in patients with recurrent gastric ulcers. *J Smooth Muscle Res* 2002;38:1-9
- 22 Levy J. Use of electrogastrography in children. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:259-265
- 23 Punkkinen J, Pikkarainen P, Konkka I, Tujanmaa V. Effect of peritoneal dialysis on gastric myoelectrical activity in patients with chronic renal failure. *Dig Dis Sci* 2001;46:2651-2657
- 24 Zhao LF, Han DW. Clinical significance of endotoxemia in liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:391-393
- 25 Li BS, Wang J, Zhen YJ, Liu JX, Wei MX, Sun SQ, Wang SQ. Experimental study on serum fibrosis markers and liver tissue pathology and hepatic fibrosis in immuno-damaged rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1031-1034
- 26 Liu F, Liu JX, Cao ZC, Li BS, Zhao CY, Kong L, Zhen Z. Relationship between TGF- β 1, Serum indexes of liver fibrosis and hepatic tissue pathology in patients with chronic liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:519-521
- 27 Wang X, Zhong YX, Zhang ZY, Lu J, Lan M, Miao JY, Guo XG, Shi YQ, Zhao YQ, Ding J, Wu KC, Pan BR, Fan DM. Effect of L-NAME on nitric oxide and gastrointestinal motility alterations in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:328-332
- 28 Yokomori H, Oda M, Ogi M, Sakai K, Ishii H. Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. *Liver* 2002;22:150-158
- 29 Ozdogan O, Goren M, Ratip S, Giral A, Moini H, Enc F, Birsel S, Berkman K, Tozun N. Role of endothelin-1 in a cirrhotic rat model with endotoxin induced acute renal failure. *Hepatol Res* 2002;24:114
- 30 Ortiz MC, Fortepiani LA, Martinez-Salgado C, Eleno N, Atucha NM, Lopez-Novoa JM, Garcia-Estan J. Renal effects of the chronic inhibition of nitric oxide synthesis in cirrhotic rats with ascites. *Nefrologia* 2001;21:556-564
- 31 Sun DL, Sun SQ. The relationship between serum gastrointestinal hormone and gastroenteric kinetic malfunction in human hepatic cirrhosis. *Chin J Gastroenterol Hepatol* 1999;8:132-133

肠易激综合征 402 例发病时间分布及症状特征

许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华

许小幸, 李定国, 上海第二医科大学临床流行病学研究中心 上海市 200092
李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092

许小幸, 女, 1963-06-18 生, 浙江省临安县人, 汉族. 1985 年上海医科大学本科毕业, 第二军医大学在读硕士, 副教授. 主要从事临床流行病学研究. 上海市卫生局科技发展基金项目, No.01468

项目负责人: 许小幸, 200092, 上海市杨浦区控江路 1665 号, 上海第二医科大学附属新华医院临床流行病学研究中心. xuxiaoxing@sohu.com
电话: 021-65790000-5306 传真: 021-55571294

收稿日期: 2002-12-30 接受日期: 2003-01-16

Time cluster and symptom character of 402 outpatients with irritable bowel syndrome

Xiao-Xing Xu, Ding-Guo Li, Guang-Hui Song, Hui-Qing Zhou, Qing-Hua Liu

Xiao-Xing Xu, Ding-Guo Li, Center of Clinical Epidemiology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Ding-Guo Li, Guang-Hui Song, Hui-Qing Zhou, Qing-Hua Liu, Department of Gastroenterology of Affiliated Xin-Hua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Supported by the Scientific Development Foundation of Shanghai Health Bureau

Correspondence to: Dr. Xiao-Xing Xu, Center of Clinical Epidemiology, Xin-Hua Hospital, Shanghai 200092, China. xuxiaoxing@sohu.com

Received: 2002-12-30 Accepted: 2003-01-16

Abstract

AIM: To understand the time cluster regularity of the patients first caught by irritable bowel syndrome(IBS), and provide clue for further research on etiologic agents.

METHODS: According to diagnostic criteria of Rome II, 402 cases of IBS were investigated by questionnaire, and the onset month was analyzed with circular distribution.

RESULTS: The longest course of IBS was 54 years, and the average course was 7.62 years. There was no difference between males and females in course distribution ($\chi^2=2.35$, $P>0.05$). IBS is a seasonal disease with high occurrences in spring ($Z=31.78$, $P<0.01$). Males had high occurrences in March ($Z=18.37$, $P<0.01$), however females in April ($Z=16.55$, $P<0.01$). There was a significant difference between male and female in the onset month. In IBS patients, diarrhea predominance accounted for 36.6 %, and constipation predominance 18.4 %, and others 45.0 %. There was a significant difference in predominance between males and females ($\chi^2=7.77$, $P<0.05$). Abdominal pain was the most common symptom.

CONCLUSION: IBS has seasonal occurrence, so season is probably one of the influential factors of IBS.

Xu XX, Li DG, Song GH, Zhou HQ, Liu QH. Time cluster and symptom character of 402 outpatients with irritable bowel syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1234-1236

摘要

目的: 了解肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者首次发病时间分布规律, 为 IBS 进一步的病因研究提供线索.

方法: 对消化专科门诊就诊的符合罗马 II 诊断标准的 IBS 患者 402 例进行问卷调查. 对首次发病月份采用圆分布资料分析.

结果: IBS 患者的最长病程达 54 a, 平均病程 7.62 a, 男、女患者病程分布差别无显著性($\chi^2=2.35$, $P>0.05$). IBS 患者发病有季节性, 春季高发($Z=31.78$, $P<0.01$), 男性高发月份为 3 月份($Z=18.37$, $P<0.01$), 女性高发月份为 4 月份($Z=16.55$, $P<0.01$), 男、女性高发月份差别有显著性($t=3.32$, $P<0.01$). 患者中腹泻型占 36.6 %, 便秘型占 18.4 %, 其他占 45.0 %, 男、女亚型差别有显著性($\chi^2=7.77$, $P<0.05$); 腹痛是 IBS 最常见特征, 腹痛部位以左下腹最多, 其次为全腹痛, 再次为右下腹痛, 无单独的左上腹痛.

结论: 门诊 IBS 患者发病有季节高峰, 季节可能是 IBS 发病的影响因素之一.

许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华. 肠易激综合征 402 例发病时间分布及症状特征. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1234-1236

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1234.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)为消化内科门诊中常见的功能性疾病之一^[1,2]. 以往对 IBS 的发病率、患病率、人口学特征及可能的危险因素开展了较多研究^[3-23], 而对于同样有助于病因研究的时间分布特征缺乏研究资料. 我们对 IBS 患者首次发病时间和症状特征进行分析, 旨在了解 IBS 发病的时间分布规律、不同亚型的比例及症状特征, 为进一步的病因研究提供线索.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2002-01 上海第二医科大学附属新华医院消化内科门诊就诊的符合罗马 II 标准的 IBS 患者 402 例, 男 171 例, 女 231 例, 男女比 1:1.35. 年龄 18-84(平均 47 岁)(表 1).

1.2 方法 调查内容包括: (1)一般项目: 年龄、性别、职业、学历、婚姻状况等. (2)发病相关情况: 相同症状家族史、首次发病日期和影响因素、既往腹部手术

史和慢病史、生活习惯等。(3)症状有最近 1 a 中是否有 1/4 时间有腹痛, 每周腹痛天数, 腹痛部位、程度, 排便后是否缓解; 最近 1 a 中是否有 1/4 时间有腹胀, 每周腹胀天数, 腹胀部位、程度, 排便后是否缓解; 最近 1 a 中的大便习惯, 大便次数, 大便性状; 每周失眠天数, 精神状况, 结肠外症状(头痛、腰背痛、尿频尿急、痛经、嗝气反酸、烧心、恶心、呕吐、发热、厌食、消瘦等)。采用问卷调查, 调查员由消化道专科医师组成, 根据调查表内容逐项询问调查对象, 同时填写调查表。由于发病相关情况为回顾性资料, 受回忆偏倚的影响较大, 在病例的随访门诊中, 随机抽取了 40 例患者, 对该部分调查内容进行了第 2 次调查, 两次调查的符合率为 94.3 % ($\kappa=0.90$, $P < 0.01$)。

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件包对资料进行统计分析。计数资料组间比较用 χ^2 检验。平均病程采用中位数计算, 采用圆分布资料分析方法对首次发病月份的分布特征进行分析, 两样本平均数之间比较采用 Watson-William 检验法。

2 结果

2.1 IBS 患者一般情况 IBS 患者在年龄、职业、学历上的构成不同($\chi^2=10.25-13.15$, $P < 0.01$); 男性患者以 61 岁以上者所占比例最高, 女性患者以 41-50 岁者所占比例最高; 无论男女, IBS 患者均以非体力劳动者和离退休者多见, 并随着学历的增高, 所占比例增加。男、女性患者的婚姻状况差别无显著性($\chi^2=2.88$, $P > 0.05$, 表 1)。

表 1 IBS 患者 402 例一般情况比较

分析因素	男		女		合计		χ^2	P
	n	构成比(%)	n	构成比(%)	n	构成比(%)		
年龄(岁)								
18-	34	19.9	42	18.2	76	18.9		
31-	35	20.5	38	16.5	73	18.2		
41-	23	13.5	61	26.4	84	20.9	10.33	<0.01
51-	36	21.0	44	19.0	80	19.9		
61-84	43	25.2	46	19.9	89	22.1		
职业								
体力	44	25.7	29	12.6	73	18.2		
非体力	54	31.6	88	38.1	142	35.3	13.15	<0.01
离退休	48	28.1	85	36.8	133	33.1		
其他	25	14.0	29	12.5	54	13.4		
学历								
小学及以下	10	5.8	15	6.5	25	6.2		
初中	32	18.7	37	16.0	69	17.2		
高中	24	14.0	53	22.9	77	19.2	10.25	<0.01
大、中专	39	22.8	65	28.1	104	25.9		
大学及以上	66	38.6	61	26.4	127	31.6		
婚姻								
未婚	27	15.8	27	11.7	54	13.4		
状况								
初婚	131	76.6	177	76.6	308	76.6	2.88	>0.05
其他	13	7.6	27	11.7	40	10.0		
合计	171	100.0	231	100.0	402	100.0		

2.2 首次发病时间分布 IBS 患者的最长病程为 54 a, 平均病程为 7.62 a, 男性患者平均病程 7.34 a, 女性患者平均病程 7.87 a。男女患者病程分布差别无显著性($\chi^2=2.35$, $P > 0.05$, 表 2)。

表 2 402 例 IBS 患者首次发病年份(%)

年份(年)	病程(a)	男(%)	女(%)	合计(%)
2001-1997	<5	71 (41.52)	96 (41.56)	167 (41.54)
1996-1992	5-10	31 (18.13)	34 (14.72)	65 (16.17)
1991-1982	10-20	33 (19.30)	54 (23.38)	87 (21.64)
1981-1972	20-30	17 (9.94)	27 (11.69)	44 (10.95)
1971年前	≥ 30	19 (11.11)	20 (8.65)	39 (9.70)
合计		171 (100.00)	231 (100.00)	402 (100.00)

IBS 春季高发($Z=31.78$, $P < 0.01$), 男性高发月份为 3 月份($Z=18.37$, $P < 0.01$), 女性高发月份为 4 月份($Z=16.55$, $P < 0.01$), 采用 Watson-William 法检验, 男、女性高发月份平均数之间差别有显著性($t=3.32$, $P < 0.01$), (图 1)。

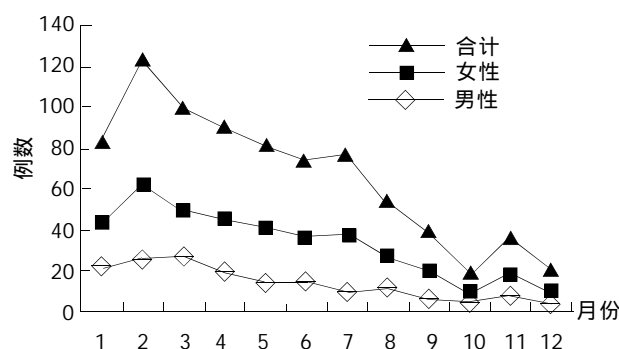


图 1 IBS 患者 402 例首次发病月份分布。

2.3 症状特征 根据每天大便次数, 将 IBS 患者分为腹泻型、便秘型、其他型。402 例 IBS 患者中, 腹泻型占 36.6 %, 便秘型占 18.4 %, 其他型占 45.0 %, 男女患者的病型分布差别有显著性, 女性患者腹泻型和便秘型均较男性患者多。腹痛是 IBS 患者的最主要症状, 有 93.0 % 的男性患者和 98.7 % 的女性患者均有腹痛。按 9 区分位进一步对腹痛部位进行分析发现, 左下腹痛者最多, 其次为全腹痛, 再次为右下腹痛, 无单独的左上腹痛。

3 讨论

随着生活水平和医疗技术的提高, 人们对生活质量的要求越来越高, 功能性疾病也越来越受到患者和临床的重视。由于在消化内科门诊所处理的患者中, IBS 患者占三分之一^[1]; IBS 虽不是致死性疾病, 但对生活质量的影响很大^[24]; 卫生经济研究表明, IBS 患者有较高的医疗费用^[25, 26]。鉴于以上三方面原因, IBS 已成为消化道功能性疾病的代表, 越来越受到胃肠病学专家及流行病学工作者的关注。IBS 患者的腹痛、排便不规则与季节关系密切, 但对发病的季节性变化规律尚无

研究资料. 本研究结果显示, IBS 患者发病有季节性, 表现为季节性升高, 全年均有发病, 高发季节在春季. 圆分布资料平均角计算结果表明, 高发季节男性在3月初, 女性在4月初(30° 为1 mo, 男性平均角为 95.6° , 女性平均角为 128.5°), 男性高发月份较女性早1 mo 左右, 经检验差别有显著性.

对于时间分布的描述, 由于就诊率受很多因素影响, 人群调查资料比医院门诊资料更有代表性. 但是, 医院门诊患者的就诊数量是人群中疾病发生数量的代表, 人群中疾病发生数量的多少肯定能在医院门诊中体现出来. 如果由于就诊率的影响, 使门诊患者的代表性产生了偏倚, 对于首次发病时间分布的研究, 这种偏倚的影响应该是均匀分布在1 a 的每个月中, 故本研究结果有代表性. 疾病的时间分布特征是一个能提供信息资料的极有意义的描述特征. 从时间角度看, 随着时间的推移, 病因的种类或分布会发生变化, 围绕人群的环境也在发生变化, 个体不同的状态也同样改变着人群的易感性. 所以研究疾病的时间分布是流行病学研究中最基本最重要的一个方面. 季节性升高的原因较为复杂, 主要与病原体、家畜的生长繁殖和野生动物、媒介昆虫的生活习性等有关, 也与人们的生活方式、生产、劳动条件、营养等因素有关. 前者大多表现为严格季节性, 既疾病只在某个季节发生, 且地区分布一般为农村高于城市; 后者大多表现为季节性升高. IBS的病因目前较为集中的有^[16-23, 27,28]: 社会心理(精神)因素、感染因素、神经内分泌因素、食物因素、遗传因素、药物因素等, 从IBS的发病有季节性升高的现象看, 精神因素、感染因素、神经内分泌因素、食物因素可能起着更重要的作用.

IBS 的平均病程为7.62 a, 这一病程可能比实际的自然病程长, 因为前来医院就诊的患者中, 以反复间歇性发作者为多. 有研究表明^[5], 症状的持续时间对预后不利影响, 尤其当症状持续超过5 a 时, 且女性患者的预后比男性差. 我们的研究资料没有得到同样结果, 门诊IBS男、女患者的病程分布差别无显著性. 腹痛是IBS患者最常见的症状. 人们一般认为IBS患者的疼痛应位于左下腹与痉挛性乙状结肠相对应. 本研究显示IBS患者的腹痛部位依次为左下腹、全腹、右下腹.

4 参考文献

- Wei X, Chen M, Wang J. The epidemiology of irritable bowel syndrome and functional constipation of Guangzhou residents. *Zhonghua Nei Ke Zazhi* 2001;40:517-520
- Russo MW, Gaynes BN, Drossman DA. A national survey of practice patterns of gastroenterologists with comparison to the past two decades. *J Clin Gastroenterol* 1999;29:339-343
- Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Wallander MA, Johansson S, Olbe L. Detection of colorectal tumor and inflammatory bowel disease during follow-up of patients with initial diagnosis of irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:306-311
- Saito YA, Schoenfeld P, Locke GR. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1910-1915
- Ruigomez A, Wallander MA, Johansson S, Garcia Rodriguez LA. One-year follow-up of newly diagnosed irritable bowel

- syndrome patients. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1097-10102
- Pan G, Lu S, Ke M, Han S, Guo H, Fang X. Epidemiologic study of the irritable bowel syndrome in Beijing: stratified randomized study by cluster sampling. *Chin Med J* 2000;113:35-39
- Icks A, Haastert B, Enck P, Rathmann W, Giani G. Prevalence of functional bowel disorders and related health care seeking: a population-based study. *Z Gastroenterol* 2002;40:177-183
- Barbezat G, Poulton R, Milne B, Howell S, Fawcett JP, Talley N. Prevalence and correlates of irritable bowel symptoms in a New Zealand birth cohort. *N Z Med J* 2002;115:220
- Lau EM, Chan FK, Ziea ET, Chan CS, Wu JC, Sung JJ. Epidemiology of irritable bowel syndrome in Chinese. *Dig Dis Sci* 2002;47:2621-2624
- Chen LY, Ho KY, Phua KH. Normal bowel habits and prevalence of functional bowel disorders in Singaporean adults: findings from a community based study in Bishan. *Singapore Med J* 2000;41:255-258
- Thompson WG, Heaton KW, Smyth GT, Smyth C. Irritable bowel syndrome in general practice: prevalence, characteristics, and referral. *Gut* 2000;46:78-82
- Thompson WG, Irvine EJ, Pare P, Ferrazzi S, Rance L. Functional gastrointestinal disorders in Canada: first population-based survey using Rome II criteria with suggestions for improving the questionnaire. *Dig Dis Sci* 2002;47:225-235
- Muller-Lissner SA, Bollani S, Brummer RJ, Coremans G, Dapigny M, Marshall JK, Muris JW, Oberndorff-Klein Wolthuis A, Pace F, Rodrigo L, Stockbrugger R, Vatn MH. Epidemiological aspects of irritable bowel syndrome in Europe and North America. *Digestion* 2001;64:200-204
- Reshetnikov OV, Kurilovich SA, Denisova DV, Zavyalova LG, Tereshonok IN. Prevalence of dyspepsia and irritable bowel syndrome among adolescents of Novosibirsk, western Siberia. *Int J Circumpolar Health* 2001;60:253-257
- Masud MA, Hasan M, Khan AK. Irritable bowel syndrome in a rural community in Bangladesh: prevalence, symptoms pattern, and health care seeking behavior. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1547-1552
- Ma H, Chen Y, Liu Y. An epidemiological study on the risk factors of irritable bowel syndrome in Zhanjiang, Guangdong province. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2001;22:452-454
- Kozma CM, Barghout V, Slaton T, Frech F, Reeder CE. A comparison of office-based physician visits for irritable bowel syndrome and for migraine and asthma. *Manag Care Interface* 2002;15:40-49
- O'Leary C, Wieneke P, Buckley S, O'Regan P, Cronin CC, Quigley EM, Shanahan F. Celiac disease and irritable bowel-type symptoms. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1463-1467
- Rana SV, Mandal AK, Kochhar R, Katyal R, Singh K. Lactose intolerance in different types of irritable bowel syndrome in north Indians. *Trop Gastroenterol* 2001;22:202-204
- Whitehead WE, Palsson O, Jones KR. Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders: what are the causes and implications? *Gastroenterology* 2002;122:1140-1156
- Pimentel M, Rossi F, Chow EJ, Ofman J, Fullerton S, Hassard P, Lin HC. Increased prevalence of irritable bowel syndrome in patients with gastroesophageal reflux. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:221-224
- Lustyk MK, Jarrett ME, Bennett JC, Heitkemper MM. Does a physically active lifestyle improve symptoms in women with irritable bowel syndrome? *Gastroenterol Nurs* 2001;24:129-137
- Boekema PJ, van Dam van Isselt EF, Bots ML, Smout AJ. Functional bowel symptoms in a general Dutch population and associations with common stimulants. *Neth J Med* 2001;59:23-30
- Luscombe FA. Health-related quality of life and associated psychosocial factors in irritable bowel syndrome: a review. *Qual Life Res* 2000;9:161-176
- Patel RP, Petitta A, Fogel R, Peterson E, Zarowitz BJ. The economic impact of irritable bowel syndrome in a managed care setting. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:14-20
- Boivin M. Socioeconomic impact of irritable bowel syndrome in Canada. *Can J Gastroenterol* 2001;15(Suppl B):8B-11B
- Osterberg E, Blomquist L, Krakau I, Weinryb RM, Asberg M, Hultcrantz R. A population study on irritable bowel syndrome and mental health. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:264-268
- Talley NJ, Howell S, Poulton R. The irritable bowel syndrome and psychiatric disorders in the community: is there a link? *Am J Gastroenterol* 2001;96:1072-1079

乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的研究进展

成 军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军,100039,北京市, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

编者按 关于乙型肝炎病毒(HBV)病毒的受体, HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 之间的整合及其后果, HBV 蛋白在肝细胞中与肝细胞蛋白之间的相互结合和相互作用, HBV DNA RNA 与肝细胞中蛋白的结合及其调节作用, HBV 蛋白对于肝细胞基因表达谱的影响等, 目前尚不十分清楚. 在 HBV DNV 克隆化完成之后, 立即确定了 4 个公认的开放读码框架(ORF), 但是 HBV DNA 中是否还会存在其他的 ORF, 这此, ORF 编码的蛋白究竟起什么样的作用, 一直是人们怀疑和探索的焦点.

中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心对于HBV DNV 基因组结构进行了系统研究, 发现了新的, ORF. 同时利用现代分子生物学技术, 发现并确立了羧肽酶 N(CPN)可以结合, HBV DNV 的核心启支子(CP)序列, 并证实这种结合可以显著提高, HBV CP 的转录活性. 利用酵母双杂交技术, 筛选获得了 HBV 不同蛋白结合蛋白的新基因, 为探索 HBV 在肝细胞中的生物学效应, 开辟了新的方向. 利用抑制性消减杂交(SSH)、基因芯片技术, 对于 HBV 基因编码的反式激活蛋白所作用的靶基因进行了筛选, 从而为 HBV 感染引起肝细胞癌(HCC)的分子生物学机制的研究提供了坚实的证据. 本专题研究对于进一步深入探索和研究 HBV 结构与功能、表达与调控, 以及 HBV 感染的发病的分子生物学机制的研究, 将产生重要的推动作用.

1	准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式.....	1238
2	乙型肝炎病毒X基因启动子结构及调节研究.....	1240
3	乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究.....	1242
4	羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究.....	1245
5	乙型肝炎病毒X蛋白反式激活作用的研究.....	1248
6	乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素A的调节研究.....	1250
7	乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节.....	1255
8	乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响.....	1258
9	乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响.....	1261
10	RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究.....	1264

准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式

成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚

成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚, 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

国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, No. C03011402

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. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚. 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式.

世界华人消化杂志 2003;11(8):1238-1240

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1238.asp>

0 引言

与其他的慢性病毒一样, 乙型肝炎病毒(HBV)与人类长期共存, 导致了彼此之间的相互适应. 针对HBV来讲, 为了生存, 就得不断进行适应生存环境的变化. 这种变化的内因是HBV DNA聚合酶不仅是DNA聚合酶, 而且还是前基因组RNA逆转录为子代DNA的逆转录酶. 这种逆转录过程和逆转录酶的活性, 因为不具备有效的校对功能, 因此可以产生众多的基因变异^[1]. 但是, 这些已经发生的基因变异并不是都能存活下来, 而是经过了外因的选择. 在进行有效的免疫预防之前, 在应用干扰素 α (IFN α)、拉米夫定等核苷类似物抗HBV治疗之前, HBV的生存仅仅是受到机体免疫系统的压力, 而目前HBV生存的环境则要经受更多的考验. 这些因素就是对HBV的选择压力. HBV在内因和外因的共同作用下生存, 这种生存环境的复杂性和不断变化, 造成了HBV基因的异质性(heterogeneity)与准种(quasispecies)的特点^[2-5].

1 准种的基本概念

无论核酸成分为RNA还是DNA的病原微生物, 在自身复制过程中由于RNA聚合酶或逆转录酶缺乏严密的自我校对功能, 或同时在感染宿主的免疫压力或抗微生物药物的选择压力下, 其核酸成分在少数位点上发生突变是长期以来存在的一种十分常见的现象. 在长期的生存环境中, 早期来源于同一个祖先的病原微生物, 因为这种突变现象的不断累积, 就可能发展为核酸成分差别很大的病原微生物群, 以致造成核酸序列的显著差别, 最终逐渐形成不同的基因型(genotype); 如果某些核酸序列位点的改变导致其编码产物抗原性的改变, 就逐渐构成了微生物不同的血清型(serotype). 这就是病原微生物基因型和血清型形成的基本过程^[6]. 但是, 对于感染单一病原体的具体患者来说, 在相对较短的时间内, 病原微生物核酸的突变则造成体内同时存有基因序列有微小差别的种群. 种群的各个成员之间, 其差别程度一般不会超过核苷酸总长度的2-5%, 这种差

别不足以构成病原体不同的基因型或血清型, 但又的确存在着基因序列的差别, 这种现象就称为准种^[7]. 关于病原微生物的准种现象, 早期是在一些RNA病毒核苷酸序列变化的规律中发现的, 但是目前认为在DNA病毒中也存在着这种所谓的准种现象. 不仅病毒基因组的变化存在准种的现象, 在幽门螺杆菌及其他一些病原微生物中也发现了准种. 看来准种的特点是病原微生物界一个普遍存在的现象.

2 乙型肝炎病毒的准种特点

关于病毒的准种特点的认识是从人免疫缺陷病毒(HIV)和丙型肝炎病毒(HCV)的研究中逐步形成的. 在慢性乙型肝炎病毒的感染中, HBV是否有准种现象, 一直没有引起人们的广泛关注. 我们的研究表明, 在慢性HBV感染患者中, 的确存在准种现象, 同时也得到了文献的证实. 我们首先研究了两个慢性HBV感染者血清中HBV DNA序列, 特别是相对保守的S基因区的核苷酸序列不均一性的特点. 设计了S基因(包括前-S1、前-S2和S区)的特异性引物, 以HBV慢性感染者血清提取物为模板, 以多聚酶链反应(PCR)技术扩增, 获得了1400 bp的DNA片段, 将这种扩增的DNA片段尽可能多地克隆到T载体中以实现克隆化, 分别获得了29和28个克隆. 当以EcoRI/XhoI进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析时, 在每1例患者中至少发现5种以上的表现形式, 这种RFLP特点经核苷酸序列的测定得到证实. 对于所得到的克隆进行序列分析, 结果表明每个克隆之间的序列不完全一样, 但同源性在98%以上, 遗传学上高度相关^[8-10]. 对于HBV其他的结构基因区如X基因、核心基因、逆转录酶区等以及调节基因区如SP1、SP2、CP和增强子基因序列的异质性进行研究, 都证实了HBV在慢性感染个体中是普遍存在的, 为慢性HBV感染者体内存在HBV DNA的准种特点提供了直接的分子生物学证据^[11-16].

3 乙型肝炎病毒基因异质性和准种研究的意义

关于HBV基因的异质性和准种特点的研究, 对于HBV生物学特性及临床研究都有十分重要的意义. 因为在此之前对于HBV的研究, 大多是以独立的HBV进行研究的, 而很少将HBV作为一个病毒的群体进行审视. 引入群体的概念, 替代个体的概念, 以不断变化的动态观念代替静态观念, 使我们对HBV的认识更加深入而全面.

第一, 在HBV基因的异质性和准种的研究中, 发现了HBV基因序列存在着各种不同类型的基因突变, 包括缺失突变、插入突变、碱基颠换突变、以及准种等多种类型. 提示HBV在其复制的DNA-RNA-DNA的过程中, 由于存在着转录与逆转录的过程, HBV DNA P又缺乏校对功能, 因而存在基因变异. HBV DNA发生变异, 一方面是HBV DNA复制过程中存在校对偏差, 这是HBV DNA序列异质性存在的根本原因, 其次还要

受到机体的免疫系统的选择力、抗病毒药物的选择压力等因素的影响, 变异是绝对的, 变异的程度和速度是相对的. 在研究中我们在外周血中还发现了具有反式激活功能的截短型表面抗原中蛋白缺失突变形式的存在, 这一点具有十分重要的生物学意义. 因为在此之前, 关于具有反式激活功能的表面抗原中蛋白羧基末端缺失突变体都是在HBV DNA阳性的肝细胞癌组织中发现的, 而在外周血中发现这种羧基末端缺失突变的HBV表面抗原中蛋白是第一次, 为慢性HBV感染引起的肝细胞恶性转化的机制研究, 提供了新的研究方向^[17, 18].

第二, HBV基因异质性与准种特点的研究, 有助于对HBV DNA全基因序列的认识. 早在1979年HBV研究者就克隆了HBV DNA的全基因序列, 随后也有一些研究陆续报道了不同基因型和不同血清型的HBV DNA的全基因序列, 从GenBank中收录的HBV DNA全基因序列达300株, 但是, 从研究方法上来说, 绝大部分的研究, 或者由于当时技术的局限性, 或者对于HBV准种特点认识不够, 都是分段克隆的, 然后根据重叠部分的序列, 人工拼接完成HBV DNA的核苷酸全序列. 这种HBV DNA的全序列虽然对于当时的HBV分子生物学研究起到了不可磨灭的推动作用, 但也存在着严重的缺陷. 如果把HBV DNA序列的准种特点考虑在内, 那么如果进行分段克隆时, 很可能得到来源于不同病毒基因的核苷酸序列, 每次克隆所采用的病毒模板是随机的, 很难通过控制实验条件保证扩增产物的模板来源于同一种病毒. 换句话说, 这样分段克隆的HBV DNA序列在自然界是不存在的, 这只是一种人工拼接的HBV DNA序列. 因此, 只有通过设计特异性引物, 做长距离PCR扩增, 一次获得全长的HBV DNA才能代表自然界存在的HBV DNA序列, 目前我们已经应用长距离PCR技术, 从HBV慢性感染者血清中获得了HBV DNA全基因序列. 这些HBV DNA的全基因序列已经被美国生物信息学研究中心建立的核苷酸数据库GenBank收录, 收录号为: AF363961、AF363962、AF363963、AF384371、AF384372. 虽然获得的HBV DNA全基因序列不一定就是该患者体内的优势HBV病毒株, 但却代表了真实存在的HBV DNA的全基因序列. 这种真正存在于自然界的HBV DNA序列的准确性是十分重要的, 目前关于HBV基因变异的研究及其临床意义得到了空前的关注, 但是HBV DNA序列的标准株或参考株是一个重要的前提, 真正全长的HBV DNA序列是一个重要的参考^[19-24].

第三, HBV基因异质性与准种特点的研究, 有助于全面理解HBV基因突变的特点和规律. 如果从准种这一角度来看HBV的基因变异, 因为很难控制所得到的HBV基因片段总是来源于同一个病毒株, 因此, 关于HBV基因突变及其生物学意义的研究方法应该谨慎选择. 如果仅仅是在病情变化前后或治疗前后, 对于少数的HBV基因片段进行序列分析, 然后据此做出

HBV基因突变的结论是不可靠的. 因为本来在血清中的HBV的基因序列就是不一样的, 如果不能保证在研究过程中总能保证扩增获得的HBV基因序列来源于同一个病毒株, 那么这种基因序列的比较是没有任何意义的, 更不能做出这种基因突变的任何生物学和临床意义的解释. 在我们看来, 随着HBV病毒自身的突变, 以及感染宿主免疫压力的筛选, 以及抗病毒药物的作用与筛选, HBV种群会发生漂变(shift), 而针对个体病毒的基因序列的改变的意义并不显著. 因此, 关于HBV准种概念的引入, 使我们对于HBV基因突变的规律的认识, 更加深刻而准确^[25-28].

第四, HBV基因异质性与准种特点的研究, 有助于研究和了解HBV DNA准种形成的原因以及与临床表现和转归之间的相互关系, 这是研究HBV DNA准种特点重要意义所在. 关于机体的免疫压力以及抗病毒药物的选择压力在HBV DNA准种形成过程中的地位和作用, 以及HBV DNA准种的形成与急性HBV感染的慢性化、慢性HBV感染的临床转归之间的相互关系的研究, 将为探索抗HBV感染的治疗方法研究提供重要线索. 在我们的初步研究中已经发现了处于相对优势的种群, 这是一种在机体免疫压力和抗微生物化疗药物选择压力下不断选择的结果. 在慢性HBV感染者体内, 随着机体免疫功能状态的不同, 特别是在应用不同的抗HBV化疗药物治疗以后, HBV的优势种群也发生变化, 这是HBV逃避机体免疫压力, 形成慢性HBV感染的重要机制之一^[29-33]. 研究慢性HBV感染的治疗方法, 除了研究机体免疫状态的动态变化以外, 也要重视HBV准种特点以及优势种群的形成规律.

4 参考文献

- 1 Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993;35:40-50
- 2 Li W, Ikematsu H, Yamaji TK, Chong Y, Hayashi J, Kashiwagi S. Hepatitis B virus genomes of chronic hepatitis patients do not contain specific mutations related to acute exacerbation. *Dig Dis Sci* 2001;46:2104-2112
- 3 Mutimer D. Hepatitis B virus antiviral drug resistance: from the laboratory to the patient. *Antivir Ther* 1998;3:243-246
- 4 Cane PA, Mutimer D, Ratcliffe D, Cook P, Beards G, Elias E, Pillay D. Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation. *Antivir Ther* 1999;4:7-14
- 5 Ngui SL, Hallet R, Teo CG. Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Rev Med Virol* 1999;9:183-209
- 6 Kojima N, Horiike N, Michitaka K, Onji M. In situ detection of mutated hepatitis B virus in microdissected, formalin-fixed liver tissues from patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1999;30:359-365
- 7 Ngui SL, Teo CG. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents. *J Viral Hepat* 1997;4:309-315
- 8 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. *中华内科杂志* 2000;39:838-839
- 9 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 李莉, 张国庆, 斯崇文. 乙型肝炎病毒C基因启动子区准种与变异特点的研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2002;16:264-266

- 10 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 11 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 12 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 13 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 14 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 15 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 16 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 临床肝胆病杂志 2002;18:17-19
- 17 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:233-236
- 18 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 19 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原 / 抗体同时阳性患者体内 S 基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 20 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:130-135
- 21 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 22 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 23 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 24 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 25 Dong J, Cheng J, Wang Q, Liu Y, Wang G, Shi S, Xia X, Shao Q, Si C. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:9-12
- 26 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶基因序列准种与变异特点的研究. 病毒学报 2001;17:270-272
- 27 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 28 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
- 29 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;26:882-885
- 30 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 31 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 32 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19:5-6
- 33 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs' 的反式激活作用. 国外医学病毒学分册 2000;7:190-193

乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究

邵清, 成军, 白雪帆

邵清, 成军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科 陕西省西安市 710038
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

邵清, 成军, 白雪帆. 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1240-1242

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1240.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染导致全球性健康问题, 目前全世界有 3.5 亿人感染 HBV, 约占全部人口的 6%。其中相当一部分感染者发展为慢性肝炎, 少数还发展为肝硬化甚至肝细胞癌(HCC), 至今仍缺乏有效控制^[1-4]。造成这一局面的原因多种多样, 其中关于 HBV 与肝细胞之间相互作用的分子生物学机制的研究进展相对滞后是严重影响新型治疗技术和新型药物开发与研究的重要原因之一。进一步弄清 HBV DNA 的复制、转录及调节的过程, 对于我们研究乙型肝炎的发病机制具有重要促进作用。既往研究关于 HBxAg 蛋白和 X 基因较多, 对于 X 启动子的研究较少, 本文仅就乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节近几年的研究进展作一综述。

1 乙型肝炎病毒基因组结构

HBV 是很小的包膜病毒。HBV DNA 和 HBV 聚合酶由核壳包裹成为核心颗粒, 再由含 HBsAg 的脂蛋白包裹。病毒基因组是部分双链 DNA 结构。双链的长度不等, 负链与病毒的 mRNA 互补, 较短的链为正链。HBV 基因组结构精密, 仅约 3 200 个 bp(3 182-3 221 nt, 3.2 kb), 但可以最小容量发挥高效功能。HBV 负链核苷酸序列至少有 4 个开放读框(open reading frame, ORF): C、P、S 基因(相当于逆转录病毒的 gag、pol 和 env 基因)分别编码核壳、聚合酶和外膜蛋白; 另一 ORF 因开始鉴定时对其基因产物的功能不明确而称 X。正链序列上似无保守序列。由双链 DNA 转录为 RNA, 是一个需要高度调节的过程。因而病毒基因组不仅含有编码蛋白的结构基因, 也有调节元件(regulatory element)。作为调节元件的一段 DNA 序列, 可与某些细胞蛋白或病毒蛋白结合, 正性或负性调节转录。分散在整个 HBV 基因组中有多个调节元件, 包括 4 种启动子、2 种增强子、包装信号、ε 糖皮质激素

素应答元件等^[5]. HBV 基因组分为结构基因序列和调节基因序列两大部分. 调节基因序列和结构基因序列相互重叠, 即使结构基因序列本身也有部分重叠, 因此, HBV 具有结构紧密的特点. HBV 序列是在 C、S I、S II 和 X 启动子控制下转录的. 除了表面抗原基因启动子 I (SP I), 所有其他启动子均缺乏 TATA 盒.

2 X 基因启动子结构及调节

X-ORF 在 1 374-1 837 nt 之间. adr 亚型有 27 bp 的缩短, 其基因产物反式激活增强子和启动子的转录功能^[6]. X 基因启动子(Xp)在 1 235-1 374 nt 区段, 调节转录 0.8 的 mRNA, 无 TATA 盒, 有不同的 5' - 端. Xp 的组织特异性不如 Cp 和 Sp 的严格, 可在肝细胞以外的组织中起转录调节作用. X 启动子调节编码 HBxAg 的 0.9 kb mRNA 转录^[6]. 这个可调节的转录位于转录开始位点前 140 nt. 并且这个最小的启动子与 3' - 末端的增强子 I 成分相重叠, 由 20 nt 组成^[7, 8]. 这个最小的启动子象大多数 HBV 启动子一样与增强子 I 的转录是分开的, 他缺乏通常的 TATA- 盒或 GC 丰富的序列结构^[9]. 但是, X 启动子包含了广泛结合的位点和肝特异性转录因子, 如调节作用蛋白 X 启动子结合蛋白(X-PBP)^[10] 结合位点. HBxAg 表达具有调节作用的转录包含顺式相互作用位点, 能与转录因子 NF1、C/EBP、ATF 和 AP1/Jun-Fos 结合. 而且肿瘤抑制基因产物 p53 可与之结合并抑制启动子功能^[11].

Zhang et al^[7]用瞬时转染分析的方法在不同的细胞系 Huh7、Hep3B、PLC/PRF/5、HepG2, 从去甲基化的肝细胞瘤细胞系 HepG2.1 和 HeLa S3 中测定了增强子 I 对 X 启动子的作用, 在不同的肝细胞瘤系和 HeLa S3 细胞系, 组合在 HBV 1 071 nt(-239)和 1 238 nt(-72)的增强子 I 可提高组合在 1 239 nt(-71)和 1 376 nt(+67)的 X 启动子超过 30 倍, 在去甲基化肝细胞瘤细胞系 HepG2.1 中大约为 10 倍, 在不同的肝细胞瘤细胞系中组合于 1 117 nt(-193)和 1 204(-106)增强子 I 亚种对于增强子 I 的功能是很重要的, 同时在所实验细胞系中组合于 1 222 nt(-88)和 1 238 nt(-72)的增强子 I 亚种需要增强子活性. 在所有的细胞系中最小的 X 启动子成分组合于 1 222 nt(-88)和 1 238 nt(-72)之间的 138 nt. 从 X 启动子开始的转录水平是细胞类型特殊机制.

Treinin et al^[8]将一系列的 X 基因上游质粒连接 CAT 基因, 转染细胞中标记的 CAT 基因表达实验证明 X 基因前序列中包含 1 个活动的启动子. 用引物延伸描绘 RNA 证明编码 RNA 是由 X 基因启动子起始的, 在乙肝病毒基因组 1 250-1 350 nt 的多个位点. HBV 增强子成分区域的缺失使 X 基因启动子活性下降, 提示 X 基因启动子需要增强子成分以达到最大活性.

Takada et al^[10]测定了一个 HBV X 基因 20 bp 的启动子序列, 并发现 1 个他的结合蛋白, 然后用瞬时表达技术测定从这 20 bp 启动成分开始的 X 基因转录受

HBxAg 蛋白和 p53 肿瘤抑制基因产物的影响程度. X 蛋白表达可促进 X 基因启动子的活性, 正常 p53 转染可抑制其活性. 另一方面, p53 基因突变体产物无抑制作用, 甚至 p53 对 X 基因转录的抑制作用由于 X 蛋白的共同表达而消失. 没有结合 X-PBP 的启动子仍对 X 蛋白和 p53 有应答, 提示 X 蛋白反式激活和 p53 抑制作用不依赖于 X-PBP 与启动子成分的结合. 实验数据提示在 X 基因转染的细胞中, X 蛋白可使正常 p53 蛋白结构破裂.

Nakamura et al^[11]用迁移率移动和胰脱氧核糖核酸酶印迹实验的方法鉴定出一种蛋白, 用氯霉素乙酰化酶(CAT)测定实验证实这个具有启动子活性的 16 bp (1 102-1 117 nt) 的结合位点在 X 基因中. 包含此结合位点的 58 bp (1 085-1 142 nt) DNA 片段可被 HBV 增强子增强. 用此 58 bp 的 DNA 片段作迁移率移动实验探针, 实验显示 1 105-1 112 nt 之间的回文结构被破坏后, 其丧失结合活性, 启动子活性也显著下降. 结合位点与已知的转录因子靶序列均不同. 因此认定此因子为 HBV X 基因启动子结合蛋白. 经同源性搜索, 此结合位点与人层粘连蛋白受体启动子成分和脂蛋白受体相关蛋白(LRP)基因有高度的同源性.

Yaginuma et al^[12]用人肝细胞瘤细胞系(HuH-7)发现一种序列特殊的细胞因子, 与 X 开放读框上游第 1 个 ATG(1 248 nt)的启动子区域结合. 胰脱氧核糖核酸酶 I 印迹分析实验显示结合序列位于 1 097-1 119 nt, 内有一个 8 bp 的回文结构. X 基因转录子 S1 核酸酶分析证实结合位点靠近 X mRNA 的两个主要起始位点 1 117 nt 和 1 125 nt. 并进一步证明, 在结合位点导入一个突变可在 8 bp 回文结构以外引起 X mRNA 转录起始端结合功能丧失的伴随变化. 当 X mRNA 翻译成 X 蛋白的时候这个启动子结合蛋白似乎支配 X 启动子.

Guo et al^[13]报告 HBV 增强子 I 增强子元件与 X 基因启动子重叠, 经甲基化干扰实验发现 4 个集簇在 1 个 120 bp 区域的蛋白因子结合位点, 用来控制 X 启动子活性和增强子 I 能力. 缺失定位实验显示 2 个上游的蛋白因子结合位点构成一个基础增强模块, 此模块可被一个肝特异性因子和一个非特异性因子控制. 可被单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶基因启动子激活 5-10 倍, 定向依赖于一个肝来源细胞系(Huh7), 在其他试验的细胞类型没有发现. 2 个下游蛋白因子结合位点与上游基础增强模块相互作用, 通过定向和距离依赖机制可另增大增强子活性 10 倍. 除此之外, 2 个下游蛋白因子结合位点中至少有一个是 X 启动子活性所必需的.

Gustin et al^[14]用接头分区诱变实验和删除分析实验联合确定 HBV 增强子 I -X 启动子(1 042-1 354 nt, HBV adw2)表达单一蛋白结合位点的机制. 在 HuH7 细胞 EF-C 位点接头分区诱变实验中 X 启动子活性下降 67.5%, 但在 HepG2 和 HepSK 中没有作用. 在 HuH7、HepG2 和 HepSK 细胞中 E 成分突变导致 X 启动子大约下降 50 %.

删除分析实验显示 EF-C 位点(mp1163)需要 X 启动子全部活性, 涉及 NF-1a 位点时需足够的 X 启动子基础活性. NF-1a 位点的 PCR 定向接头分区诱变实验中并没有使启动子活性下降, 提示此位点并不是启动子必需成分. 增强子 I 复杂甚至部分重复的蛋白质 DNA 相互作用对于全部 X 启动子活性是必需的. 必需的基础启动子成分的缺乏提示 2 个分离的 HBV 增强子成分是由基因整合作用生成一个原始的增强子成分.

Xu et al^[15]将 HBV 质粒同 p73 α 和 p73 β 表达载体共转染进 HepG2 细胞, 表面抗原和 e 抗原用 ELISA 检测, 病毒转录合成用 Northern blotting 评价. HBV 调控元件增强子 I /X 启动子活性用萤虫素酶测定来评价. 结果显示 p73 α 和 p73 β 通过下调增强子 I /X 启动子活性来抑制表面抗原和 e 抗原表达, 但 p73 β 比 p73 α 作用更强. p73 α 和 p73 β 均为 p53 家族成员.

Choi et al^[16]将激活转录因子 2 (ATF2) 表达载体与连接了 CAT 的 X 启动子质粒共转染进 HepG2 细胞, 结果抑制了 X 启动子活性. 通过 HBV E 成分, 活化的激活蛋白 1 (AP1) 介导 HBx 转录高达 35 倍, 当 ATF2 存在时其激活活性被抑制, 提示 X 启动子自活化的作用被 ATF2 所抑制. AP1 介导的基础转录和 HBx 造成 X 启动子自活化. 在 HBV E 成分中由于 AP1 和 ATF2 结合位点是重叠的, ATF2 对 X 启动子活性的抑制作用与 AP1 结合位点是竞争的, 并且形成 ATF2-Jun 异二聚体与 AP1 成分是一致的. X 小启动子有 1 个 ATF2 结合位点, 并可被 ATF2 激活. ATF2 对 X 蛋白有综合调节作用.

Choi et al^[17]用 5' 串行缺失分析的方法对 X 小启动子进行研究, X 小启动子位于 X-ORF 中间的 5' - 端, 实验发现了 1 个 X 小启动子的阳性调节序列, 2 个细胞的蛋白 p110 和 p33 分别约束此调节序列的 3' 端 - 和 5' - 端. p33 和 p110 分别的结合位点缺失突变分别导致阳性成分活性的下降和升高, 因此对 p33 的功能而言, p33 具有反式激活作用, p110 具有抑制作用. P110 体外磷酸化减少了他的靶 DNA 结合能力可进一步证明这一点.

3 参考文献

- 1 Guo SP, Ma ZS, Wang WL. Construction of eukaryotic expression vector of HBV x gene. *World J Gastroenterol* 1999;5: 351-352
- 2 Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- 3 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 4 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 5 骆抗先, 朱幼芙. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:25-33
- 6 Zheng YW, Riegler J, Wu J, Yen TS. Novel short transcripts of hepatitis B virus X gene derived from intragenic promoter. *J*

- Biol Chem* 1994;269:22593-22598
- 7 Zhang P, Raney AK, McLachlan A. Characterization of the hepatitis B virus X-and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements. *Virology* 1992;191:31-41
- 8 Treinin M, Laub O. Identification of a promoter element located upstream from the hepatitis B virus X gene. *Mol Cell Biol* 1987;7:545-548
- 9 Fukai K, Takada S, Yokosuka O, Saisho H, Omata M, Koike K. Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell. *Virology* 1997;236:279-287
- 10 Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K. Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system. *Virology* 1996;216:80-89
- 11 Nakamura I, Koike K. Identification of a binding protein to the X gene promoter region of hepatitis B virus. *Virology* 1992; 191:533-540
- 12 Yaginuma K, Nakamura I, Takada S, Koike K. A transcription initiation site for the hepatitis B virus X gene is directed by the promoter-binding protein. *J Virol* 1993;67:2559-2565
- 13 Guo WT, Bell KD, Ou JH. Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex. *J Virol* 1991; 65:6686-6692
- 14 Gustin K, Shapiro M, Lee W, Burk RD. Characterization of the role of individual protein binding motifs within the hepatitis B virus enhancer I on X promoter activity using linker scanning mutagenesis. *Virology* 1993;193:653-660
- 15 Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. p73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol* 2002;8:1094-1097
- 16 Choi CY, Choi BH, Park GT, Rho HM. Activating transcription factor 2 (ATF2) down-regulates hepatitis B virus X promoter activity by the competition for the activating protein 1 binding site and the formation of the ATF2-Jun heterodimer. *J Biol Chem* 1997;272:16934-16939
- 17 Choi CY, Park GT, Rho HM. A positive regulatory sequence of hepatitis B viral small X promoter. *Eur J Biochem* 1996;239: 579-587

乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究

梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮

梁耀东, 成军, 陆荫英, 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
吴君, 程明亮, 贵阳医学院第一附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004
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: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1242-1245

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1242.asp>

0 引言

基因组研究自从开展以来, 已经取得了举世瞩目的成就. 随着基因组测序工作的完成, 接下来就是研究基因的功能. 因为基因是通过蛋白质之间的相互作用而发挥功能的, 蛋白质之间的相互作用是很多生命现象的基础, 故基因表达的蛋白质的功能研究尤为重要. 乙型肝炎

炎病毒(HBV)是嗜肝 DNA 病毒, 可以引起慢性肝炎、肝硬化及肝癌等, 目前全世界有 3.5 亿人感染, HBV 为了适应生存环境的变化, 特别是在宿主免疫和抗病毒药物的压力下, HBV 的 4 个基因区都可能发生突变, 有的突变改变了病毒的致病性, 或影响宿主对病毒的免疫应答、抗病毒药物的疗效和乙肝疫苗的免疫效果, 治疗及预防效果均不佳, 且预后极差^[1-7]. HBV 的四个结构蛋白开放读码框(open reading frame, ORF) S、C、P、X 分别编码前-S1、前-S2、HBsAg、HBcAg、HBeAg、病毒多聚酶及 HBxAg 等 7 种蛋白质, 1990 年代末以来, 一系列的遗传、生化方法尤其是酵母双杂交技术等的发展, 为研究 HBV 与人体蛋白质之间的相互作用打下了坚实的基础. 在上述七种蛋白中, 由于 HBcAg 结构和功能的特殊性, 目前对其结合蛋白的研究还比较少.

1 HBcAg 的结构及功能

HBcAg 由 HBV 的 C 基因编码, 分子量为 21-22 kD. C 基因可分为前-C(pre-c)区和 C 区, 前-C 区位于 1 814-1 901 nt 之间, 编码一段 29 个氨基酸残基(aa)组成的多肽叫前 C-蛋白. C 区位于 1 901-2 450 核苷酸(nt)之间, 编码 183 aa 组成的 C 蛋白(乙型肝炎病毒核心抗原, HBcAg), 而由前-C 和 C 蛋白基因共同编码的 212 aa 组成的多肽, 称乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg). C 基因有两个 ATG 起始码, 形成至少四条多肽(p25、p22、p21 及 p17)^[8].

HBV 核壳由 240 个或 180 个 HBcAg 亚单位组成对称的正二十面体结构, 各亚单位间必须有确定的分子界面方能形成如此特异的结构, 其内侧与 P 蛋白及基因组 RNA 结合, 外侧与 HBsAg 结合. p21 HBcAg 自 C 基因的第二个 ATG 起始合成, 是组成核壳的主要成分, 由 183-185 aa 组成, 除负责形成特殊的结构外, 尚参与 RNA 包装、DNA 合成、病毒成熟、识别包膜蛋白以及病毒向细胞外释放等过程. p22 蛋白能够形成与 p21 蛋白相似的核壳, 二者也可以形成杂交核壳. 核壳表面有特征性的刺突及核孔, 推测其基本亚单位为锤头状二聚物, 且折叠成放射状排列的四条 α 螺旋, 中间第 78-82 aa 是主要免疫区(MIR), 位于核壳刺突的尖部. 除刺突外, 位于 C 末端 α 螺旋尾部的 127-133 aa, 是除刺突外的另一个 B 细胞识别位点. 尽管 HBcAg 不象其他许多病毒那样折叠成 β 片层, 但所形成的核壳仍具有许多功能信息.

HBcAg 有稳定的三维结构, 大致可分为核壳装配区(1-149 aa)和核酸结合区(150-183 aa). HBcAg 的双体在装配区自发地组装进入核壳, 有文献报道, 在大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞中表达 C 基因, 均可得到 27 nm 的核心颗粒, 表明 HBcAg 不需任何其他蛋白的参与即可自我装配成核心颗粒; 核酸结合区是精氨酸富集区, 可与前基因组 RNA 结合, 将其包裹进入核心.

HBcAg 的羧基末端是与 RNA/ DNA 的结合区段, 也与 DNA 聚合酶的包装信号 ϵ 结合有关; 其具有鱼精蛋白样亲核性, 可介导细胞核内转运信号, 当大量 HBcAg 进入细胞核内后, 其他嗜肝 DNA 病毒表达的核壳蛋白都不能被转运至核内. HBcAg 羧基端鱼精蛋白样精氨酸丰富区第 150-183 aa 很重要, 删除此段, 虽仍能形成颗粒样核壳, 与全长形成的核壳在高分辨率冷冻电镜下观察无明显差异, 但较不稳定, 并且通常为空壳. 应用核磁共振(NMR)分析 HBcAg 颗粒, 发现 C 末端鱼精蛋白样区在颗粒内部的位置不固定. Metzger et al^[9]研究还发现在第 150 aa 后有很大的容量连接其他蛋白, 仍能形成大颗粒.

Conway et al^[10]通过 HBcAg 颗粒对蛋白酶耐性研究, 发现仅有的蛋白酶敏感区 145-147 aa 位于装配区与核酸结合区交界处, 这一区域形成臂状结构. 如果 138 位脯氨酸由甘氨酸所替代, 则能阻止 HBcAg 聚合成颗粒, 而替换第 134、135 和 144 位脯氨酸, 则对核壳的形成无影响.

König et al^[11]研究辨认出两个相互作用区, 一为 78-117 aa, 可能形成二聚体的界面; 二是 113-143 aa, 与 HBcAg 多聚体的形成有关. Kratz et al^[12]发现第 73-94 aa 之间对 HBcAg 自身装配并非必需, 在此区插入 238 aa 仍能暴露于核壳表面. Borisova et al^[13]研究发现任意插入一个仅 5 aa 的前-S1 序列, 如果删除 HBcAg 第 79-88 aa, 可产生特异性抗前-S1 蛋白免疫力, 而当未删除或删除过多的氨基酸(79-93 aa)时, 则免疫力很弱, 删除 79-81 aa, 尽管仍能被抗-HBc 多克隆抗体所识别, 已足以避免 HBcAg 原有的免疫原性.

HBcAg 基因的进化最明显, 他是唯一未被其他基因覆盖的基因, 其与狨猴 HBV(WMHBV)的 HBcAg 序列同源性约为 85-87%. HBV 按基因结构分为 A、B、C、D、E、F 6 个基因型; 根据核心基因又可分为 I 型和 II 型, 两种基因型的易变区分别为 88-99 和 48-60 aa, 大致 HBcAg 74-101 aa 属于高变区^[14, 15].

HBcAg 有较强的免疫原性, 对 HBcAg 的免疫应答反应在宿主对病毒的清除过程中可能有重要作用. HBcAg 的表位主要决定于 HBcAg 的空间构型, 有研究表明, HBcAg 的主要 B 细胞表位在第 107-118 aa 和 77-82 aa 等区段; T 淋巴细胞表位是一些在亲水区的较小的(几个至几十个)寡肽; 细胞毒性 T 淋巴细胞的识别部位由第 84-101 aa 和第 17-28 aa 等区段组成.

2 HBcAg 的结合蛋白

HBcAg 可组成 Dane 颗粒, 并释放入血, 也可在肝细胞膜上表达, 或游离的 HBcAg 与抗-HBc-IgM 特异性结合形成循环免疫复合物. HBcAg 具有很强的免疫原性, 既是 T 细胞依赖性又是非 T 细胞依赖性抗原, 也是杀伤性 T 细胞识别并清除 HBV 感染细胞的靶抗原.

由于感染肝细胞中细胞质和核中存在核心抗原, 核

心蛋白肝细胞内的分布与病毒的复制状态和疾病的活动状态高度相关. Huang et al^[16]研究了HBV核心蛋白与肌动蛋白结合蛋白的C末端区相互作用. 他们用核心蛋白的羧基末端研究与细胞蛋白的相互作用, 因为这一段和病毒的复制周期有关如RNA包装和DNA合成. 用酵母双杂交的方法筛选出了一个cDNA克隆编码人肌动蛋白结合蛋白的C末端区-ABP-276/278, 这个相互作用均用体内实验所证实. 另外, ABP-276/278的C末端区可以和核心蛋白的全长相互作用. 因为这个区域既存在于核心区也存在于前核心区, 所以HBV的核心蛋白和前核心蛋白都可以和ABP-276/278的C末端相互作用. 与HBV核心蛋白相互作用的ABP-276/278的最小区是C末端的199 aa相应于ABPs中的间隔铰链区II的24个重复的第23重复区. HBV复制中ABP潜在功能和他在慢性肝炎患者中在病理改变中所起作用还在研究.

核心蛋白是人乙肝病毒核心颗粒的主要组成部分, 核心颗粒和核心蛋白在病毒的复制中起重要的作用, 包括RNA包装, DNA的合成及病毒包膜蛋白的识别等. 核心蛋白大部分是含磷蛋白, 如果不是, 则在核心蛋白C末端的3个SPRRR序列中的丝氨酸残基发生磷酸化. HBcAg磷酸化后暴露出其核内定位信号, HBcAg与核小孔复合物结合进入核内, 因此HBcAg磷酸化是病毒基因进入核内所必需的. 在包装了病毒聚合酶和基因组RNA后, HBcAg开始发生磷酸化, 这可以作为基因成熟的一个信号.

Kau et al^[17]从细胞内核糖体相关蛋白成分研究发现一种丝氨酸激酶能特异地结合和磷酸化核心蛋白的C末端部分, 这一激酶被命名为核心相关激酶(Core-associated kinase, CAK), CAK可被激酶抑制因子如肝素及 Mn^{2+} 等抑制, 而不被亚麻酸、DRB、H89及H7等抑制, 表明可通过蛋白激酶A和C将其区分开来; 其还可通过肝素琼脂糖CL-6B和磷酸纤维素P11柱来部分纯化; 通过Western法检测出三种46、35、13 kD的蛋白质, 被证明与核心蛋白的C末端有作用, 且其仅仅在被洗脱部分含有CAK活性; 通过胶内(in-gel)法激酶分析表明, 46 kD的激酶的部分能激活和磷酸化上述核心蛋白的C末端, 表明46 kD的CAK激酶最有可能是核心相关激酶, 同时还发现一种类似的46 kD激酶, 其表现为对CAK激酶的抑制. 在纯化的细胞内核心颗粒和细胞外42 nm病毒中, 均提示CAK是核心颗粒相关激酶的候选子.

乙肝病毒HBcAg可以与46 kD的丝氨酸激酶结合而发生磷酸化, 乙肝病毒核心蛋白的磷酸化被证实对于前基因RNA组装入病毒核壳是很必须的, 但宿主细胞激酶对介导HBV的复制这必须的一步还没有被清楚了解. Daub et al^[18]在人肝细胞瘤HuH-7细胞裂解物中发现两种激酶, M_r 分别为95和115 kD, 他们能与乙肝病毒核心蛋白特异性结合并使其富含精氨酸的C末端磷酸化, 95 kD的激酶通过质量光谱测定法纯化后, 发

现其性质类似于SR蛋白特异激酶1(SRPK1). 依据这一发现, 通过免疫印迹法鉴定出115 kD激酶为SRPK2相关激酶. 两种激酶磷酸化乙肝病毒核心蛋白在体内外作用于同一丝氨酸末端; 而且, 在所有细胞裂解物内均发现有乙肝病毒核心蛋白激酶, 表明SRPK1和SRPK2的生物化学性质是相同的, 通过层吸法测量结合物, 我们也了解到他们既不是周期素依赖性蛋白激酶Cdc 2和Cdk 2, 也不是蛋白激酶C. 多有文献报道乙肝病毒核心蛋白的磷酸化与乙肝病毒核心蛋白激酶的活性有关, SRPK1和SRPK2是在乙肝病毒感染过程中介导乙肝病毒核心蛋白磷酸化的最有可能的细胞内蛋白激酶.

在病毒成熟过程中, 核壳与外膜蛋白相互作用, 形成病毒颗粒分泌的信号. Poisson et al^[19]通过体外实验发现前-S1蛋白的第13位氨基酸的C末端可以与HBcAg有效的结合, 其他位点则不能结合; 而且, 还发现HBsAg的第56-80位氨基酸也能与HBcAg有效的结合, 这两种反应可能是乙肝病毒维持正常的形态功能所必需. 其具体作用, 有待作体内实验进一步证实.

本实验室近来通过酵母双杂交技术研究发现, HBcAg与线粒体核蛋白L41、NADH脱氢酶亚基4、细胞色素C氧化酶、细胞色素B等有相互作用, 支持HBcAg通过肝细胞线粒体介导HBV的复制和装配; HBcAg还可与金属硫蛋白相互作用, 推断可能是机体自身保护反应的一种, 是否具有阻断病毒复制、清除病毒的效应还需要进一步验证, 如果上述推断成立的话, 将为抗HBV治疗方法的寻找开辟新的道路, 以上结果本室将于近期内报道. 同时我们还发现HBcAg能与其他16种蛋白基因相互作用, 其中4种为未知蛋白基因, 其具体作用, 尚在研究中.

总之, 乙肝病毒HBV和体细胞中的多种蛋白有相互作用, HBV结合蛋白的研究为HBV的生物作用和相关疾病的发病机制的研究提供了线索, 说明了一些蛋白质与人体相互作用后所能导致的结果, 部分地解释了乙肝病毒对人体的作用形式为什么如此多样变化, 所引起的病理生理改变为什么如此广泛. HBV结合蛋白尤其是HBxAg对细胞的调节作用比较重要, 研究也比较多, HBcAg在细胞调节中也起到一定的作用, 但目前对其报道较少. HBcAg及其他乙肝病毒蛋白与宿主蛋白之间的相互作用值得进一步研究.

3 参考文献

- 1 Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of Thymosin- α 1 versus interferon- α treatment in patients with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- 2 He XS, Huang JF, Chen GH, Fu Q, Zhu XF, Lu MQ, Wang GD, Guan XD. Orthotopic liver transplantation for fulminant hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2000;6:398-399
- 3 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 4 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of

- IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 5 Cheng ML, Wu YY, Huang KF, Luo TY, Ding YS, Lu YY, Liu RC, Wu J. Clinical study on the treatment of liver fibrosis due to hepatitis B by IFN- α (1) and traditional medicine preparation. *World J Gastroenterol* 1999;5:267-269
- 6 Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:213-215
- 8 Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. *J Virol* 1997;71:345-353
- 9 Metzger K, Bringas R. Proline-138 is essential for the assembly of hepatitis B virus core protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 3):587-590
- 10 Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Stahl SJ, Wingfield PT, Steven AC. Localization of the N terminus of hepatitis B virus capsid protein by peptide-based difference mapping from cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14622-14627
- 11 Konig S, Beterams G, Nassal M. Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein. *J Virol* 1998;72:4997-5005
- 12 Kratz PA, Bottcher B, Nassal M. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1915-1920
- 13 Borisova G, Borschukova O, Skrastina D, Dislers A, Ose V, Pumpens P, Grens E. Behavior of a short pre S1 epitope on the surface of hepatitis B core particles. *Biol Chem* 1999;380:315-324
- 14 孙殿兴, 胡学玲, 胡大荣. 乙型肝炎病毒核心蛋白作为免疫载体的结构与功能基础. *国外医学病毒学分册* 2000;7:151-155
- 15 孙殿兴, 胡大荣, 邬光惠. HBV 核心蛋白结构及其在基因治疗策略上的应用. *国外医学·流行病学传染病学分册* 2001;28:19-24
- 16 Huang CJ, Chen YH, Ting LP. Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein. *J Biomed Sci* 2000;7:160-168
- 17 Kau JH, Ting LP. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* 1998;72:3796-3803
- 18 Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137
- 19 Poisson F, Severac A, Hourieux C, Goudeau A, Roingeard P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* 1997;228:115-120

羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(8):1245-1247
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1245.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生、发展过程密切相关^[1-5]. 病毒进入到肝细胞之后, 肝炎病毒蛋白在肝细胞内不是孤立存在的, 病毒基因组在肝细胞内具有两种调控方式: 其一是顺式调节, 如启动子及增强子序列, 以直接方式影响另外一些基因组的功能, 是基因组内部调节方式; 其二是反式调节, 即基因组中一部分基因片段通过其转录或翻译产物产生对另一部分基因片段表达的调节方式, 如病毒基因组表达的反式激活蛋白, 以其表达产物的间接方式参与另外一些基因的功能调节, 可以对基因组内部的基因片段, 甚至可以对另外细胞或病毒的基因组有调控作用. 这种病毒蛋白对肝细胞基因组的反式调节作用, 影响了肝细胞的基因表达谱, 是病毒感染慢性化以及引起感染的肝细胞发生恶性转化的重要的分子生物学机制之一^[6-8].

1 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBst)的反式调节
近年研究发现, 从肝癌细胞系或肝癌组织甚至是外周血中克隆出的截短型前-S2/S基因表达产物羧基末端的截短型分子 MHBst, 能够调控肝细胞某些基因表达从而影响细胞生长调节, 也具有反式激活功能. MHBst 的反式激活效应可能与蛋白激酶 C(PKC)依赖的信号传导途径有关, 前-S2 区域与 PKC α/β 结合发生磷酸化反应, 触发 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2- 激酶信号传递链式反应, 结果激活了转录因子如激活蛋白-1(AP-1)、细胞核因子- κ B(NF- κ B)、激活蛋白-2(AP-2)、血清应答因子(SRF)、Sp1 和 c-myc、c-fos 启动子, 参与病毒感染后的炎症反应和肝细胞癌的发生^[9-15].

这种变异的病毒表面抗原中蛋白, 缺失了位于 C-末端的膜定位信号, 使 MHBst 具备内质网(ER)定位功能, 未能进入分泌途径而在 ER 滞留, 其前-S2 区指向胞质区, 从而有机会与胞质蛋白相互作用, 发挥其广泛的反式激活效应; 全长的乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBs)的前-S2 区指向 ER 腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说 MHBst 的反式激活功能依赖于其 N-末端前-S2 区的胞质定位功能. 具有反式激活功能的截短位点是在一定的范围之内, 缺失突变的范围是决定该截短型分子是否具有反式激活作用的重要因素, MHBst 至少完全缺失蛋白 C-末端 S 区的疏水区 III, 才具有反式激活功能; S 区的 N-末端疏水区 I 是反式激活所必需的, 因为蛋白与膜的结合是转录激活功能所必需的, 这段核苷酸序列被称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TAO). 进一步研究表明, MHBst 的最小反式激活单元定位于 4-53 氨基酸残基(aa), MHBst53 是其中最小的转录激活因子, 是一种非膜结合类型的 MHBst, 就是说, 仅前-S2 区(1-55 aa)就足以介导反式效应, 说明作为反式激活因子的 MHBst 大小范围是很大的^[16-23].

羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白表现出一定的反式激活作用. MHBst 反式激活剂可以分成2种不同的类型: 一种是内质网分布型, 其代表是羧基末端截短76 aa的乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBst76), 一种是细胞质分布型, 代表是羧基末端截短63 aa的乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBst63). Hildt et al^[24]利用杆状病毒载体-昆虫细胞系表达系统表达了MHBst76和MHBst63蛋白, 经过层析纯化以后可以获得高纯度的蛋白. 从转染的HepG2细胞中也可以表达和纯化得到MHBst76蛋白. 2种表达系统获得的重组MHBst蛋白都是未经糖基化修饰的蛋白类型. 进一步的分析结果表明, 以昆虫Sf9细胞系表达、纯化的MHBst76是N-端发生乙酰化、磷酸化、硫酸化修饰的蛋白. 这些重组的蛋白导入细胞之后具有明显的反式激活作用. Sf9、HepG2不同细胞系表达的MHBst在反式激活作用上没有显著的差别. 因此, 重组MHBst蛋白的表达和纯化, 为研究MHBst的反式激活作用提供了很好的物质基础. 以昆虫细胞系Sf9表达的MHBst76是内质网膜相关的蛋白, 在高尔基体中滞留并加工、分泌. 因此表达MHBst76的Sf9的微粒体组分导入到的肝细胞Chang细胞中时, 即表现出显著的反式激活作用. 相反, 全长的MHBs蛋白不具备这一功能. MHBst76是一种非糖基化的蛋白类型, 这种蛋白的糖基化修饰并不是其反式激活作用所必须具备的结构特征. 因为第4位上的天门冬氨酸残基的突变并不影响其反式激活功能. 从大肠杆菌中分离纯化的重组MHBst76蛋白也具有相应的反式激活作用. 因此认为非糖基化的MHBst76蛋白是其存在的一个基本型.

为了进一步研究MHBst的反式激活功能, 筛选和克隆其反式激活的靶基因, 我们选择编码167位氨基酸残基以后的羧基末端截短分子-MHBst167, 构建其真核表达载体, 并证明在真核细胞中瞬时表达的MHBst蛋白具有反式激活作用^[22]. 我们用抑制性消减杂交(SSH)方法成功地构建了MHBst反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库, 对于得到的50个克隆进行生物信息学分析, 其中4个克隆未检索到任何对应的相似序列, 可能代表了MHBst反式激活新的靶基因, 进一步的分析和功能鉴定正在进行中. 另外还发现肿瘤发生密切相关的基因如c-myc, 进一步用免疫印迹方法以抗c-myc的单克隆抗体验证MHBst对c-myc基因表达的上调作用, 结果显示c-myc是MHBst反式激活作用的靶基因. c-myc基因是人的正常细胞基因组中一种高度保守的细胞癌基因, 具有能够使正常细胞发生恶性转化的潜能. 在大部分情况下, 处于不表达状态或表达水平不足以引起细胞恶性转化. 癌基因激活方式有多种, 常见的如基因放大, 基因突变, 异源启动子表达, 基因重排, 基因过表达以及截短形式多肽的表达. 我们的研究结果显示MHBst对c-myc基因的表达具有上调作用, 对于阐明MHBst反式激活作用及其在HBV感染的慢性

化及肝细胞癌发生之间的作用具有重要理论意义^[23].

2 乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白(LHBs)的反式调节

研究发现, 乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白(LHBs)同MHBst相似, 具有同样的反式激活效应, 并且也是与依赖于PKC的信号传导途径有关, 引发下游c-Raf-1/MAP2-激酶信号传递链式反应, 从而激活了转录因子AP-1、NF- κ B等, 调控细胞异常增生, 引发HCC的发生^[24]. LHBs的反式激活作用与其独特的拓扑结构密切相关, 研究显示, LHBs的前-S1和前-S2区有一个与翻译不同步的转位过程, 在横跨内质网膜时是指向内质网的胞质侧, 这种在胞质滞留的前-S2区, 有机会与细胞中信号转导相关因子相互作用, 发挥其反式激活作用. 另有一部分LHBs的前-S1和前-S2区在翻译后转位跨过内质网膜, 进入分泌途径, 参与病毒颗粒的组装. LHBs转基因鼠的肝细胞呈现毛玻璃样, 与其持续过表达, 转录反式激活病毒的启动子元件而促进病毒复制密切相关. 可见LHBs是一种多功能的蛋白质, 其反式激活作用对于阐明HBsAg携带者发生HCC的分子生物学机制具有重要意义^[25, 26].

LHBs和MHBst构成了前-S2基因编码的HBV反式激活蛋白家族. 这些反式激活蛋白的反式激活作用都是由前-S2蛋白位点在细胞质中的朝向所决定的. MHBst反式激活剂是PKC依赖性的, 也是第28位上的丝氨酸位点依赖性的. 磷酸化位点的完整性是其反式激活作用的机构基础. MHBst触发PKC依赖性的c-Raf-1/Erk2信号转导系统, 进而激活转录因子AP-1和NF- κ B.

3 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活的原理

目前的研究结果表明, 约三分之一的HCC组织中有HBV DNA的整合, 并产生3'-末端截短型的反式激活蛋白. MHBst并不是分泌型的MHBs, 在分泌过程中滞留在ER中, 因此考虑到在细胞内的朝向是否决定其反式激活作用. 通过融合蛋白表达的策略, 将MHBs编码全长基因与ER定位信号肽序列KDEL融合, 结果表明仅是将完整的MHBs滞留在ER中, 并不能产生反式激活作用. 应用蛋白酶对于微粒体中的蛋白成分进行降解, 表明MHBst的氨基末端部分直接朝向细胞质一侧, 而MHBs蛋白分子中的氨基末端是朝向ER腔的. 这一结构特点在一定程度上解释了MHBst蛋白的反式激活作用, 而MHBs不具备反式激活作用的原因. 通过缺失突变分析, 证明MHBst的非膜相关部分也与其反式激活作用有关, 表明非膜相关的MHBst蛋白代表了第二种类型的MHBst反式激活蛋白. 这些具有反式激活作用的MHBst在细胞内均匀分布, 在功能上与膜相关性MHBst蛋白并没有差别. MHBst53是目前为止已经发现的最小的反式激活作用蛋白. 这2种类型的反式激活蛋白分子都能在生理条件下相互结合成同二聚体形

式, 形成二聚体相关的结构基础也是 MHBst 蛋白反式激活作用的先决条件. 提示 MHBst 的二聚体化与反式激活功能之间是密切相关的^[27-29]. MHBst 与报告基因质粒 pSV2CAT 的共转染实验研究结果表明, 前 -S2/S 基因的缺失范围达到第 III 疏水区时才具备反式激活功能. 缺失第 II 疏水区, 甚至是全部的 S 区之后, 也不影响其反式激活作用. 如果缺失突变涉及到疏水区 I, 则反式激活作用消失. 因此 HBV DNA 的 221-573 nt 之间的核苷酸区域与其反式激活作用密切相关.

MHBst 具有广泛的反式激活作用, 对于原癌基因 c-myc、c-fos 都具有显著的反式激活作用. 因此, MHBst 反式激活蛋白是以影响转录因子蛋白 AP-1 的活性来实现其转录调节的. 如果在 c-myc 基因启动子序列中将 AP-1 转录因子蛋白的结合位点序列缺失掉, 那么 MHBst 反式激活蛋白对于原癌基因 c-myc 的反式调节作用就受到显著影响. 对于 MHBst 反式激活作用的机制进行研究发现: 第一, 在一种 MHBst 反式激活没有应答的基因启动子序列中, 如果加入 AP-1 转录因子蛋白是别的核苷酸序列, 那么这种基因的表达就获得了被 MHBst 反式激活的能力; 第二, 利用 MHBst 表达质粒的共转染实验研究结果表明, AP-1 可以显著提高 c-jun 和 c-fos 的表达活性; 第三, 转录因子激活的 AP-1 抑制因子, 可以减弱 MHBst 的反式激活作用效果. 除了 AP-1 之外, MHBst 还能利用对 NF- κ B 和 AP-2 的调节实现其反式激活作用. 说明 MHBst 反式激活蛋白可以通过几种不同的机制对于基因表达的类型和水平进行调控. 因为 AP-1 调节的靶基因类型中有许多是与肿瘤有关的基因类型, 这就不难理解 MHBst 在 HCC 的形成过程中具有十分重要的意义^[30, 31].

4 参考文献

- 1 Yu SJ. A comparative study on proliferating activity between HBV related and HCV related small HCC. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:236-237
- 2 Guo SP, Ma ZS, Wang WL. Construction of eukaryotic expression vector of HBV x gene. *World J Gastroenterol* 1999;5:351-352
- 3 Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- 4 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 5 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 6 Wang JY, Wang XL, Liu P. Detection of serum TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1999;5:38-40
- 7 Liu YJ, Cong WM, Xie TP, Wang H, Shen F, Guo YJ, Chen H, Wu MC. Detecting the localization of hepatitis B and C virus in hepatocellular carcinoma by double in situ hybridization. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:187-189
- 8 Zhu HZ, Cheng GX, Chen JQ, Kuang SY, Cheng Y, Zhang XL, Li HD, Xu SF, Shi JQ, Qian GS, Gu JR. Preliminary study on the production of transgenic mice harboring hepatitis B virus X gene. *World J Gastroenterol* 1998;4:536-539
- 9 Murakami S, Cheong J, Ohno S, Matsushima K, Kaneko S. Transactivation of human hepatitis B virus X protein, HBx, operates through a mechanism distinct from protein kinase C and okadaic acid activation pathways. *Virology* 1994;199:243-246
- 10 Yu DY, Moon HB, Son JK, Jeong S, Yu SL, Yoon H, Han YM, Lee CS, Park JS, Lee CH, Hyun BH, Murakami S, Lee KK. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol* 1999;31:123-132
- 11 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 12 Arii M, Takada S, Koike K. Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function. *Oncogene* 1992;7:397-403
- 13 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002;27:127-129
- 14 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114
- 15 Wang XZ, Tao QM. Hepatitis B X gene and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1063-1064
- 16 Caselmann WH. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 1):34-37
- 17 Bangur CS, Switzer A, Fan L, Marton MJ, Meyer MR, Wang T. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* 2002;21:3814-3825
- 18 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 19 Hu YP, Yao YC, Li JX, Wang XM, Li H, Wang ZH, Lei ZH. The cloning of 3' truncated preS/S gene from HBV genomic DNA and its expression in transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2000;6:734-737
- 20 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs' 的反式激活作用. *国外医学病毒学分册* 2000;7:190-193
- 21 Caselmann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997;78:1478-1495
- 22 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 23 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调 c-myc 基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:141-144
- 24 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239
- 25 Wu GH, Huang YX, Fan GR, Zhang GX. Serum transformation growth factor β 1 in patients with hepatitis B. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:505-506
- 26 Hartmann-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with γ 2-Adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* 2001;75:5343-5351
- 27 Kim HS, Ryu CJ, Hong HJ. Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *J Gen Virol* 1997;78:(Pt 5)1083-1086
- 28 Huang YX, Wu GH. Relationship between hepatitis B and liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:682-685
- 29 Min F, Hao F. Hepatitis B virus envelope protein and protective immunity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1065-1067
- 30 Yan JC, Chen WB, Ma Y, Tian RX, Ding TL, Xu CJ. Relationship between transforming growth factor beta-1 and vascular diseases in hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:751-754
- 31 Kojima N, Horiike N, Michitaka K, Onji M. In situ detection of mutated hepatitis B virus in microdissected, formalin-fixed liver tissues from patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1999;30:359-365

乙型肝炎病毒X蛋白反式激活作用的研究

杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林

杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室: cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1248-1250
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1248.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是引起急、慢性肝炎的主要原因, 部分HBV感染者还可发展为肝硬化、原发性肝癌^[1-3]. HBV是很小的包膜病毒, 病毒基因组结构精密, 约3 200个bp(nt), 含4个开放读码框架, X基因为最小的一个, 位于1 374-1 838 nt, 编码一个M_r为16-17 kD的145-154个氨基酸残基(aa)多肽. HBxAg蛋白在病毒复制、肝细胞癌变方面具有十分重要的作用, 可反式激活病毒和细胞启动子进而调节病毒及细胞的转录, 亦可调节细胞癌基因的表达和改变细胞的生长特性^[4-7]. HBxAg蛋白的奇特之处在于: 结构简单, 但却具有广泛的反式激活作用. 目前对HBxAg蛋白反式激活作用途径研究的较为广泛, 就这方面的研究作一概述.

1 HBxAg蛋白与HBV复制

HBxAg蛋白可反式激活广泛的启动子, 包括HBV基因组, 为比较反式激活效率和了解启动子特异的空间结构是否影响转录活性, Nakatake et al^[8]利用氯霉素乙酰化酶(CAT)报告基因构建了8个载体质粒, 其中4个质粒含有相应的4个单独HBV启动子, 而另外4个质粒, CAT分别被插入HBV基因组4个启动子的下游, 每一个载体质粒与表达质粒pRSV-X共转染人肝癌细胞株HepG2, 发现所有这些启动子均能被X蛋白增强2-3.5倍. X基因框内起始密码子变异分析表明内部翻译的启动导致反式激活产物的产生, X基因终止密码子变异的HBV基因组转染HepG2后, 病毒的复制水平下降; 当与野生型X基因共转染时, 病毒的复制水平将会得到恢复. Renner et al^[9]用含HBV增强子、C区启动子及CAT报告基因的质粒与X基因重组表达质粒共转染肝癌细胞PLC/PRF/5, 同样也发现X基因可反式激活HBV增强子.

2 HBxAg蛋白在细胞中的反式激活作用

HBV是原发性肝癌主要危险相关因素之一, 瞬时转染实验表明HBxAg蛋白具有广泛激活作用, 影响细胞转

录、生长以及细胞凋亡^[10-13]. 虽然不能与DNA结合^[14], 但HBxAg蛋白能激活多种顺式作用元件, 如: AP-1、AP-2、NF- κ B、CRE^[15-17]. 目前认为HBxAg蛋白广泛的激活作用是由于其具有双重作用途径. HBxAg蛋白在细胞内定位于细胞质和核内^[18], 对HBxAg反式激活的途径目前研究认为存在两种方式, 即: 在胞质中通过信号传导途径, 如: Ras-Raf-MAPK级连反应调节基因的表达; 在核内与TATA结合蛋白等相互作用而影响基因的表达. Klein et al^[19]报道HBxAg蛋白能直接激活Src酪氨酸蛋白激酶的活性. 如将Src酪氨酸蛋白激酶抑制因子CSK与HBxAg一起导入细胞内, 则激活作用消失. Src激酶被激活后能刺激Ras-Raf-MAPK传导通路, 促进c-Fos和c-Jun的合成, c-Fos和c-Jun以异二聚体的方式组成了AP-1, AP-1直接结合序列特异的AP-1启动子上游反应元件, 使转录水平上调. Heissmeyer et al^[20]报道HBxAg可以激活转录因子NF- κ B, 主要是通过两种不同的胞质传导方式: 作用于37 kD的I κ B阻止因子和105 kD的NF- κ B前体阻止蛋白. HBxAg诱导I κ B阻止因子磷酸化, 可使其活性下降3-4倍; 同时HBxAg介导NF- κ B前体阻止蛋白水平下降, 释放RelA蛋白, 进而发生NF- κ B的激活. Benn et al^[21]发现HBxAg蛋白可明显升高GTP-Ras水平, 激活并使Raf磷酸化, 使MAPK酪氨酸磷酸化, 阻断Ras, Raf活性时, 由HBxAg蛋白激发的转录因子AP-1的反式激活功能即被阻止. 对NIH 3T3研究发现多重Ras-Raf-MAPK的激活与细胞转变有关^[22]. HBxAg蛋白能够诱导细胞发生转化, 不仅与激活Ras-Raf-MAPK级连反应, 促进细胞进入S期有关, 而且与HBxAg蛋白对JNK途径的激活有关. JNK途径的激活与细胞转化和凋亡均有关^[23]. 为了解HBxAg蛋白激活作用, Tarn et al^[24]建立了两个表达HBxAg蛋白永生化肝细胞系AML12, 即: 高分化的3pX-1和低分化的4pX-1细胞系, 同时证明在3pX-1中HBxAg蛋白可以诱导细胞发生转变, 但在4pX-1细胞却没有同样的现象发生. 即: 发生转变的3pX-1中, HBxAg蛋白可诱导IEGs, ATF3, c-fos的表达, 但在无细胞转化的4pX-1中, 仅有c-fos低度表达. 从HBxAg蛋白在细胞合成开始, 采用动态生化检测评估HBxAg蛋白对促有丝分裂原的激活作用, 发现在HBxAg蛋白表达的最初15 h内, 3pX-1和4pX-1细胞中HBxAg蛋白可产生不同的促有丝分裂原效应. 在3pX-1细胞中, HBxAg蛋白介导持续的ERK1、2激活, 而在4pX-1细胞中HBxAg蛋白只表现出瞬时的ERK1、2激活和持续的JNK激活. 在信号传导通路反式报告检测、动态分析CERB和c-Jun磷酸化作用中, 发现在3pX-1细胞中HBxAg蛋白通过Ras-Raf-MAPK诱导Elk-1和CREB激活, 在4pX-1细胞中, HBxAg蛋白选择性激活JNK通路, 进一步支持了HBxAg蛋白在不同的细胞状态下, 可通过不同的信号传导通路介导基因的表达. 胰岛素样生长因子II(insulin-like growth factor-II, IGF-II)与原发

肝癌的形成关系密切. 临床资料显示, 在 HBV 引起的慢性肝炎、肝纤维化、肝癌中 HBxAg 的表达与 IGF-II 升高相关, IGF-II 基因的 4 个启动子中, 启动子 2、3、4 被激活^[25]. Lee et al^[26]研究发现 HBxAg 蛋白能够提高 IGF-II 基因启动子 3、4 诱导的 IGF-II 的表达, 进一步研究发现 HBxAg 蛋白可以正向调节启动子 4 的转录活性, 其中 Sp1 结合位点与这种转录激活密切相关. GAL4-Sp1 融合蛋白实验证明 HBxAg 蛋白确可以提高体内 IGF-II 的表达水平, HBxAg 蛋白不能与 Sp1 直接结合, 但是 HBxAg 蛋白可以增加磷酸化的 Sp1 对 DNA 的亲合性, 而变异的 HBxAg 蛋白失去这种激活作用. Kang-Park et al^[27]报道由 HBxAg 蛋白介导的 Sp1 诱导的 IGF-II P4 转录激活, 与 PKC 和 p44/p42MAPK 信号传导途径有关, 因为: (1)在 HBxAg 转染的 HepG2 细胞中, PKC 的激活和表达载体都能提高 Sp1 的磷酸化和 P4 的活性, (2)在相同的细胞中, PKC 被 Go6976 阻止后, Sp1 磷酸化和 P4 的活性以及 IGF-II mRNA 水平均下降; (3)MEK 的激活被阻止后也产生同样的结果. Anand et al^[28]发现 HBxAg 蛋白能缩短细胞从 G₀ 期进入 S 期的时间, 促进 G₀/G₁ 和 G₁/M 期之间的转化, 这种作用与提高 CDK2 和 CDC2 蛋白激酶水平有关, 而这两种激酶主要激活细胞周期蛋白 A、E、B. 进一步研究显示 HBxAg 通过激活 ras 和一个未知因子促进细胞增生, 未知因子可进一步激活 JNK.

除了通过信号传导途径影响细胞基因的表达外, 位于核内的 HBxAg 蛋白还可以直接通过蛋白-蛋白相互作用对基因的表达产生反式激活作用. 一些研究发现很多转录因子能够与 HBxAg 蛋白相结合, 如: TATA 结合蛋白(TBP), RNA 聚合酶亚单位 5(RPB5), oct-1, p53^[29]; 体外实验发现 HBxAg 蛋白在细胞提取物中可以激活转录^[30]; 将 HBxAg 与 LexA 或 c/EBP DNA 结合域融合表达时, 顺式表达元件可以被激活^[31]. Fischer et al^[32]利用酵母双杂交技术发现 HBxAg 能够与蛋白酶体 α 亚单位结合, HBxAg 蛋白 128 位的变异将会取消这种结合作用. Lin et al^[33]运用 Western blotting、GST- 树脂结合试验和免疫共沉淀在体内和体外均证实转录因子(transactivation factor, TF)TFIIB、RPB5、HBxAg 可以相互作用. 而且每一个蛋白都有与其他二者结合的区域, 三者之间形成一个三聚体复合物. HBxAg 的转录激活作用需要这种复合物的形成, 当 HBxAg 发生变异时, 对 TFIIB 或 RPB5 结合力下降, HBxAg 蛋白的反式转录激活能力也明显下降. TFIIB 结构较为保守, 与 RNA 聚合酶结合后, TFIIB 能够决定转录起始位点. 激活后的 TFIIB 能够与不同的基因特异性转录调节蛋白相结合, 如: TFIID、TFIIF 等. TFIIB 可能是 HBxAg 作用的靶蛋白. HBxAg 与 TFIIB 两个直接重复区结合, HBxAg 蛋白通过这种结合诱导 TFIIB 空间构象变化调节 TFIIB 的功能. 含锌指结

构的 TFIIB N - 末端是 RPB5 和 RNA 聚合酶(RNAP)结合部位. 因此, Lin et al^[34]认为 HBxAg 反式激活的方式可能存在两种形式. 一种方式是在 TFIID 存在的情况下 TFIID 首先与启动子结合形成 TFIID - 启动子复合物, 该复合物被 TFIIB 识别. TFIIB 作为一个桥梁进而连接 RNAPII/TFIIF, HBxAg 同时与 RPB5 和 TFIIB 结合后可以促进 RNAPII/TFIIF 与启动子的结合, 或使 RNAPII/TFIIB - 启动子结构稳定. 另外一种方式是含有 RNAPII 和激活因子如 TFIIF、TFIIB、TFIIH 的 RNA 聚合酶直接与启动子结合, HBxAg 通过与 TFIIB 和 RPB5 结合促使全酶的结合或使其更加结构稳定.

HBxAg 蛋白细胞同时定位于胞质、胞核及其两种相对独立的反式激活途径, 使其在 HBV 感染、HBV 相关肝癌的发生和发展方面处于十分重要的地位, 对其反式激活途径、方式进行深入的研究, 有助于了解 HCC 发病机制, 并对相应的治疗提供新的方法.

3 参考文献

- 1 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 2 成军. 肿瘤相关基因. 北京: 第 1 版. 北京医科大学出版社, 2000: 1
- 3 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 第 1 版. 人民军医出版社, 1997:20-25
- 4 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
- 5 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
- 6 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:(待发表)
- 7 成军. 乙型肝炎病毒 DNA 整合的机制及后果. 世界华人消化杂志 2003;11:(待发表)
- 8 Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993;195:305-314
- 9 Renner M, Haniel A, Burgelt E, Hofschneider PH, Koch W. Transactivating function and expression of the x gene of hepatitis B virus. *J Hepatol* 1995;23:53-65
- 10 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 中华内科杂志 2000;39:838-839
- 11 刘妍, 董菁, 成军, 钟彦伟, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 12 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 15-18
- 13 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 14 Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2513-2517
- 15 Avantiaggiati ML, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, De Marzio E, Colleparado D, Levrero M. The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene* 1993;8:1567-1574
- 16 Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia C, Dargemont C, Brechot C, Israel A. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappa B inhibitor Ikappa B alpha. *Mol Cell Biol* 1999;19:

6345-6354

- 17 Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001;75:215-225
- 18 Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001;82:871-882
- 19 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997;17:6427-6436
- 20 Heissmeyer V, Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C. NF-kappaB p105 is a target of Ikappa B kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J* 1999;18:4766-4778
- 21 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10350-10354
- 22 Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 1994;265:966-970
- 23 Guo YL, Baysal K, Kang B, Yang LJ, Williamson JR. Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 1998;273:4027-4034
- 24 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:34671-34680
- 25 Lee YI, Lee S, Lee Y, Bong YS, Hyun SW, Yoo YD, Kim SJ, Kim YW, Poo HR. The human hepatitis B virus transactivator X gene product regulates Sp1 mediated transcription of an insulin-like growth factor II promoter 4. *Oncogene* 1998;16:2367-2380
- 26 Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:3717-3726
- 27 Kang-Park S, Lee JH, Shin JH, Lee YI. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:303-307
- 28 Anand M, Khanna RN, Misra D, Sharma HK. Changes in brain acetylcholine of rats after dermal application of fenitrothion (Sumithion). *Indian J Physiol Pharmacol* 1977;21:124-134
- 29 Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2513-2517
- 30 De-Medina T, Shaul Y. Functional and structural similarity between the X protein of hepatitis B virus and nucleoside diphosphate kinases. *FEBS Lett* 1994;351:423-426
- 31 Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344:72-74
- 32 Fischer M, Runkel L, Schaller H. HBx protein of hepatitis B virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha-subunit. *Virus Genes* 1995;10:99-102
- 33 Lin Y, Nomura T, Cheong J, Dorjsuren D, Iida K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J Biol Chem* 1997;272:7132-7139
- 34 Lin Y, Tang H, Nomura T, Dorjsuren D, Hayashi N, Wei W, Ohta T, Roeder R, Murakami S. The hepatitis B virus X protein is a co-activator of activated transcription that modulates the transcription machinery and distal binding activators. *J Biol Chem* 1998;273:27097-27103

乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素A的调节研究

成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚

成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚, 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 国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, No. C03011402
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚. 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素A的调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1250-1254

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1250.asp>

0 引言

细胞周期(cell cycle)是细胞分裂增生的经典概念, 过去的研究主要集中在细胞周期的形态学描述上. 随着细胞周期素(cyclin)和细胞周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的发现及其作用机制的研究进展, 使得我们对于细胞周期调节有了分子生物学水平上的深入认识. 细胞周期的分子生物学调节机制的研究, 也促进了肿瘤形成的分子生物学机制的研究, 同时对于肿瘤病毒(oncogenic virus)引起正常细胞的恶性转化机制的研究具有十分重要的促进作用.

从广义上来讲, 乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)都属于肿瘤病毒的范畴, 因为这两种肝炎病毒的感染与肿瘤的发生有着十分密切的关系, 特别是与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生发展密切相关, 这在分子生物学研究和临床流行病学调查资料中都得到了很好的反映. 目前已经积累的研究资料表明, 这些病毒引起正常肝细胞的恶性转化, 也与细胞周期的异常调节有关. 其中肝炎病毒蛋白对于细胞周期素A(cyclin A)的异常调节是其主要机制.

1 细胞周期素A的发现和生物学作用

目前关于细胞周期素和CDK的认识已经相当深入和系统, 已经发现了众多的细胞周期素和CDK分子类型, 对于他们的作用机制也有了清楚的了解, 大大推动了肿瘤分子生物学的研究. 但是, 关于细胞周期素的发现首先还是从HCC的研究开始的. Wang et al^[1]在研究肝细胞癌时, 发现HBV DNA在肝癌细胞基因组DNA的整合位点, 正好是一个肝细胞的编码基因区, 对于这一基因区的序列进行对比分析, 发现这一段基因序列正好是低等动物细胞周期素A编码基因的同源基因, 从而导致了人细胞周期素A基因的发现. 这一研究以及之后的一系列研究结果表明, HBV DNA整合的位点正是人细胞周期素A的内含子(intron)区, 从而形成了HBV表面抗原基因与细胞周期素A的融合基因, 这种

整合造成了细胞周期素 A 基因的表达在 HBV 的表面抗原基因启动子的控制之下, 同时, 由于融合蛋白中缺失的氨基末端的序列, 正好是与细胞周期素 A 蛋白降解有关的序列, 从而造成持续表达和不能降解, 这样细胞就受到持续的细胞周期素 A 的刺激, 造成异常的信号转导, 与 HCC 的发生发展关系密切. Wang et al^[2] 不仅发现了 HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 整合的位点, 而且据此还发现了细胞周期素 A, 随后又建立了 HCC 的 cDNA 文库, 从中鉴定、分离到数个 HBV- 细胞周期素 A 杂合子的分子克隆. 杂合分子 cDNA 编码 HBV- 细胞周期素 A 的融合蛋白, 在这一融合蛋白分子中, 在细胞周期素 A 的 N- 端缺失了一段功能序列, 包括细胞周期素降解所必需的结构, 代之以病毒的前 -S2/S 序列, 整个融合蛋白在病毒的前 -S2/S 启动子的指导下进行. 这种融合蛋白在体外的细胞周期素降解实验中不被降解, Northern blot 杂交分析结果表明这种杂合分子在肿瘤组织中的转录表达水平很高, 但是在同一患者的非肿瘤组织中却没有检测到这种融合蛋白的表达. HBV DNA 与细胞周期素 A 基因的整合造成了很强的 HBV- 细胞周期素 A 杂种分子的转录表达, 编码一种不被降解的细胞周期素 A 分子, 这种杂合分子在肿瘤形成过程中具有十分重要的意义.

细胞周期素 A 基因首先是在肝癌组织中 HBV DNA 整合的位点研究中发现的, 染色体定位在 4q27, 与原发肝癌(PLC)经常出现基因重排的染色体位点 4q32 距离不远. De Mitri et al^[3] 建立了细胞周期素 A 基因的 TaqI 位点多态性研究手段, 对于细胞周期素 A 基因的等位基因丢失情况进行了聚合酶链反应(PCR)检测. 50 例 PLC 患者肿瘤和非肿瘤组织的检测结果表明, 54 % 为 A1 型纯合子, 6 % 为 A2 型纯合子, 40 % 为杂合子. 比较肿瘤和非肿瘤组织, 5 % 为纯合子. 认为细胞周期素 A 等位基因的丢失在 PLC 中不是十分常见, 当只有有限的 DNA 标本时, PCR 技术是检测细胞周期素 A 等位基因丢失的可靠技术手段.

目前已知细胞周期素 A 和 B 是细胞周期调节中最为主要的调节因素. 这两种细胞周期素在细胞周期的调节中均具有十分重要的调节作用, 只是在细胞周期调节过程中发挥作用的先后次序不同. 细胞周期素 A 主要作用在细胞周期的早期阶段, 而细胞周期素 B 主要作用在细胞周期的晚期阶段. 其机制主要是通过不同形式的 CDK 分子的结合和调节. 此外, 细胞周期素 A 主要调节 DNA 的复制, 细胞周期素 B 主要是抑制早期核内体(endosome)以及 cdc25 磷酸酶的激活. 细胞周期素 A、B 异常与肿瘤形成的关系也十分密切.

2 细胞周期素 A 与肝脏疾病之间的关系

Zhang et al^[4] 研究了 HCC 肝组织中细胞周期素 A 过表达的情况, 以及 HBV X 基因与肝细胞基因组 DNA 整合的情况. 对于 HCC 癌组织和癌周组织细胞周期素 A 的

mRNA、蛋白表达水平以及 HBV X 基因的表达进行了研究, 结果仅在 1/35 例患者中检测到细胞周期素 A 基因放大, mRNA 和蛋白的表达水平升高分别见于 16/35, 21/35 例患者, 细胞周期素 A 基因的过表达与患者的年龄、肿瘤大小、HBV X 基因的整合显著相关. 因此认为, 细胞周期素 A 在 HCC 形成的早期阶段就有过表达现象. 这也是 HBV 改变肝细胞的细胞周期调节的重要机制.

在许多类型的肿瘤中, 包括 HCC, 细胞周期素基因放大是十分常见的, 特别是细胞周期素 D 和 E. 在 HCC 中有一系列的细胞周期相关的蛋白激酶活性处于异常状态. Masaki et al^[5] 对于 LEC 大鼠中 HCC 移植瘤的这些蛋白激酶的活性进行研究. 对于不同期的 HCC 组织中细胞周期素 D1、E、A、H, Cdk1 (Cdc2)、Cdk4、Cdk6 蛋白水平以 Western blot 技术进行检测. 对于细胞周期素 D1、E、A、Cdk4、Cdk6、Cdc2、Cdk7、Wee1 激酶的活性应用胶内激酶(in-gel kinase)活性分析技术检测. 细胞周期素 D1、E、Cdk4、细胞周期素 A 和 Wee1 等的蛋白水平和激酶活性升高与 HCC 的分期呈正相关, 特别是在慢性肝炎向 HCC 转化的过程中尤其如此. 尽管慢性肝炎与正常的肝脏相比较 Cdc2 激酶活性轻度升高, 但在慢性肝炎向 HCC 转化的过程中却没有显著的改变. 在正常的肝细胞向 HCC 的转化过程中, Cdk6 和 Cdk7 活性保持不变. 这些结果表明, Cdc2 激酶活性的升高在正常肝细胞的恶性转化过程中具有十分重要的地位, 细胞周期素 D1、Cdk4、细胞周期素 E、细胞周期素 A 和 Wee1 在这些过程中可能没有特别重要的意义.

Werling et al^[6] 对于慢性丙型肝炎患者的肝细胞的 DNA 多倍体性质以及细胞的增生状态进行了研究. 45 例慢性丙型肝炎患者和 27 例非丙型肝炎患者的研究结果表明, 慢性丙型肝炎患者 S 期细胞数目比例轻度下降, 炎症指数和细胞周期素 A 蛋白表达水平也有一定程度的下降, 主要发生在几例重症肝炎患者中. 在非慢性丙型肝炎患者中, 细胞周期素 A 阳性细胞数目与炎症程度相平行. 另外, HCV 感染还可以引起接近二倍体的非整倍体的细胞 DNA, 而病理指数与二倍体状况无关. 这些研究结果表明, 慢性丙型肝炎患者的肝细胞增生状态受到抑制, 且与炎症程度成平行的关系, DNA 多成非整倍体状态. DNA 的非整倍体状态是遗传不稳定的表现和信号, 最终会导致正常细胞的恶性转化.

细胞周期素 A 是 S 和 G2/M 期中的调节蛋白, 这些调节蛋白的异常表达与正常细胞的恶性转化有关. Chao et al^[7] 研究了细胞周期素 A 过表达以及其与 HCC 临床预后之间的相互关系. 研究发现, 39 % (12/31) 的患者有细胞周期素 A 的过表达, 在 6/12 患者可以发现基因放大, 4/12 的患者是转录后效应, 2/12 例患者是翻译后效应. 与细胞周期素 A 表达水平正常的肿瘤组织相比较, 具有细胞周期素 A 过表达的患者, 则具有更多的处于 S 和 G2/M 期的细胞. Skp2 是一种细胞周期素 A 作用蛋白, 在 55 % (17/31) 的患者中发现有过表达现象. 这

些患者也具有较多的处于S期的肿瘤细胞. 经过非配对 Student' s t 检验、精确 Fisher' s 检验和 χ^2 分析, 证实细胞周期素 A 的过表达与 Skp2 表达水平升高有关, 同时与甲胎蛋白(AFP)表达水平升高有关, 但是与患者的年龄、肿瘤大小、是否合并肝硬化、HBsAg 检测结果是否阳性等因素无关. 在无病生存期分析中, 有细胞周期素 A 过表达的患者平均是 6 mo, 而没有细胞周期素 A 过表达的患者是 29 mo. 总体的生存分析结果表明了同样的趋势, 即细胞周期素 A 过表达的患者生存期限较短. 多变量分析(multivariate analysis)结果表明, 根据 Skp2 过表达和 AFP 水平进行调整之后, 仍然发现细胞周期素 A 的过表达与无病生存期有显著相关的关系. 这些研究结果提示细胞周期素 A 是 HCC 独立的预后相关因素.

在实验动物和肝脏疾病患者的临床标本中, 无论是良性还是恶性疾病, 都可以检测到肝细胞生长因子(HGF)及其受体 c-met 的过表达. 以免疫组织化学技术, 对于 20 例 HCC 患者、5 例局灶结节增生(focal nodular hyperplasias, FNHs), 4 例爆发性肝炎(fulminant hepatitis, FH), 1 例再生肝脏检测了 HGF、c-met 的表达. c-met 这种原癌基因在所有的组织中都有表达活性, 尤其在 HCC 表达水平更高. HGF 在所有组织的肝脏脂肪细胞中都能检测到, 在 45 % (9/20) 的 HCC 组织也能检测到在肝细胞中 HGF 的表达. 以细胞周期素 A 的多克隆抗体对于增生指数进行研究, HGF 和 c-met 表达水平和细胞周期素 A 阳性细胞核比率进行比较, c-met 与细胞周期素 A 的表达之间存在显著的相关性. 55 % (11/20) 的 HCC 组织中 HGF 和细胞周期素 A 阳性之间没有显著的相关性. 研究提示 HGF、c-met 的表达是肝细胞增生的最为明显的促进因素.

细胞周期素 A 在细胞周期的 S 和 G2/M 期具有十分重要的调节作用, 其基因组也是 HCC 组织中 HBV DNA 整合的常见位点. Paterlini et al^[6] 对于 PLC 肿瘤和非肿瘤组织中的细胞周期素 A 进行了研究, 包括肝脏肿瘤组织中细胞周期素 A 的基因重排、细胞周期素 A 的表达与增生细胞比率之间相关的特点等. 对 43 例患者的标本进行了 Southern blot 杂交检测. 细胞周期素 A 的 RNA 水平的累积在 18 例患者是明显存在的, 与 S+G2/M 期细胞的比率显著相关. 本项研究中没有发现细胞周期素 A 的基因重排现象, 细胞周期素 A 的 RNA 水平与 S+G2/M 期的细胞比率之间存在极为显著的相关性. 体内研究证实细胞周期素 A 的 RNA 与 PLC 肝组织中增生细胞的比率之间存在极为显著的相关性. 因此认为细胞周期素 A 是肝脏肿瘤细胞显著增生的主要的生物学标志物.

尽管目前已经确定 HCV 是非甲非乙型肝炎(non-A, non-B hepatitis)的主要病原体, 但是仍然存在一部分患者, 组织学具有慢性病毒性肝炎的特征, 但是血清学标志物却是阴性. Romeo et al^[9] 应用 PCR 技术对于诊断明确的慢性活动性肝炎患者的 17 份血清标本和 6 份

肝脏活检标本的 HBV DNA 和 HCV RNA 进行检测, 4/17 血清标本中可以检测到 HCV RNA, 但 HBV DNA 全部阴性. 3/6 份肝脏活检标本中细胞周期素 A 和人白细胞抗原(HLA)阳性. 其中 1 例 HCV RNA 阳性, HBV DNA 阴性. 这一研究结果表明, 除了 HBV、HCV 之外, 可能还会存在其他类型的肝炎病毒.

3 肝炎病毒蛋白对于细胞周期素 A 的调节机制

细胞周期素 A2 主要存在于细胞周期 G1/S 转变期间的细胞核之中, 在核膜遭到破坏之后的有丝分裂期就开始降解, 先前的研究发现存在细胞周期素 A2 与 HBV 表面抗原基因融合蛋白(S2A), 细胞周期素 A2 部分就是不被降解的结构区 δ 152, 位于内质网膜上, 可以逃避正常大鼠成纤维细胞的降解途径, 因此怀疑细胞周期素 A2 在肿瘤形成过程中发挥一定的作用. Faivre et al^[10] 的结果表明, 如果将不易降解的细胞周期素 A2- δ 152 融合蛋白, 以细胞内质网定位信号 PRL-A2 将其固定在内质网上, 就可以与 Ha-ras 一起促使正常细胞的恶性转化. 持续表达 PRL-A2 的细胞 REF52 具有较高比例的多核巨大细胞的比率, 经常看到多倍体细胞和异常的中心粒数目的细胞, 产生多极的纺锤体. 将这些细胞注射到去胸腺的小鼠中, 可以引起肿瘤, 有时在没有 Ha-ras 辅助的情况下也能发生肿瘤. 这些研究结果表明, 不易降解的细胞周期素 A2 在细胞内质网内的异常分布, 就可以干扰正常的细胞周期, 促进细胞产生非整倍体状态, 进而产生肿瘤.

HBV X 在慢性乙型肝炎患者的肝细胞癌的发生发展过程中具有重要作用. pX 主要是通过激活 RAS-RAF-MAPK 和 JNK 信号转导途径促进正常肝细胞的恶性转化. 为了探讨 pX 在肝细胞恶性转化过程中的作用机制, Tarn et al^[11] 构建了受四环素调控的 pX 表达系统, 并建立了稳定表达的细胞系 AML12, 包括分化型细胞系 3pX-1 和去分化型细胞系 4pX-1. 研究结果表明, pX 条件表达只能使 3pX-1 细胞系发生恶性转化, 体内外的激酶活性分析结果表明, pX 可以反向激活 3pX-1 细胞系 RAS-RAF-MAPK 和 JNK 的信号转导系统, 而在 4pX-1 细胞系中不同. 在 pX 转化的 3pX-1 细胞系中观察到持续的 pX 依赖性的 RAS-RAF-MAPK 信号转导系统的激活. 在非转化的 4pX-1 细胞系中仅观察到 pX 依赖性的 JNK 信号转导系统的激活. 不同的 pX 依赖性有丝分裂原信号激活途径可以激活不同的 cAMP 应答元件(CRP)的结合蛋白和 c-Jun, 决定了 3pX-1 和 4pX-1 细胞系不同的应答特点. 具有核定位信号的 pX-NLS 表达型细胞系, 可以激活 RAS-RAF-MAPK 信号转导途径, 显著降低恶性转化的潜能, 说明持续的 pX 介导的 RAS-RAF-MAPK 信号转导系统在肝细胞恶性转化过程中具有十分重要的意义.

多项研究证实 HBxAg 可促进多个信号转导途径, 还可以与多种转录因子蛋白结合, 特别是 cAMP 应答元

件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB). HBxAg 具有促进细胞周期早期进程的作用, 可能的机制是替代 TATA 结合蛋白相关因子 250(TATA-binding protein-associated factor 250, TAF(II)250)这种转录激活共刺激因子的作用, 或者是刺激细胞质中的信号转导系统. 为了研究HBxAg在细胞周期早期阶段的调节作用, Bouchard et al^[12]研究了HBxAg对于G0/G1期细胞检验点的异常. 发现TAF(II) 250是HBxAg激活细胞周期素A基因启动子和促进G0/G1细胞周期进展的必须依赖的因素. 因此, HBxAg在功能上不能替代TAF(II)250在转录激活和细胞周期调节中的作用, 相反, HBxAg具有激活细胞周期素A基因启动子的活性, 诱导细胞周期素A-CDK2复合体的形成, 促进静止期细胞进入G1期, 主要机制是通过对于Src酪氨酸激酶活性的激活. HBxAg刺激Src激酶活性, 促进细胞周期素基因表达水平的提高, 完成促进静止期细胞向G1期的转化, 但在S期附近就失去作用, 这可能是病毒复制过程中非常重要的事件.

细胞周期素在真核细胞的细胞周期调节中具有十分重要的作用. 人细胞周期素A的发现是在研究HCC的HBV DNA整合位点的基因序列时实现的. 人细胞周期素A与E2F转录因子的活性相关, 人乳头瘤病毒(HPV)E1A癌基因蛋白也可以与之结合, 这些发现说明细胞周期素A与肿瘤的信号转导环节有关. 以抗人细胞周期素A的抗体进行细胞内注射时, 细胞的DNA合成受到抑制, 进入到有丝分裂期的进展也受到抑制. 细胞周期素A与cdk2和cdc2结合, 使得细胞周期素A具有2种截然不同的激酶活性, 一种是在S期, 另外一种是在G2期. 这些结果说明细胞周期素A对于人细胞的细胞周期具有显著不同的调节机制.

细胞周期素是细胞周期的重要调节因素, 在正常细胞的恶性转化过程中具有十分复杂的作用. Berasain et al^[13]描述了一种新型的细胞周期素肿瘤激活方式. 细胞周期素A2的氨基末端部分如果被HBsAg部分编码序列所代替形成融合蛋白S2A时, 可以引起正常大鼠肾细胞的恶性转化, 还可以与ras一起转化大鼠胚胎成纤维细胞. 但是病毒蛋白基因和全长的细胞周期素A2或者是氨基末端缺失突变的细胞周期素A2都没有这种恶性转化作用. 融合蛋白S2A的恶性转化作用主要是因为具备与CDK分子的结合和激活作用. 这种融合蛋白如果在MRAIL序列发生突变, 那么就可以导致恶性转化作用的消失. 这种作用主要是与融合蛋白在内质网膜上的异常分布有关. 这些结果提示病毒感染之后造成的细胞周期调节蛋白在细胞内的分布异常, 是病毒感染引起正常细胞发生恶性转化的重要机制之一.

HBV感染可引起从急性病毒性肝炎到HCC的各种各样的临床表现. 在HBV基因组中存在数个启动子序列, 其转录活性受到肝细胞中转录因子蛋白的调控. HBV基因组编码的pX蛋白是目前唯一已知的病毒调节

蛋白, 在HBV的基因表达调节中具有十分重要的作用. Haviv et al^[14]研究了pX蛋白与细胞辅助激活因子之间的相互关系. pX可以重建野生型蛋白的激活功能, 代替与TAFII250和激活剂结合活性较弱的TBPAS突变. 温度敏感性细胞系ts13在限制温度条件下发生生长停止和细胞凋亡, 但转染pX基因之后可以得到部分恢复, 因此形成了pX依赖性的细胞生长. 这些研究结果表明pX可以抑制某些TBP和TAF(II)250突变表性, 说明pX可以使细胞克服对于holo-TFIID转录复合物的需要.

细胞周期素A可以结合p34cdc2和p33cdk2蛋白激酶, 在G1/S和G2/M两个检验点中都有十分重要的调节作用. 这种细胞周期素自身结合成多聚体形式, 并与E2F转录因子复合物、p33cdk2蛋白激酶和p107结合成蛋白复合体. 细胞周期素A是细胞周期的重要调节因子, 同时也是连接癌基因与抗癌基因之间的联系蛋白. 细胞周期素A在腺病毒感染细胞中与E1A病毒蛋白结合, 说明与肿瘤的形成过程有关. 在肿瘤研究中, 细胞周期素A还可以作为肿瘤形成的一个标志. Wolowiec et al^[15]有丝分裂有关的细胞周期素构成了组蛋白H1激酶复合物的调节亚单位. 根据其结构特点可以分成A、B两大类, 对于有丝分裂过程都是必须的. 细胞周期素A激活组蛋白H1激酶, 降解过程早于细胞周期素B, 在DNA的复制过程中具有十分重要的作用. 细胞周期素A、B在肿瘤形成过程中的作用机制, 或者是直接激活细胞周期素A的表达, 例如HBV DNA与细胞周期素A基因的整合和过表达或是与调节细胞增生的调节因子相结合, 或者是间接引起一些癌基因、抗癌基因蛋白的CDK依赖性的磷酸化修饰.

Strassburg et al^[16]的研究结果表明细胞周期素A还是抗细胞核抗体(ANA)识别的一种靶抗原. 研究选择了I型自身免疫性肝炎(AIH)患者61例, II型AIH患者21例, 原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者107例, 还有风湿性疾病如系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、混合型结缔组织病(MCTD)患者共42例和正常对照人群100例. 以间接免疫荧光技术检测ANA, 以杆状病毒载体-昆虫细胞系表达的细胞周期素A作为抗原检测特异性抗体. 结果表明, I型AIH患者和类风湿性关节炎患者可以检测到ANA. 抗细胞周期素A抗体的阳性率分别为12/61(20%)和6/42(14%). 在PBC患者、III型AIH患者和正常对照组ANA抗体阴性, 抗细胞周期素A自身抗体的阳性率为7-9%, II型AIH和SLE患者中检测不到. 某些患者的血清中可以检测到细胞周期素A的自身抗体. 抗细胞周期素A抗体可以识别45和50kD等2种分子量大小的蛋白, 说明这一抗体识别不同的抗原表位. 这一研究发现细胞周期素A是肝脏和非肝脏自身免疫性疾病时产生的自身抗体识别的靶抗原. 进一步的研究将阐明这一自身抗体的产生所具有的生物学和临床医学意义. 细胞周期素A自身抗体的存在, 说明这一细胞周期调节因子的生物学活性还有其他类型的调节途径.

Blanc et al^[17]对于人肝细胞受到表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF α)、爆发型肝炎患者血清等刺激时的应答及其机制。人肝细胞在包被胶原的培养板上培养。铺板12 h之后,分别以EGF(1-100 ng/mL)、TGF α (1-100 ng/mL)或血清(1-100 ml/L)刺激0-96 h。以³H-胸腺嘧啶核苷掺入测定DNA的合成。同时测定细胞周期素A表达水平和DNA含量,对于细胞进行计数。DNA高峰在刺激之后的48 h,细胞在受到20 ng/mL的EGF、40 ng/mL的TGF α 或50-100 ml/L的爆发性肝炎患者的血清刺激之后,与未刺激的细胞相比较,其生长指数分别提高4.35、5.4和4-6倍。细胞周期素A表达的最高水平也是DNA合成的最高时间点。72 h之后,DNA合成水平降低75-100%,细胞数目降低50%。这些研究结果表明成人肝细胞对于有丝分裂原的刺激具有明显的应答潜力。

利巴韦林是一种鸟嘌呤核苷类似物,与干扰素联合治疗慢性丙型肝炎可以显著改善慢性丙型肝炎患者肝组织的病理改变,降低血清转氨酶的水平,即使单独使用利巴韦林时也能取得一定的治疗效果。利用体外培养的原代人和大鼠的肝细胞,Ilyin et al^[18]研究了利巴韦林对于肝细胞的作用。在10-60 μ mol/L的浓度条件下,利巴韦林可以抑制蛋白的合成与分泌,而且这种抑制作用是时间和剂量依赖性的特点,这些作用通过对血清白蛋白和肝脏球蛋白的测定得到证实。³H-胸腺嘧啶掺入实验结果表明,利巴韦林对于HGF、EGF刺激的效应具有显著的抑制作用。利巴韦林对于DNA合成的抑制,造成细胞进入细胞周期的S期进展缓慢。这些结果以流式细胞学技术得到证实。细胞周期素A和cdc2等在细胞周期S期表达的蛋白的水平也受到抑制^[19-25]。50 μ mol/L的利巴韦林对于DNA合成的抑制,当加入80 μ mol/L鸟嘌呤时就可以得到逆转。这些研究结果表明,接近治疗剂量的利巴韦林,在体外就可以影响肝细胞的功能,因此必须考虑应用补充鸟嘌呤的办法拯救利巴韦林带来的肝细胞抑制作用。

4 参考文献

- Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Brechot C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990;343:555-557
- Wang J, Zindy F, Chenivresse X, Lamas E, Henglein B, Brechot C. Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1992;7:1653-1656
- De Mitri MS, Pisi E, Brechot C, Paterlini P. Low frequency of allelic loss in the cyclin A gene in human hepatocellular carcinomas: a study based on PCR. *Liver* 1993;13:259-261
- Zhang Y, Peng Z, Qiu G, Wang Z, Gu W. Overexpression of cyclin A in hepatocellular carcinoma and its relationship with HBx gene integration. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002;24:353-355
- Masaki T, Shiratori Y, Rengifo W, Igarashi K, Matsumoto K, Nishioka M, Hatanaka Y, Omata M. Hepatocellular carcinoma cell cycle: study of Long-Evans cinnamon rats. *Hepatology* 2000;32:711-720
- Werling K, Szepesi A, Szentirmay Z, Schaff Z, Tulassay Z, Szalay F. Effect of hepatitis C virus on hepatocyte prolifera-

- tion and DNA ploidy in patients with chronic hepatitis C. *Z Gastroenterol* 2001;38:553-558
- Chao Y, Shih YL, Chiu JH, Chau GY, Lui WY, Yang WK, Lee SD, Huang TS. Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:985-990
- Paterlini P, Flejou JF, De Mitri MS, Pisi E, Franco D, Brechot C. Structure and expression of the cyclin A gene in human primary liver cancer. Correlation with flow cytometric parameters. *J Hepatol* 1995;23:47-52
- Romeo R, Pol S, Demeret C, Thiers V, Kremsdorf D, Cuillierier E, Berthelot P, Brechot C. Evidence of non-A, non-B, non-C infection in chronic hepatitis by polymerase chain reaction testing for hepatitis B and C viruses. *J Hepatol* 1995;22:125-129
- Faivre J, Frank-Vaillant M, Poulhe R, Mouly H, Jessus C, Brechot C, Sobczak-Thépot J. Centrosome overduplication, increased ploidy and transformation in cells expressing endoplasmic reticulum-associated cyclin A2. *Oncogene* 2002;21:1493-1500
- Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:34671-34680
- Bouchard M, Giannakopoulos S, Wang EH, Tanese N, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway. *J Virol* 2001;75:4247-4257
- Berasain C, Patil D, Perara E, Huang SM, Mouly H, Brechot C. Oncogenic activation of a human cyclin A2 targeted to the endoplasmic reticulum upon hepatitis B virus genome insertion. *Oncogene* 1998;16:1277-1288
- Haviv I, Matza Y, Shaul Y. pX, the HBV-encoded coactivator, suppresses the phenotypes of TBP and TAFII250 mutants. *Genes Dev* 1998;12:1217-1226
- Wolowiec D, Ffrench M. Cyclins A and B: redundancy and specificity. *Pathol Biol (Paris)* 1993;41:547-553
- Strassburg CP, Alex B, Zindy F, Gerken G, Luttig B, Meyer zum Buschenfelde KH, Brechot C, Manns MP. Identification of cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic autoimmune diseases. *J Hepatol* 1996;25:859-866
- Blanc P, Etienne H, Daujat M, Fabre I, Zindy F, Domergue J, Astre C, Saint Aubert B, Michel H, Maurel P. Mitotic responsiveness of cultured adult human hepatocytes to epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and human serum. *Gastroenterology* 1992;102:1340-1350
- Ilyin GP, Langouet S, Rissel M, Delcros JG, Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C. Ribavirin inhibits protein synthesis and cell proliferation induced by mitogenic factors in primary human and rat hepatocytes. *Hepatology* 1998;27:1687-1694
- Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
- Ozturk M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:235-242
- D'Errico A, Fiorentino M, Ponzetto A, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Brechot C, Scoazec JY, Grigioni WF. Liver hepatocyte growth factor does not always correlate with hepatocellular proliferation in human liver lesions: its specific receptor c-met does. *Hepatology* 1996;24:60-64
- Brechot C. Oncogenic activation of cyclin A. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:11-18
- Wolowiec D, Ffrench M. Mitotic cyclins-new possibilities for examining mechanisms of neoplasm growth. *Postepy Hig Med Dosw* 1993;47:183-191
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 1992;11:961-971
- Blanquet V, Wang JA, Chenivresse X, Henglein B, Garreau F, Brechot C, Turleau C. Assignment of a human cyclin A gene to 4q26-q27. *Genomics* 1990;8:595-597

乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1255-1258
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1255.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝细胞癌(HCC)发生发展之间的密切关系, 早已被大量的临床医学和临床流行病学资料所证实^[1]. 随着细胞周期(cell cycle)调节的分子生物学机制研究不断深入, 特别是关于细胞周期素(cyclin)、细胞周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的发现, 使得细胞周期这一经典的概念又有了新的内容, 大大促进了肿瘤形成的分子生物学研究的进展^[2]. 多年来积累了丰富的资料表明, HCC与细胞周期调节紊乱有关, HBV、HCV感染可以引起细胞周期调节的紊乱, 这种异常调节, 可以是肝炎病毒蛋白对于细胞周期素、CDK分子的直接调节, 同时也可以通过对CDK激酶活性具有广泛抑制作用的p21蛋白的异常调节^[3-5].

1 肝细胞癌与细胞周期调节异常

哺乳动物细胞的细胞周期受到CDK和CDK抑制因子的共同调节, 这些蛋白表达水平异常或它们之间相互作用的异常, 都将导致肿瘤的发生. Kohzato et al^[6]研究了细胞周期素E和CDK2在肝细胞癌中的作用. 对一系列的HCC、肝硬化组织和肝炎组织进行研究, 对LEC近交大鼠的HCC模型也进行了研究, 石蜡切片免疫组织化学技术检测细胞周期素E和CDK2的表达, 人和大鼠的HCC组织中有细胞周期素E和CDK2的共同表达, Western blot杂交以及CDK2蛋白激酶活性的分析结果表明, 细胞周期素E和CDK2蛋白, 以及CDK2的蛋白激酶活性都随着HCC的发展而逐渐升高, 细胞周期素E和CDK2与临床病理特点之间的相互关系研究结果表明, 细胞周期素E与肿瘤的分级、增生细胞核抗原(PCNA)指数、以及CDK2表达等指标之间密切相关. CDK2的过表达似乎与HCC的低度分化有关. 这些研究

结果表明细胞周期素E和CDK2在HCC中具有十分重要的作用.

在HBV相关的HCC发展中, 通常需要20-40a的肝脏炎症、坏死的持续过程. 但儿童期HCC的发生机制与之明显不同. Kim et al^[7]发现癌基因c-met的突变仅在儿童期HCC中发现, 成人期HCC没有. 对9例儿童期HCC和9例40岁以上的成年期HCC进行对比研究, G1期调节蛋白如细胞周期素D1、E和CDK4的表达以免疫组织化学技术进行了研究. 同时对于染色体8p、13q、17p的杂合子丢失(loss of heterozygosity, LOH)进行调查. 儿童期HCC的细胞周期素D1表达水平显著低于成年期HCC患者, 但细胞周期素E和CDK4表达水平无明显差别. 染色体13q的LOH频率在儿童期HCC稍高, 8p和17p位点没有显著差别. 结果提示儿童期HCC可能与细胞周期素D1表达水平的异常没有显著的相关性, 但是13q的LOH可能与之有关.

在包括HCC的一些肿瘤中, 经常见到细胞周期素基因的放大现象, 特别是细胞周期素D、E, 是正常细胞恶性转化的重要步骤. 但是大多数细胞周期相关的蛋白激酶的变化及其在肿瘤发生中的作用, 目前还不十分清楚. Masaki et al^[8]利用Western blot杂交技术研究了LEC大鼠HCC移植瘤的细胞周期素和CDK的活性, 如细胞周期素D1、E、A、H、CDK1(Cdc2)、CDK4、CDK6. 细胞周期素D1、E、A、CDK4、CDK6、Cdc2、CDK7、Wee1的活性以胶内激酶(in-gel kinase)活性分析法测定. 在HCC移植瘤中, 细胞周期素D1、E、CDK4、细胞周期素A、Wee1蛋白和激酶活性显著升高, 与HCC进展期显著相关, 特别是在慢性肝炎向HCC转化中尤其如此. 尽管Cdc2在正常、肝炎肝组织中轻度升高, 但在慢性肝炎向HCC的转换过程中却没有显著变化, CDK6、CDK7的蛋白激酶活性也保持不变. 表明Cdc2蛋白激酶在慢性肝炎向HCC的转化过程中具有十分重要的作用, 尤其是细胞周期素D1、CDK4、细胞周期素E、细胞周期素A和Wee1的变化, 可能在慢性肝炎逐渐发展为HCC的过程中具有十分重要的作用.

CDK相关的蛋白磷酸酶(CDK-associated protein phosphatase, KAP)是人的一种双特异性蛋白磷酸酶, 可以催化CDK2在苏氨酸160位点发生去磷酸化, 而且是一种细胞周期素依赖性的过程. Yeh et al^[9]对于这种蛋白酶是否在HCC中有突变的现象, 利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对HCC组织中KAP mRNA表达进行了分析. 8/14例晚期HCC活检标本和6/13例外科手术切除的HCC标本以及2例肿瘤周围组织中都有异常的KAP转录表达. 随后对于这些突变的KAP基因进行克隆分析, 酵母双杂交技术分析结果, 发现5/7典型的KAP突变体都失去与CDK2的相互作用. 说明在HCC的形成过程中, KAP突变也是参与其中的一个重要因素.

2 乙型肝炎病毒与细胞周期调节异常

有丝分裂细胞周期素组成了组蛋白H1激酶复合物的调节亚单位. 根据细胞周期素的一级结构可以分成A、B2种, 都是细胞有丝分裂调节所必需的调节蛋白. 细胞周期素A激活组蛋白H1激酶的活性, 蛋白裂解破坏在细胞周期素B之前, 在DNA复制过程中具有十分重要的调节作用. 细胞周期素A和B在肿瘤发生中具有一定的作用, 机制不同, 象HBV DNA与细胞周期素A之间的结合及功能异常, 或者作为一种复合物形式产生异常调控, 或在癌基因或癌基因异常情况下, 在CDK催化作用下发生异常磷酸化修饰.

细胞周期素在所有的真核细胞的细胞周期调节中都具有十分重要的意义. 细胞周期素A在HBV DNA的整合以及HCC的发生中具有重要的意义, 此外与细胞周期素A转录因子蛋白E2F结合成复合物形式, 腺病毒的E1A可以阻滞这种蛋白复合物的形成. 这些研究结果表明细胞周期素A是肿瘤形成信号作用的一个靶点. 将抗细胞周期素A的抗体注射入细胞内之后, 细胞的DNA合成及进入有丝分裂的细胞数目受到严重影响. 细胞周期素A与CDK2和Cdc2都能结合, 说明具有2种不同的激酶活性. 一种活性在S期发挥作用, 另一种活性在G2期发挥作用. 这些结果表明, 细胞周期素A是人细胞周期调节的一个重要环节.

HBV的pX蛋白在慢性HBV感染者的HCC发生中有一定的作用. 为了研究pX在细胞恶性转化中的作用, Lee et al^[10]应用永生化的AML12肝细胞建立了分化型细胞模型3pX-1和去分化型细胞模型4pX-1, 但只有3pX-1出现pX介导的恶性转化, 信号转导涉及Ras-Raf-MAPK的激活. 表达pX的非转化型4pX-1细胞表现出持续的、pX依赖性的JNK信号系统的激活. 对于pX介导的这2种不同的生长方式进行比较, 对3pX-1、4pX-1细胞周期的特点进行了研究. 表达pX的转化型3pX-1表现出pX依赖性的G1、S、G2/M期进展, 其标志是细胞周期素D1、A、B1的诱导, Cdc2激酶的激活. 表达pX的非转化型4pX-1细胞系表现出pX依赖性G1、S期的进入, 之后是S期的停滞, 没有Cdc2激酶的激活. 有意思的是4pX-1具有pX诱导的p21(Cip1)、p19(ARF)、bax、胰岛素样生长因子结合蛋白3(IGFBP-3)的表达. 尽管pX介导的生长抑制和细胞凋亡基因的表达, 还有pX依赖性Cdc2激活的缺乏, 4pX-1细胞并没有pX依赖性的G2/M的阻滞或细胞凋亡. 诺考达唑(Nocodazole)处理后, G2/M期阻滞的4pX-1细胞表现出pX依赖性的多形核细胞的形成, 类似表达人T嗜淋巴病毒I(HTLV-I)的Tax蛋白的细胞特征. 因此认为4pX-1细胞中, 因为pX异常调节了G2/M的细胞周期检验点, 因而免于pX表达诱导的细胞凋亡过程的发生.

几项研究结果提示HBxAg可与cAMP应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)结

合, HBxAg也能促进早期的细胞周期进展, 可能的机制就是代替TATA结合蛋白相关因子250(TATA-binding protein-associated factor 250, TAF(II)250)的功能, 或者刺激细胞质中的信号转导系统. 为了研究HBxAg对于细胞早期阶段的影响机制, Bouchard et al^[11]研究了HBxAg促进处于生长阻滞阶段细胞通过G0和G1期检验点的作用和机制. 结果证实TAF(II)250是HBxAg激活细胞周期素A启动子所必须具备的因子, 也是HBxAg促进细胞从G0到G1期的转变. HBxAg在功能上并不是替代TAF(II)250, 而是HBxAg激活细胞周期素A的启动子转录活性, 诱导细胞周期素A-CDK2复合物蛋白激酶的活性, 促进静止期细胞进入到G1期, 主要机制就是通过Src酪氨酸蛋白激酶的激活. HBxAg刺激Src蛋白激酶的活性以及细胞周期素的基因表达, 强迫处于静止期的细胞进入到G1期, 但在S期速度减慢, 更有利于病毒的复制.

HBxAg是一种分子量很小的转录激活因子, 是病毒的感染所必需的. HBxAg与HBV基因的转基因小鼠肝脏肿瘤的发生发展有关. HBxAg激活Ras-Raf-MAPK信号转导链, 激活转录因子蛋白AP-1和NF- κ B, 刺激细胞DNA的合成. Benn et al^[12]的研究结果表明HBxAg可以刺激细胞周期的进展, 缩短细胞在G0的时间至少12 h, 加速进入到S期, 同时也加速细胞通过G0/G1和G2/M2个细胞周期检验点. 与血清因子的刺激相比较, HBxAg蛋白可显著增加CDK2和CDC2蛋白激酶的活性, 以及分别与细胞周期素E、A或B结合而成的复合物的蛋白激酶活性. HBxAg基因的表达可以导致细胞克服细胞对于血清的依赖性 or 显著降低由此带来的细胞生长抑制. HBxAg和血清刺激都需要RAS信号转导通路的参与, 但只有HBxAg可以缩短检验点所需要的时间. HBxAg因此通过RAS信号转导途径促进细胞生长, 与此过程相关的另外第二种因素可以持续激活JUN或p53蛋白, 也参与了这一调节过程. 这些研究结果表明HBxAg参与了HBV感染引起肝脏肿瘤的过程, 主要机制是导致细胞周期检验点的异常, 对于遗传特性不稳定的细胞进行选择, 并积累不能进行修复的致癌突变.

HBV核心蛋白的磷酸化修饰是前基因组RNA包装成病毒核颗粒的先决条件, 但是究竟是细胞内什么样的蛋白激酶催化HBV核心蛋白的磷酸化修饰一直不十分清楚. Daub et al^[13]对于HuH-7细胞中95和115 kD的2种蛋白激酶的活性进行研究, 因为研究提示这2种蛋白可以与HBV核心蛋白结合, 而且可以使HBV核心蛋白的富含精氨酸残基的羧基末端发生磷酸化修饰. 95 kD的蛋白激酶纯化以后, 发现是与SR蛋白特异性激酶1(SR protein-specific kinase 1, SRPK1), 基于这些发现, 115 kD的蛋白激酶可以看作是相关的一种蛋白激酶, 即SRPK2. 在体外, 这2种SRPK都可以催化HBV核心蛋白的磷酸化修饰, 而且磷酸化修饰的位

点相同,都是同一个丝氨酸位点,与体内的磷酸化修饰一样.在总的细胞裂解液中,主要的HBV核心蛋白激酶活性与SRPK1、SRPK2蛋白激酶活性相同.研究结果还清楚地表明,以前曾经认为在HBV核心蛋白磷酸化修饰中具有重要作用的蛋白激酶Cdc2、CDK2、PKC都没有催化HBV核心蛋白磷酸化修饰的活性.研究表明,SRPK1、SRPK2是HBV感染过程中催化HBV核心蛋白磷酸化修饰的主要的蛋白激酶,可能是设计抗HBV治疗药物的一个新型靶位.

嗜肝病毒都是具有包膜的病毒,其基因组DNA包裹到核壳体中,完成病毒DNA的复制和合成.当有病毒包膜蛋白时,含有DNA的核壳体可以装配成完整的病毒,但当没有病毒的包膜蛋白时,核壳体就将其中的病毒DNA运送到细胞核中,这一步就象是病毒刚开始感染时病毒DNA的运送方式,但是触发亚病毒核壳体中DNA向细胞核运送的机制目前还不十分清楚. Barrasa et al^[14]在HBcAg分子的结构中鉴定出一类似丝氨酸或苏氨酸激酶的识别位点,是核壳体形成的一个关键结构位点.应用鸭乙型肝炎病毒(DHBV),证实这一位点的突变对于DNA的装配、DNA的复制和核心蛋白的稳定性等都具有十分显著的影响.这一结构位点的序列特征还是病毒复制所在的细胞类型依赖性的.

3 丙型肝炎病毒与细胞周期调节异常

HCV核心蛋白在肝细胞癌中具有十分重要的地位. Cho et al^[15]对HCV核心蛋白通过对细胞周期素E的调节,促进细胞增生的作用进行了研究. HCV核心基因稳定转化的大鼠细胞系Rat-1与母本细胞相比较细胞增生率显著升高,细胞周期素E的表达与相关的蛋白激酶的活性在HCV核心基因稳定转染的细胞系中显著升高.在HCV核心基因转染的细胞系中,细胞周期素E mRNA的转录水平也显著提高.认为HCV核心蛋白具有促进细胞增生的作用,主要机制就是通过对细胞周期素E表达的调节,说明HCV核心蛋白在HCC的形成过程中具有十分重要的作用.

4 肝炎病毒与p21基因调节异常

肝细胞增生率的增加是发生肝细胞癌的一个危险因素, Lee et al^[16]研究了小鼠成纤维细胞NIH 3T3中HCV核心蛋白对于CDK抑制因子p21蛋白编码基因启动子的活性的抑制作用.通过p21基因启动子报告基因表达载体的瞬时转染实验结果表明,转化生长因子 β (TGF β)应答元件(TGF- β -responsive element, T β RE)位于p21基因启动子的-83~-74 nt之间的核苷酸序列,是其应答的结构基础. TGF β 诱导p21启动子的转录活性,受到HCV核心蛋白的显著抑制,在Smad7存在条件下,这种抑制作用几乎是完全的. HCV核心蛋白可以刺激NIH 3T3细胞的生长,可以克服TGF β 诱导的生长抑制作用,但不能克服丁酸盐(butyrate)的生长抑制作用,

表明HCV核心蛋白是通过TGF β 信号途经抑制p21的转录表达来实现促进细胞的生长作用的.

HBV和HCV重叠感染十分常见,而且可以引起更重的肝病,增加罹患HCC的几率. Han et al^[17]的研究结果表明, HBxAg与HCV核心蛋白在抑制p21基因表达方面具有相加作用, p21基因启动子序列中的T β RE和Sp1位点分别是HCV核心蛋白和HBxAg的调节作用位点.这2种病毒蛋白对于细胞生长的促进作用也具有相加性质,可以认为是HBV和HCV共同促进HCC的发生.

Yoshida et al^[18]研究了HCV核心蛋白对于培养的细胞中的p21/Waf1/Cip1/Sdi1(p21/Waf1)的调节作用,尽管没有证据表明HCV核心蛋白与p21/Waf1蛋白在细胞内分布在同一位点,表达HCV核心蛋白的细胞比正常对照细胞中p21/Waf1的表达显著减弱,但Northern blot结果表明2种细胞p21/Waf1 mRNA水平很接近,说明HCV核心蛋白抑制p21/Waf1的表达发生在转录后水平. p21/Waf1蛋白的降解在2种细胞系中没有显著差别,表明p21/Waf1蛋白在2种细胞系中的稳定性没有显著差别,但这种蛋白在细胞中积聚时, HCV核心蛋白对之没有显著的影响.因此要考虑到p21/Waf1蛋白的合成、成熟、细胞和转运等环节是否有障碍,或仅仅是对新合成的蛋白有降解作用.在2种细胞系中, p21/Waf1在细胞内的积聚可以部分地被蛋白体抑制物和钙相关蛋白(calpain)抑制物所抑制.体外激酶活性分析结果表明, p21/Waf1对CDK2激酶活性具有抑制作用,而HCV核心蛋白可以部分恢复这种抑制作用.综合上述结果, HCV核心蛋白抑制p21/Waf1蛋白表达的作用是在转录后水平上,影响p21/Waf1在细胞中的功能.

HBV X蛋白可以改变细胞对于细胞凋亡诱导因素作用的敏感性,也可以对于细胞周期进行异常调节. Park et al^[19]对于p53基因发生突变的HCC细胞系Hep3B进行了研究,在稳定表达X蛋白的Hep3B细胞系中, p21(waf1/cip1)蛋白和mRNA水平显著升高,与CDK2之间的结合能力增加,但显著抑制细胞周期素E与CDK2之间的结合,以及组蛋白H1的磷酸化修饰.利用基因突变技术证实, X蛋白对于p21启动子应答的序列在转录起始位点上游的-1185至-1482 nt之间.对p21启动子基因区的突变研究结果表明, HBV X蛋白的应答位点位于ets因子结合位点处.这一研究结果表明,在肝癌细胞中, X蛋白可以克服p53基因丢失的效应,直接引起其下游信号转导途径的改变,因此认为p21(waf1/cip1)在HCC发生过程中,特别是在p53基因缺失条件下,具有十分重要的地位和作用.

p21蛋白是一种CDK蛋白激酶广谱的抑制因子,在肝再生过程中对于肝细胞的细胞周期也有显著的调节作用. Crary et al^[20]应用免疫组织化学技术对p21蛋白、Ki-67在肝脏疾病中的作用和意义进行了研究.正常的肝细胞和非酒精性脂肪肝炎(NASH)肝脏中p21、Ki-67

表达水平很低,在酒精性肝炎肝脏中表达水平显著升高.在慢性丙型肝炎患者中,p21表达与Ki-67显著相关,而且与炎症和肝纤维化的分级、分期显著相关.说明在炎症中,肝损伤可以诱导p21的表达,而且与肝脏炎症和肝纤维化的程度有关^[21-24].

5 参考文献

- Hoppe-Seyler F, Crnkovic-Mertens I, Denk C, Fitscher BA, Klevenz B, Tomai E, Butz K. Peptide aptamers: new tools to study protein interactions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78: 105-111
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 1992;11:961-971
- Chuang SE, Cheng AL, Lin JK, Kuo ML. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. *Food Chem Toxicol* 2000;38:991-995
- Chuang SE, Kuo ML, Hsu CH, Chen CR, Lin JK, Lai GM, Hsieh CY, Cheng AL. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000;21:331-335
- Ramljak D, Jones AB, Diwan BA, Perantoni AO, Hochadel JF, Anderson LM. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α -associated overexpression of cyclin D1, CDK4, and c-Myc during hepatocarcinogenesis in *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice. *Cancer Res* 1998;58:3590-3597
- Kohzato N, Dong Y, Sui L, Masaki T, Nagahata S, Nishioka M, Konishi R, Tokuda M. Overexpression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 is correlated with development of hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2001;21:27-39
- Kim H, Lee MJ, Kim MR, Chung IP, Kim YM, Lee JY, Jang JJ. Expression of cyclin D1, cyclin E, CDK4 and loss of heterozygosity of 8p, 13q, 17p in hepatocellular carcinoma: comparison study of childhood and adult hepatocellular carcinoma. *Liver* 2000;20:173-178
- Masaki T, Shiratori Y, Rengifo W, Igarashi K, Matsumoto K, Nishioka M, Hatanaka Y, Omata M. Hepatocellular carcinoma cell cycle: study of Long-Evans cinnamon rats. *Hepatology* 2000; 32:711-720
- Yeh CT, Lu SC, Chen TC, Peng CY, Liaw YF. Aberrant transcripts of the cyclin-dependent kinase-associated protein phosphatase in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:4697-4700
- Lee MN, Jung EY, Kwun HJ, Jun HK, Yu DY, Choi YH, Jang KL. Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF- β pathway. *J Gen Virol* 2002; 83:2145-2151
- Bouchard M, Giannakopoulos S, Wang EH, Tanese N, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway. *J Virol* 2001;75:4247-4257
- Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11215-11219
- Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137
- Barrasa MI, Guo JT, Saputelli J, Mason WS, Seeger C. Does a cdc2 kinase-like recognition motif on the core protein of hepadnaviruses regulate assembly and disintegration of capsids? *J Virol* 2001;75:2024-2028
- Cho JW, Baek WK, Suh SI, Yang SH, Chang J, Sung YC, Suh MH. Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin E expression levels. *Liver* 2001;21:137-142
- Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
- 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
- Yoshida I, Oka K, Hidajat R, Nagano-Fujii M, Ishido S, Hotta H. Inhibition of p21/Waf1/Cip1/Sdi1 expression by hepatitis C virus core protein. *Microbiol Immunol* 2001;45:689-697
- Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1 \rightarrow S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000;19:3384-3394
- Crary GS, Albrecht JH. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology* 1998;28:738-743
- Berasain C, Patil D, Perara E, Huang SM, Mouly H, Brechot C. Oncogenic activation of a human cyclin A2 targeted to the endoplasmic reticulum upon hepatitis B virus genome insertion. *Oncogene* 1998;16:1277-1288
- Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol* 1997;71:9045-9053
- Wolowiec D, Ffrench M. Cyclins A and B: redundancy and specificity. *Pathol Biol (Paris)* 1993;41:547-553
- Wolowiec D, Ffrench M. Mitotic cyclins—new possibilities for examining mechanisms of neoplasm growth. *Postepy Hig Med Dosw* 1993;47:183-191

乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响

张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林

张忠东, 成军, 钟彦伟, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林. 乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1258-1260

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1258.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染,不仅引起急、慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生密切相关.虽然HBV和HCV感染与肝细胞癌之间的关系已经得到确定,但是具体的分子生物学机制还有许多工作要做.肝炎病毒蛋白可以与自身结合形成同二聚体,或者与病毒的其他蛋白、肝细胞蛋白结合形成异二聚体,从而对肝细胞的生长、代谢及恶性转化产生影响^[1, 2].丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK)是信号转导途径中的重要成员,肝炎病毒蛋白与MAPKK作用可以改变信号转导,可对细胞的分化、增生等产生影响.

1 MAPK的级联反应

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是介导细胞反应的重要信号,普遍存在于多种生物,包括酵母和哺乳动物细胞.

自1991年Sturgill et al.^[3]从动物细胞中鉴定出细胞外信号调节激酶(ERK), MAPK信号转导通路的研究取得迅速发展. 除ERK外, 还发现克隆了c-jun氨基末端激酶(JNK)/应激激活蛋白激酶(SAPK)、p38和ERK5等MAPK亚族. 该激酶级联首先在促细胞分裂素所致的微管结合蛋白(MAP)激酶活化的途径中发现, 故称MAP激酶级联. MAPK级联的核心由3个Ser/Thr蛋白激酶: MAPK、MAPKK、MAPKKK组成. 级联方向为MAPKKK-MAPKK-MAPK. MAPK信号转导通路采用高度保守的三级激酶级联转导信号, 细胞外刺激通过某些环节使MAPKK激活, 转化MAP激酶激酶(MAP kinase kinase, MAPKK), 然后通过对苏氨酸和酪氨酸双位点磷酸化激活MAPK. 细胞外刺激作用于细胞, 通过多级激酶级联使MAPK激活, 激活的MAPK可通过磷酸化转录因子、细胞骨架相关蛋白、酶类等多种底物调节细胞生理过程. 因此, 促细胞分裂素刺激的胞内信号级联反应概括为4步连续反应: (1)Ras的活化; (2)Raf-1的活化; (3)MAPK级联的活化; (4)核效应. 哺乳动物细胞中, 存在三条平行的MAPK级联反应, 有ERK途径、JNK/SAPK、p38途径. 后两条途径主要对抑制细胞生长的刺激产生应答, 如化学制剂、渗透压改变、热休克、蛋白合成抑制剂、脂多糖(LPS)和肿瘤坏死因子(TNF)等. 三条MAPK级联的Ser/Thr蛋白激酶具有相似的一级结构、活化机制和被底物识别的最小序列(TYY). 同一刺激能引起不同的平行级联的应答, 表明这些平行的途径之间存在互相影响的通路. 三条途径重要的区别在于MAPK级联上游激酶活化的机制不同, ERK途径的MAPK级联上游激酶Raf-1被Ras直接活化, 在凋亡信号启动的细胞凋亡过程中, PAK65可能是JNK和p38途径的MAPK级联上游激酶, 受Ras的间接调节而被活化^[4].

2 MAPKK活性的调节

除了蛋白酪氨酸激酶外, 在信号转导中起着重要作用的是丝氨酸/苏氨酸磷酸化激酶. MAPKK磷酸化并激活MAPK, 而MAPKK被上游的蛋白激酶如Raf、Mos和MAPKK激酶(MAPKKK)激活^[5]. 最常见的如Raf-1, 是已知的许多激活MAPKK的细胞激酶之一, 在细胞对刺激产生增生响应的Ras信号转导通路中起着关键作用. 被激活的Ras(即Ras-GTP)就结合在Raf-1的N-末端域上. 在与Ras-GTP结合并且其酪氨酸被磷酸化后, Raf-1就激活MAPKK. 例如, 在白介素-2(IL-2)刺激下, Raf-1的酪氨酸被激活的SRC激酶(pp60^{SRC})磷酸化. 这个磷酸化作用对于Raf-1与Ras-GTP结合, 并激活激酶MAPKK是绝对必须的^[6]. 许多因子都可以充分地激活Raf-1, 例如, 蛋白激酶C(PKC), ras-GTP和被激活的SRC激酶. 然而, 这些因子并不总是导致同样的最终结果, 相反地, 常常产生各种各样不同的响应. 比如, 蛋白激酶C将Raf-1磷酸化, 随后用佛波酯处理, 尽管这使得Raf-1的自身磷酸化增加了, 但是, MAPKK没有

激活. 而一旦MAPKK被Raf-1激活, 他就会把目标瞄准MAP激酶的异构体. 这些胞质丝氨酸/苏氨酸MAP激酶的异构体, 即Erk-1和Erk-2被激活和向细胞核转移是信号转导通路上游Ras激活的最终结果. 如上所述, Raf-1激活了MAPKK, 后者则将MAPK的苏氨酸和酪氨酸磷酸化而将他激活. 然后, MAPK磷酸化, 并激活细胞核的转录因子, 包括c-myc、c-jun、c-fos、核因子-IL-6(NF-IL-6)、细胞质磷脂酶A2(cPLA2)、表皮生长因子受体(EGF-R)和蛋白质激酶, 如c-Raf-1、MAPKK和p90^{rsk}(蛋白磷酸酯酶-1, PP-1的糖原结合亚基)^[4, 6]. 用MEK2作为酵母双杂交的诱饵, 除c-Raf和KSR外, A-Raf是和MEK2作用的新配体. 体外结合实验证实了这种作用, 作用点位于代表A-Raf激酶区的255-606氨基酸残基(aa)末端^[7]. Mos是生殖细胞特性的丝氨酸/苏氨酸激酶, 是卵母细胞成熟必需的. Mos刺激MAPK通过直接磷酸化和活化MAPKK, MAPK被双特异激酶MEKs激活^[8]. MAPKK是一种双特异蛋白激酶, 磷酸化和激活MAPK, 本研究用四种鼠单克隆抗体(Y1-6、Y1-7、Y3-6和Y3-11)特异结合爪蟾MAPKK. 在体外Y1-6、Y1-7、Y3-6有效的抑制MAPKK活性. Y1-6抑制诱导的MAPK活性, 将其注入爪蟾卵母细胞可致生发中心破裂, 而突变的Y1-6却不能. 三种中和抗体Y1-6、Y1-7、Y3-6与MAPKK的NH2末端1-23 aa结合, 而无中和作用的Y3-11与MAPKK的33 aa和67 aa结合. 合成多肽对应MAPKK的2-17 aa压抑野生型Y1-6的中和作用, 说明中和抗体结合MAPKK的NH2末端抑制MAPKK的激酶活性^[9].

3 MAPKK的生物学作用

丝裂原活化蛋白激酶MAPK是介导细胞反应的重要信号, 普遍存在于多种生物, 包括酵母和哺乳动物细胞. 在哺乳动物细胞鉴定出细胞外信号调节激酶ERK, c-jun氨基末端激酶(JNK)/应激激活蛋白激酶(SAPK)、p38和ERK5等MAPK亚族. 每种MAPK被不同的信号分子活化, 如ERK被MAPKK的MKK1、MKK2激活; p38MAPK被MKK3和MKK4-MKK6激活; JNK被MKK4激活^[10, 11]. JNK通过苏氨酸-183和酪氨酸-185的双磷酸化而被激活, MKK4是唯一的JNK信号转导通路的成员的MAPKK^[12-14]. 生物化学研究证明MKK4磷酸化和活化JNK^[12-14]. 然而MKK4的功能并不仅仅局限在JNK信号转导通路, 因为MKK4也磷酸化和激活p38MAPK^[10, 11]. MKK4激活JNK和p38MAPK的特性提供一种机制, 其说明用细胞因子或环境应激处理的细胞中这些MAPK活化的统一^[15]. 然而活性统一不总被观察到, 如在肝中用氧化应激观察细胞内的新陈代谢和以AP-1为目标的蛋白-DNA复合体的形成, 证明肝中氧化应激下的JNK和p38MAPK的信号转导路径机制不同^[16]. 原癌基因Raf的产物MAPKK1和MAPKK2在信号通路的功能影响细胞增生和分化. 其亚型以两种途径调节: (1)MAPKK1,

而不是MAPKK2被周期素依赖激酶p34cdc2磷酸化而失活; (2)p21Ras和Raf/MAPKK1形成三重复合体, 而不是和Raf/MAPKK2. 为进一步研究两种形式的调节和功能特性, 比较v-Mos的活化形式, 检测在培养细胞中介导的转录及形态学反应. v-Mos增强全部形式的酶活性, 约有600倍. MAPKK2变异可激活MAPKK1, 说明构象改变导致活性相似^[17]. JNK的酪氨酸和苏氨酸磷酸化而被激活, 报道新的MAPKK家族的MKK7作为JNK的激活剂, 在体外证明MKK7磷酸化JNK, 而不是p38和ERK, MKK7在培养细胞中的表达激活JNK信号转导通路, 因此MKK7是JNK通路中的新成员^[18].

4 乙型和丙型肝炎病毒与MAPKK的信号转导

MAPKK活性在表达HCV核心的细胞. MAPKK是JNK活化的上游调节剂. MAPKK活性的缺陷可显示下游JNK和AP-1功能的缺失. 在表达丙型肝炎病毒核心蛋白的细胞中观察到MAPKK活性被TNF诱导. 不同时间用TNF刺激对照和试验组. TNF处理30和60 min即可检测到磷酸化的提高. 随后, 对照组和转染HCV核心DNA的细胞组用TNF处理30 min, 磷酸化的MAPK用Western blot分析. 在0.1 nmol/L的TNF处理时对照组的MCF-7细胞MAPK活化发生, 但是转染HCV核心DNA的细胞有高的基础活性而用TNF刺激不会进一步激活MAPKK^[19]. HCV基因型1a和3的核心蛋白激活MEK1及Erk1/2, 而且HCV核心的表达导致Raf1和MAPKK高度活化, 体外实验证实Erk1/2和下游的转录因子Elk1对表皮生长因子(EGF)的反应延长^[20]. MAPK在细胞分化、转化及应激反应中起着关键作用, HCV核心蛋白具有致癌作用, 在BALB/3T3表达的核心蛋白激活MEK-ERK通路, 为进一步说明其作用, 在几种细胞系瞬时表达核心蛋白, 用Gal4-Elk1萤虫素酶实验研究信号转导通路, 发现核心蛋白增强MEK下游的Elk1活化作用, 而不影响ERK活性和Elk1的磷酸化^[21]. 乙型肝炎病毒X蛋白对病毒复制是必需的^[22, 23], 被广泛地认为是转录激活者^[24]. X蛋白依赖他的亚细胞定位可以通过两种不同的机制刺激基因表达^[25]. 许多依赖RNA聚合酶II启动子, 如包含AP-1和NF- κ B位点的启动子, 在细胞质X蛋白刺激Ras-Raf-MAPKK (MEK)-MAPK级联反应和JNK通路的活化诱导其表达^[26-28].

5 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:86-198
- 2 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 Sturgill TW, Ray LB, Anderson NG, Erickson AK. Purification of mitogen-activated protein kinase from epidermal growth factor-treated 3T3-L1 fibroblasts. *Methods Enzymol* 1991; 200:342-351
- 4 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 96-100
- 5 Cook JG, Bardwell L, Thorner J. Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* 1997;390:85-88
- 6 方福德, 杨焕明. 分子生物学前沿技术. 第1版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:54-56
- 7 Yin XL, Chen S, Yan J, Hu Y, Gu JX. Identification of interaction

- 8 between MEK2 and A-Raf-1. *Biochim Biophys Acta* 2002;1589:71-76
- 9 Chen M, Li D, Krebs EG, Cooper JA. The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity. *Mol Cell Biol* 1997;17:1904-1912
- 10 Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421
- 11 Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996;74:589-607
- 12 Dérjard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995;267:682-685
- 13 Opazo P, Watabe AM, Grant SG, O' Dell TJ. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J Neurosci* 2003;23:3679-3688
- 14 Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL, Karin M. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 1995;268:286-290
- 15 Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM, Zon LI. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 1994;372:794-798
- 16 Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Science* 1994;19:470-473
- 17 Mendelson KG, Contois LR, Tevosian SG, Davis RJ, Paulson KE. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12908-12913
- 18 Mansour SJ, Candia JM, Gloor KK, Ahn NG. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1) and MAPKK2 mediate similar transcriptional and morphological responses. *Cell Growth Differ* 1996;7:243-250
- 19 Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:7337-7342
- 20 Shrivastava A, Manna SK, Ray R, Aggarwal BB. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 1998;72:9722-9728
- 21 Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 2001;20:2606-2610
- 22 Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology* 2001;33:159-165
- 23 Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993;67:1218-1226
- 24 Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* 1994;68:2026-2030
- 25 Yen TS. Hepadnaviral X protein: Review of recent progress. *J Biomed Sci* 1996;3:20-30
- 26 Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J* 1995; 14:4747-4757
- 27 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10350-10354
- 28 Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985
- 29 Natoli G, Avantiaggiati ML, Chirillo P, Puri PL, Ianni A, Balsano C, Levrero M. Ras- and Raf-dependent activation of c-Jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 1994;9:2837-2843

乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响

张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林

张忠东, 成军, 钟彦伟, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室: cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林. 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1261-1264

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1261.asp>

0 引言

生物细胞每时每刻都在接触着来自细胞内或者细胞外的各种各样信号. 信号只是个诱因, 生理反应是信号作用于细胞的最终结果. 相同的信号作用于不同的细胞可以引发完全不同的生理反应; 不同的信号作用于同一种细胞却可以引发出相同的生理反应. 细胞的一切生命活动都与信号有关, 信号是细胞一切活动的始作俑者. 因此, 对信号转导的研究非常重要. 由于肝炎病毒可以影响细胞信号转导, 引起细胞的病变及恶性转化^[1], 而蛋白酪氨酸激酶是重要的细胞信号转导激酶, 因此深入研究二者的相互关系对肝炎病毒的发病机制会有进一步的了解.

1 蛋白酪氨酸激酶的分类

蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)是一组催化酪氨酸残基磷酸化的酶, 他们通过从三磷酸腺苷上转移一个磷原子到酪氨酸残基上, 而使底物蛋白活化. 目前, 已发现 PTK 有 100 多个家族成员, 他们通过活化底物蛋白, 参与细胞的信号转导, 最终, 这些信号转导入细胞核内, 引起某些基因表达水平的改变, 使诸如细胞生长之类的复杂的细胞功能得以调节. 因此在调节细胞的分化、生长和激活中起到重要作用. 根据 PTK 的结构, 可分为受体型和非受体型 PTK 两大类, 前者又称跨膜 PTK, 后者又称细胞内 PTK. 生长因子受体 PTK(受体型酪氨酸激酶或 RTK): 这一类蛋白酪氨酸激酶为跨膜蛋白, 其胞外部分为配体结合区, 中间有跨膜区, 胞内部分含有蛋白酪氨酸激酶的催化结构域. 根据他们的结构不同可分为表皮生长因子受体(EGFR)家族、胰岛素受体家族、血小板衍生生长因子(PDGF)受体家族和成纤维细胞生长因子受体(FGFR)家族. 这些信号转导分子的结构有利于信息从细胞外单向地流入细胞内, 这个过程有配体-受体的专一性. RTK 的胞内域都有一个或者几个专一的酪氨酸残基, 他们在配体与 RTK 胞外域结合时被磷酸化. 这些酪氨酸

残基通常位于 PTK 域的 C-末端和蛋白分子的 C-末端尾之间的区域内^[1-3]. 蛋白酪氨酸激酶受体与配体结合后往往形成二聚体, 继而发生酶活性的增高, 使受体胞内部分的酪氨酸磷酸化增强, 磷酸化的受体酶活性进一步增强. 此外更重要的是, 磷酸化的受体可以募集含有 SH2 结构域的信号分子, 从而将信号转导至下游分子. 非受体型的蛋白酪氨酸激酶: 非受体型的蛋白酪氨酸激酶有 8 个亚族, 即 Src、Tec、Csk、Fes、Abl、Syk/ZAP-70、Fak 和 JAK. 其中 Src 家族有 Src、Fyn、Lck、Lyn 等^[1,2], 与受体结合存在, 当配体与受体结合后被激活; Tec 家族有 Btk、Itk、Tec 等, 与受体结合或不结合存在, 配体结合后被激活; ZAP70 家族有 ZAP70 和 Syk, 与磷酸化的受体结合后被激活. JAK 家族有 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 等. 这些 PTKs 或者直接与受体形成复合物, 或者间接地依次被激活, 在转导受体信号过程中起着接力棒的作用. 其中经典的是 Src 和 JAK 家族, SRC 激酶家族具有 3 个基本结构域: SH1、SH2 和 SH3. SH 结构域是 Src 同源性结构域的简称, 非受体型 Src 的 N 端是由 70-80 个氨基酸残基组成的 M 段, 结构因不同 PTK 而异, 随后的两个功能区 SH3 和 SH2 结构相对稳定, 其中 SH3 和富含脯氨酸的基序结合, SH2 则专门识别并结合发生了磷酸化的酪氨酸. SH1 是一个结构高度保守的功能区, 特点是带有一个能发生自身磷酸化的酪氨酸残基(Y)和一个结合着 ATP 的赖氨酸残基, 后者通过释放 ATP 使底物发生磷酸化, 因而 SH1 是激酶 PTK 的活性中心. 另外, PTK 的 C 端还有一个具有负调节功能的酪氨酸残基(Y), 当他发生磷酸化时, PTK 活性处于抑制状态. JAK 激酶其近羧基端的结构域具酪氨酸蛋白激酶的全部保守序列, 可能有酪氨酸蛋白激酶的活性, 其氨基端是另一个酪氨酸激酶样结构域, 包含全部激酶的各个亚结构域, 但可能不会有激酶活性, 其功能有待证明. 大部分的酪氨酸蛋白激酶位于胞膜上或胞质内, 近年来却发现核内也存在着酪氨酸蛋白激酶, 这对于信号在核内的转导有重要意义. 重要的细胞核内 PTKs 有 Abl 和 Wee. Abl 既存在于胞核内, 也存在于胞质中, 已发现其参与转录过程和细胞周期的调节; Wee 只存在于核内, 他可调节细胞周期素-2(CDK2)的活性, 抑制其磷酸化, 对细胞进入有丝分裂期具有调节作用^[1].

2 蛋白酪氨酸激酶的活化

受体型的 PTK 被分子间二聚机制激活, 而非受体型的 PTK 被分子间和分子内 2 种二聚机制激活^[1,3]. 蛋白酪氨酸激酶的活化过程可包括两步反应: 第一步是配体结合诱导的受体二聚化作用, 受体二聚化可能是由于二价的配体结合作用导致受体二聚化; 或由于配体的结合诱导受体发生构象改变, 成为稳定的活化型二聚体. 受体的二聚作用对于激活他们内在的催化活性和生长因子受体的自身磷酸化作用是必须的. 聚合可以是同源的,

也可以是异源的,由于聚合体中的每个成员都能够罗织不同的信号转导分子.二聚作用提高受体型PTK催化活性的机制是其催化域内的活性环(A环)中的一个或者多个酪氨酸被磷酸化了.许多细胞质型PTK的催化活性也因其A环中酪氨酸残基的转磷酸化作用而被激活;PTK活化作用的第二步是受体的自动磷酸化作用,磷酸化作用主要发生在PTK二聚体中2个受体分子胞质激酶结构域内保守的酪氨酸(Tyr)残基上,磷酸化酪氨酸残基(Tyr^P)不仅可大大提高激酶的活性,并且每个受体分子可有多个磷酸化位点,为下游含SH2结构域的蛋白或激酶提供停泊位点^[3].

SH2是无催化功能的蛋白组件,其大小约100 aa. PTK发现之初,认为仅仅是一种分布胞质中保守的结构域,后来在病毒癌基因v-fps/fes和v-src中也有发现.虽然他们看来不具有内在的催化活性,但是很快就发现这个亚域在信号转导过程中是非常重要的,因为在被激活的、癌基因来源的PTK的下游分子中都有这个结构域.在正常情况下,Fujinami肉瘤病毒编码的转化蛋白p130gag-/fps可以将细胞转化为癌细胞,但是,如果这个蛋白的SH2域发生突变,其转化细胞的能力就被抑制^[4].因此,PTK的信号转导既需要有功能的、活化的PTK域,又需要有功能的SH2域.总而言之,PTK域/SH2域组合对于真核细胞中信号转导专一性的产生是至关重要的.

3 PTK对细胞信号转导的影响及机制

许多生长因子和细胞因子通过激活PTK转化信号.大多数生长因子受体内部都具有酪氨酸激酶结构域,因而细胞因子受体能够与细胞内酪氨酸激酶耦联,通过一些递质和衔接于酪氨酸激酶能进一步激活一系列下游丝氨酸/苏氨酸激酶,后者又能进一步刺激细胞核和细胞质中转录因子^[5,6].大量的证据表明,激酶级联反应通路在细胞分化、增生和生存方面起着十分重要的作用.由配体-受体、二聚体激活的PTK能够导致一系列下游信号通路的激活,包括PI3激酶通路和Ras-Raf-MAP激酶通路.PI3激酶和MAP激酶被认为可能介导细胞生存和细胞分裂反应^[6,7].大多数生长因子能够激活PTK-PI3激酶和PTK-Ras-MAP激酶通路,这样他们可以作为促分裂剂作用各种细胞,剥夺生长因子或细胞因子,可以导致细胞生长停止或凋亡,因此生长因子IGF-1、EGF和FDGF又被认为是存活因子,但是EGF也能诱导细胞发生凋亡^[8].因此PTK信号转导可能在细胞生长存活方面具有双重作用.在研究干扰素诱发基因表达时发现了一条从细胞表面受体到转录因子的直接信号通路^[9,10].在这条通路中,STAT介导了信号转导. STAT具有SH2结构域,能够直接与酪氨酸磷酸化修饰的受体结合^[11].然后STAT蛋白被PTK(如JAK酪氨酸激酶)磷酸化和活化^[12,13],被激活的STAT转换成有活性的转录因子,并转移至核内,可与核内DNA结合因

子形成一个有活性的转录复合体,从而调控细胞的基因表达^[8,14].

ABL基因编码一个非受体型PTK,即ABL蛋白.c-ABL原癌基因最初是作为Abelson鼠白血病病毒基因在人类细胞的同源基因而引起注意的.目前已证实,BCR-ABL和TEL-ABL这两种融合基因与人类白血病有关.BCR-ABL融合基因由9和22号染色体相互易位形成.体外实验的结果表明:BCR-ABL融合基因产物可使造血细胞由生长因子依赖性转变为非依赖性,从而发生恶性变^[15].BCR-ABL融合基因产物还阻止髓系细胞发生凋亡^[16].多项体内实验都表明,单是BCR-ABL融合基因产物就足以使实验动物发生CML样的骨髓增生性疾病.

和T细胞激活信号转导有关的两类PTK,src家族:Ick蛋白(p56^{Ick})和fyn蛋白(p59^{fyn}),皆为细胞癌基因产物;Syr家族:ZAP-70.T细胞通过两条主要途径识别信号胞内转导,T细胞受体(TCR) α/β 链识别抗原肽和主要组织相容性复合物(MHC)分子后,发生TCR/CD3、CD4和CD45的分子多聚现象,使结合于CD4分子胞内段的56^{Ick}和结合于TCR/CD3的p56^{fyn}两种PTK激活.激活的Ick和fyn蛋白藉SH1使CD3 ζ 链胞内段上的酪氨酸发生磷酸化形成酪氨酸激活基序(TAM),后者通过与SH2的结合,一方面使带有SH2结构的ZAP-70活化,引发信号转导的第一途径,即磷脂酰肌醇途径;同时,TAM和SH2的结合可以活化其他带有SH2结构的蛋白(SH2-containing protein, SHC),引发信号转导的第二条途径,又称ras信号转导途径^[1-3].

脂多糖(Lps)是一类具有高度活性的大分子物质,可依赖LBP/CD14系统作用于细胞,特别是单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞(PMNS)等通过一系列胞内信号转导系统诱导细胞产生多种生物活性分子,如:肿瘤坏死因子(TNF) α ,白介素,前列腺素等,在革兰氏阴性菌感染的发病机制中扮演着十分重要的角色.Lps与CD14的结合导致PTK的活化,从而激活下游的MAPK.一些实验表现,PTK抑制剂能抑制Lps诱导巨噬细胞产生TNF- α 、IL-b及其杀瘤细胞活性.

Ito et al^[17]为研究c-Src在肝细胞癌(HCC)和肝内胆管癌中的致癌作用,运用免疫组化技术识别活化的c-Src,结果提示活化的c-Src与肿瘤发生有关.为进一步了解PTK和HCC的关系,Ito et al又研究表皮生长因子受体(EGF-R),c-erbB-2,c-erbB-3和c-erbB-4在HCC中的表达,说明他们在HCC的进展中起着重要作用.Csk是胞质的蛋白酪氨酸激酶,通过分析Csk的定位、含量和酶的活力调查Csk在HCC中的作用,发现Csk的活性明显降低^[18].

4 乙型和丙型肝炎病毒蛋白与蛋白酪氨酸激酶的信号转导 HBxAg具有反式激活作用.HBxAg激活的转录因子包括NF- κ B、NF-AT、AP-1和ATF/CREB^[19,20].HBxAg因此是许多转录元件和因子的激活剂^[21,22].许多报告表明

HBxAg 的活性是因其能激活细胞质信号转导途径的能力, 特别是 MAPK 通路、JNK 通路及 Src 酪氨酸激酶家族^[23]. HBxAg 激活 Src 对病毒复制非常重要, Klein et al^[24]证明 HBxAg 激活 Src 酪氨酸激酶启动高水平的病毒复制. HBxAg 通过 Src 介导的途径刺激病毒前基因组 mRNA 逆转录为基因组 DNA, 抑制 Src 酪氨酸激酶活性可以有利的破坏病毒的逆转录. 结果表明 HBxAg 刺激 Src 酪氨酸激酶进而刺激病毒聚合酶活性. 抑制 HBxAg 活化的 Src 信号不能损害包含前基因组 mRNA 病毒粒子, 仅轻度减少病毒复制水平; 而 HBxAg 活化的 Src 信号能刺激病毒前基因组 mRNA 的逆转录和次级基因组 DNA 合成. 结果提示哺乳动物肝炎病毒对 Src 型激酶的特异需求. 与 SH2/SH3 相关的信号蛋白分为两类: 包含具有酶活性的如细胞质 PTK 的 Abl、Csk、Src 和 Syk, 非酶活性的接头蛋白如 Crk2、Grb2、Nck 和 Shc. 他们形成多蛋白复合体使细胞外信号转导给下游效应子而调节各种细胞反应. 许多研究显示在转染细胞内 HBxAg 是体内信号转导通路的激活剂^[25-31], 其影响信号转导通路的能力对 HBV 的感染和复制非常重要. HBxAg 激活 MAPK 信号通路, 这是 HBxAg 转录活性的基本, 包括激活转录因子 AP1/Fos-Jun 和 NF- κ B^[32, 33]以及 RNA 聚合酶 III 指导的转录^[34]. HBxAg 也通过刺激信号转导通路的方式刺激细胞周期控制点的降解^[35].

人巨细胞病毒可以通过增强 Jak 蛋白的降解而抑制 IFN γ 诱导的 Jak-STAT 信号^[36]. IFN α 和 IFN β 与异二聚体的 IFN α / β 受体结合, 配体结合导致两种与 IFNAR1 和 IFNAR2 有关的细胞质 PTK 激酶(Tyk2 和 Jak1)的活化^[37]. Heim et al^[38]在 UHCV 细胞种表达 HCV 并用干扰素处理细胞, 通过 Western blotting 和 EMSA, 证明 HCV 蛋白能抑制干扰素诱导的 Jak-STAT 信号通路, 但对 TNF α 经 NF- κ B 诱导的通路无影响. HCV 干扰 IFN 诱导的信号通路可能是一种逃避宿主免疫的策略. Kato et al^[39]认为在 HCV 和 HBV 的结构和非结构蛋白中, HCV 核心蛋白对细胞内的信号最有影响, 包括 NF- κ B、AP-1 和 SRE 相关通路. Yoshida et al^[40]报告 HCV 核心蛋白直接与 STAT3 结合并经酪氨酸残基的磷酸化结合 STAT3, 在 NIH 3T3 细胞内 HCV 核心蛋白活化的 STAT3 引起细胞的快速增生及 Bcl-XL 和细胞周期素 -D1 的上调, 说明 HCV 核心蛋白与 STAT3 协同导致细胞的转化.

5 参考文献

- 1 成军. 肿瘤相关基因. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 29-60
- 2 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第 1 版. 西安: 世界图书出版公司, 1995: 294-296
- 3 方福德, 杨焕明. 分子生物学前沿技术. 第 1 版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997: 54-56
- 4 Weinmaster GA, Middlemas DS, Hunter T. A major site of

- tyrosine phosphorylation within the SH2 domain of Fujinami sarcoma virus P130 gag-fps is not required for protein-tyrosine kinase activity or transforming potential. *J Virol* 1988; 62:2016-2025
- 5 Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 1995;5:747-757
- 6 Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE Jr. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 1992;257:809-813
- 7 Van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:251-337
- 8 Brabyn CJ, Klein LP. EGF causes hyperproliferation and apoptosis in T51B cells: involvement of high and low affinity EGFR binding sites. *Cell Signal* 1995;7:139-150
- 9 Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421
- 10 Leonard WJ, O'shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293-322
- 11 Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995;267:1349-1353
- 12 Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992;9:383-391
- 13 Ihle JN. The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling. *Semin Immunol* 1995;7:247-254
- 14 Kessler DS, Veals SA, Fu XY, Levy DE. Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator. *Genes Dev* 1990;4: 1753-1765
- 15 Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210 bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9312-9316
- 16 Cambier N, Chopra R, Strasser A, Metcalf D, Elefanti AG. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose dependent manner. *Oncogene* 1998;16: 335-348
- 17 Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, Miyoshi E, Monden M, Matsuura N. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001;84:1377-1383
- 18 Masaki T, Okada M, Tokuda M, Shiratori Y, Hatase O, Shirai M, Nishioka M, Omata M. Reduced C-terminal Src kinase (Csk) activities in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1999; 29:379-384
- 19 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signalling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 10350-10354
- 20 Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985
- 21 Haviv I, Shamay M, Doitsch G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998; 18:1562-1569
- 22 Haviv I, Vaizel D, Shaul Y. pX, the HBV-encoded coactivator, interacts with components of the transcription machinery and stimulates transcription in a TAF-independent manner. *EMBO J* 1996;15:3413-3420
- 23 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras.

Mol Cell Biol 1997;17:6427-6436

- 24 Klein NP, Bouchard MJ, Wang LH, Kobarg C, Schneider RJ. Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO J* 1999;18:5019-5027
- 25 Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, Puri PL, Ianni A, Balsano C, Levrero M. Ras- and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 1994;9:2837-2843
- 26 Dandri M, Schirmacher P, Rogler CE. Woodchuck hepatitis virus X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas which are permissive for viral replication. *J Virol* 1996;70:5246-5254
- 27 Wang HD, Yuh CH, Dang CV, Johnson DL. The hepatitis B virus X protein increases the cellular level of TATA-binding protein which mediates transactivation of RNA polymerase III genes. *Mol Cell Biol* 1995;15:6720-6728
- 28 Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, Natoli G. Hepatitis B virus pX activates NF-Kappa B-dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol* 1996;70:641-646
- 29 Su F, Schneider RJ. HBV HBx protein activates transcription factor NF- κ B by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol* 1996;70:4558-4566
- 30 Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8744-8749
- 31 Cong YS, Yao YL, Yang WM, Kuzhandaivelu N, Seto E. The hepatitis B virus X-associated protein, XAP3, is a protein kinase C-binding protein. *J Biol Chem* 1997;272:16482-16489
- 32 Cross JC, Wen P, Rutter WJ. Transactivation by hepatitis B virus X protein is promiscuous and dependent on mitogen activated cellular serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8078-8082
- 33 Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J* 1995;14:4747-4757
- 34 Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1997;17:6838-6846
- 35 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11215-11219
- 36 Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman JW, Sedmak DD. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* 1998;187:675-683
- 37 Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 1992;70:313-322
- 38 Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Inhibits Signal Transduction through the Jak-STAT Pathway. *J Virol* 1999;73:8469-8475
- 39 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
- 40 Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai KI, Sata M, Kohara M, Yoshimura A. Activation of STAT3 by the hepatitis c virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 2002; 5:641-653

RNA干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究

成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚

成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚, 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
国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, No. C03011402
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚. RNA干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1264-1266

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1264.asp>

0 引言

从基因的分子生物学角度, 病毒性肝炎也是一种基因病, 相对于正常肝细胞来说, 从肝炎患者的肝细胞中获得了肝炎病毒的基因, 因此, 病毒性肝炎的治疗也可以采取象遗传病那样的基因治疗(gene therapy)策略^[1-5]. 与遗传病的基因治疗策略不同, 遗传病往往是因为某一或某些基因发生缺陷, 利用基因治疗技术进行补充或者校正; 而病毒性肝炎的基因治疗, 往往是需要采取另外的策略, 即阻断有害的病毒的基因表达的策略. 因为病毒性肝炎的发病机制, 主要是进入肝细胞的肝炎病毒基因编码产生相应的肝炎病毒蛋白, 作为靶抗原激活机体的免疫应答机制, 这种原本是要清除肝细胞中肝炎病毒的正常的免疫应答机制, 却造成了持续的肝细胞的免疫损伤, 引起各种类型的肝脏疾病. 特别是乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的慢性病毒性肝炎, 迁延不愈, 释放的各种炎症因子导致肝细胞内贮脂细胞(stellate cell)的激活、转化、增生, 分泌过量的细胞外基质(ECM), 并引起肝脏纤维化的形成, 某些情况下通过复杂的生物学机制导致肝细胞的恶性转化, 引起肝细胞癌(HCC)的发生^[6-10]. 因此, 从肝炎病毒引起的一系列肝脏疾病谱来看, 主要的源头就是肝细胞中肝炎病毒基因的存在, 因此采用基因治疗技术阻断肝炎病毒基因在肝细胞中的复制和表达, 是我们应该考虑的主要治疗靶点^[11-16].

关于阻断肝细胞内肝炎病毒基因复制和表达的策略, 已经进行了许多的基因治疗实验研究的尝试, 如反义寡聚脱氧核糖核苷酸(ODN)、反义RNA、核酶(ribozyme)等曾经是人们关注的焦点, 以人源化单链可变区抗体(scFv)为目的基因的细胞内免疫(intracellular immunization)基因治疗技术也是非常具有吸引力的策略. 最近研究表明, RNA干扰(RNA interference)可能是进行抗肝炎病毒基因治疗的新策略^[4, 5].

1 RNA干扰的机制与策略

1995年Guo et al^[17]在研究美丽隐杆线虫(*C. elegans*)的par1基因功能时, 将par1基因的反义RNA表达载体导

入到美丽隐杆线虫中, 引起 *par1* 基因的缺陷现象, 同时发现导入 *par1* 基因的有义链基因进行表达时, 也产生了 *par1* 基因的缺陷现象, 表明反义和有义 RNA 的表达都有类似的抑制效应, 但是机制却明显不同. Fire et al^[18] 对这一现象的机制进行了细致深入的研究, 比较了反义 RNA、有义 RNA 和双链 RNA(dsRNA) 在美丽隐杆线虫中的抑制效应, 发现 dsRNA 产生至少是 10 倍以上的抑制靶基因表达的效果, 并将 dsRNA 抑制同源基因的表达的现象称为 RNA 干扰, 从此 RNA 干扰现象得到了空前的重视, 并在各种病原微生物的基因表达抑制方面进行了许多有益的尝试.

干扰 RNA 是生物系统在长期进化过程中形成、天然存在的防御机制之一. 当一种生物系统受到异源性病原体的入侵时, 可以自动开启属于 RNase III 的核糖核酸酶, 即 RNA 切割酶(dicer)的活性, 将入侵病原体的 RNA 成分, 切割处理成 21-25 nt 的 RNA 小片段, 发挥 RNA 干扰(iRNA)的抑制性生物学作用, 参与构筑生物系统的防御机制. 这种生物防御机制, 从低等生物到高等生物都普遍存在, 是生物系统天然存在的重要机制^[19-25].

2 RNA 干扰与病原微生物基因表达的抑制

在美丽隐杆线虫中发现 RNA 干扰现象之后, 很快发现在许多类型的病原微生物中都存在同样的 RNA 干扰现象. 如果蝇、锥虫、涡虫、线虫, 以及高等的哺乳动物细胞, 甚至是人的细胞中也发现类似的 RNA 干扰现象. 对其作用机制进行研究, 发现是一些 22-25 nt 大小 dsRNA 产生抑制或降解靶 RNA 分子的作用, 统称为小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA), 根据其发挥 RNA 干扰现象的 dsRNA 的具体长度又可以分成 2 类: 24-25 nt 的长 siRNA 和 21-23 nt 的短 siRNA. 这两种类型的 siRNA 都可以通过与靶 mRNA 分子进行序列特异性的结合、抑制与降解, 阻断或破坏靶基因的表达. 另外一种可能作用的机制就是 dsRNA 诱导同源基因的甲基化, 从而使目的基因表达关闭. 另外, 小分子的 dsRNA 同时也是很强的干扰素诱导酶如 PKR、RNase L 的激活剂, 可以产生类似干扰素的抗病毒效应^[26-37].

有多位学者对于人免疫缺陷病毒-1(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)的 siRNA 进行了研究. Jacques et al^[38] 根据 HIV-1 基因组核苷酸序列, 如长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)、*vif* 和 *nef* 基因, 设计了序列特异性的 21 nt 的 siRNA, 无论是人工合成, 还是表达载体在细胞内表达的 siRNA 分子, 都能够在 HIV-1 阳性的 CD4⁺ HeLa 细胞中抑制 HIV-1 的复制, 导致复制水平下降了 30-50 倍. 如果 siRNA 序列与结合的 HIV-1 序列不配对时, 这种抑制作用有显著降低. 说明 siRNA 与靶 RNA 分子之间的配对结合是非常重要的. 除了转染细胞系之外, siRNA 在分离的原代 HIV-1 阳性的淋巴细胞中也具有明显的抑制 HIV-1 的复制和表达的作用. 更进一步提示了 siRNA 策略的实际应用前景.

Novina et al^[39] 对于 dsRNA 分子对于 HIV-1 的抑制作用进行了研究, 针对 gag 基因的 dsRNA 在转染 48 h 之后, p24 蛋白的表达水平显著下降, 即使在 HIV-1 前基因组 DNA 与细胞基因组已经发生整合的 HIV-1 细胞系中, dsRNA 也具有显著的抑制 HIV-1 的复制和表达的作用.

脊髓灰质炎病毒(poliomyelitis virus, PMV)是一种高水平复制的 RNA 病毒, siRNA 策略同样可以产生对于 PMV 的抑制效应. Gitlin et al^[40] 分别设计了针对 PMV 衣壳蛋白、聚合酶编码基因序列的 siRNA, 在 HeLa 细胞系上, 可以使 PMV 的复制水平下降 97-99%, 说明产生了非常显著的抑制效应. Caplen et al^[41] 对于 siRNA 抑制塞姆利基森林病毒(semliki forest virus, SFV)、登革热病毒(dengue fever virus, DFV)的效果进行了研究. 证实 dsRNA 策略可以显著抑制 C6/36 细胞系中 SFV、DFV 的基因复制和表达.

3 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗的应用前景

RNA 干扰策略在抗肝炎病毒治疗中首先在 HCV 的研究中获得了成功. McCaffrey et al^[42] 设计合成了针对 HCV NS5B 基因区的 dsRNA, 当与 NS5B 表达载体进行共转染时, 在鼠肝细胞中观察到 dsRNA 对于 NS5B 基因的表达水平抑制率达到 75%, 如果 dsRNA 与 NS5B 的表达载体进行共转染, 抑制率可以达到 98%. 说明 siRNA 策略在抗 HCV 基因治疗中的应用前景. 多年来由于缺乏合适的 HCV 感染/转染细胞模型, 因此对于抑制 HCV 的研究进展缓慢. 近年来关于 HCV 复制子(replicon)的建立, 使得在细胞系水平上研究 siRNA 的效果成为可能. Randall et al^[43] 就利用 HCV 的复制子细胞模型对于 dsRNA 抑制 HCV RNA 复制的效果进行了研究. 在 Huh-7 细胞系中, dsRNA 对于 HCV RNA 的复制水平具有显著的抑制作用, 而且是剂量依赖性的. 对于 dsRNA 作用的序列依赖性的特点进行研究, 2 株 HCV 变异株仅有 3 nt 的序列差别, 只有 dsRNA 与作用的靶 HCV RNA 序列完全同源时才具有抑制作用, 因此, dsRNA 对于靶基因的表达抑制具有严格的序列特异性的特点. dsRNA 对于 HCV RNA 抑制的作用效果是指数性的, 在 4 d 之内, 就可以降低 HCV RNA 的复制水平达 80 倍. 导入 siRNA 之后, 可以使 98% 以上的有 HCV RNA 复制的细胞不再有 HCV RNA 的复制, 这些细胞中再也检测不到 HCV 的抗原表达和 HCV RNA 的复制. 这些研究结果表明, 基于 siRNA 的抗 HCV 治疗是十分有希望的.

但是, 由于对 siRNA 的认识时间尚短, 因此目前还没有具体的 siRNA 抑制乙型肝炎病毒的研究结果, 但是从目前关于 HCV 的部分研究结果来看, 从其他类型的病毒的抑制效果来看, siRNA 还是具有希望的抗肝炎病毒治疗的新策略. 当然, 由于肝炎病毒 RNA 分子在体内的二级结构特点, 针对不同基因区段的 siRNA 的抑制作用效果也肯定有所差别, 因此针对 HBV、HCV 基因序列的特点, 还需要进行优化, 寻

找最为有效的抑制靶点. 作为一种新型的抗肝炎病毒的可能的策略, siRNA 也具有其相当明显的局限性^[43]. 例如 HBV 和 HCV 基因序列高度变异, 存在明显的基因准种(quasispecies)群, 而 siRNA 对于靶 RNA 分子的识别, 又是以碱基配对方式进行的, 因此要想全面控制 HBV、HCV 的复制, 我们就需要无数种序列不同的 siRNA 分子, 显然是很难做到的. 因此, 我们还必须针对这一特点进行深入细致的研究, 克服这一困难, 使 siRNA 抑制靶基因的表达策略更能切合临床抗肝炎病毒治疗的需要.

4 参考文献

- 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
- 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19:5-6
- 成军, 斯崇文. 基因治疗. 第1版. 北京: 学苑出版社, 1993:1
- 成军, 斯崇文. 抗病毒基因治疗研究进展. 中华实验和临床病毒学杂志 1993;7:436-439
- 成军, 斯崇文. 人类免疫缺陷病毒感染基因治疗研究进展. 中华内科杂志 1996;35:203-205
- Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325
- 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 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
- 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- Deng H, Dong J, Cheng J, Huangfu JK, Shi SS, Hong Y, Ren XM, Li L. Quasispecies groups in the core promoter region of hepatitis B virus. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2002;1:392-396
- 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 张玲霞, 王业东, 成军. 乙肝病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 军医进修学院学报 2003; 24: 49-51
- 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;28:24-28
- Guo S, Kempthues KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995;81:611-620
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
- Siegmund D, Hadwiger P, Pfizenmaier K, Vornlocher HP, Wajant H. Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis. *Mol Med* 2002;8:725-732
- Yamamoto T, Omoto S, Mizuguchi M, Mizukami H, Okuyama H, Okada N, Saksena NK, Brisibe EA, Otake K, Fuji YR. Double-stranded nef RNA interferes with human immunodeficiency virus type 1 replication. *Microbiol Immunol* 2002;46:809-817
- Goshima G, Kiyomitsu T, Yoda K, Yanagida M. Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol* 2003;160:25-39
- Carthew RW. RNA interference: the fragile x syndrome connection. *Curr Biol* 2002;12:R852-R854
- Cerutti H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* 2003;19:39-46
- Seo MY, Abrignani S, Houghton M, Han JH. Small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. *J Virol* 2003;77:810-812
- Gan L, Anton KE, Masterson BA, Vincent VA, Ye S, Gonzalez-Zulueta M. Specific interference with gene expression and gene function mediated by long dsRNA in neural cells. *J Neurosci Methods* 2002;121:151-157
- Martinez MA, Clotet B, Este JA. RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol* 2002;23:559-561
- Martinez MA, Gutierrez A, Armand-Ugon M, Blanco J, Parera M, Gomez J, Clotet B, Este JA. Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS* 2002;16:2385-2390
- Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 2002;532:227-230
- Castanotto D, Li H, Rossi JJ. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA* 2002;8:1454-1460
- Lee SS, Lee RY, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat Genet* 2003;33:40-48
- Dector MA, Romero P, Lopez S, Arias CF. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2002;3:1175-1180
- An J, Sun Y, Sun R, Rettig MB. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encoded vFLIP induces cellular IL-6 expression: the role of the NF-kappaB and JNK/AP1 pathways. *Oncogene* 2003;22:3371-3385
- Piano F, Schetter AJ, Morton DG, Gunsalus KC, Reinke V, Kim SK, Kempthues KJ. Gene clustering based on mai phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*. *Curr Biol* 2002;12:1959-1964
- Surabhi RM, Gaynor RB. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol* 2002;76:12963-12973
- Adelman ZN, Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Carlson JO, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome. *J Virol* 2002;76:12925-12933
- Peng Y, Zhang Q, Nagasawa H, Okayasu R, Liber HL, Bedford JS. Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing, and mutation. *Cancer Res* 2002;62:6400-6404
- Park WS, Miyano-Kurosaki N, Hayafune M, Nakajima E, Matsuzaki T, Shimada F, Takaku H. Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2002;30:4830-4835
- Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002;418:435-438
- Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002;8:681-686
- Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002;418:430-434
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9742-9747
- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39
- Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:235-240

• 临床经验 •

胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤 21 例

樊丽琳, 陈东风

樊丽琳, 陈东风, 中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所消化内科 重庆市 400042

项目负责人: 陈东风, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所消化内科.

收稿日期: 2002-12-23 接受日期: 2003-01-08

摘要

目的: 总结胃黏膜相关淋巴瘤的临床特点, 提高诊治水平.

方法: 回顾性分析21例胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤病例资料.

结果: 在本组病例中, 18例以腹痛、食欲不振为主要症状, 2例以出血为首发症状, 另1例主要表现为腹胀、消瘦. 病理分期(Arbor 标准) I_E期11例, II_E期4例, III_E期4例, IV_E期2例. 其中15例行手术治疗, 术后均行抗Hp治疗及化疗, 5a生存率为86.7%, 4例未进行手术及化疗及2例行单纯化疗的患者均于3a内死亡.

结论: 对胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的早期诊断、手术切除胃原发病灶加抗Hp治疗是提高胃黏膜相关淋巴瘤生存率的关键.

樊丽琳, 陈东风. 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤21例. 世界华人消化杂志 2003; 11(8):1267-1268

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1267.asp>

0 引言

胃是结外淋巴瘤最多见的部位, 英国病理医生 Isaacson 于1983年首先提出胃肠道淋巴瘤来自黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT), MALT淋巴瘤属于一种特殊类型的肿瘤, 其准确定义为: 在黏膜和腺体组织发生的、具有边缘区B细胞分化和表型的结外B细胞淋巴瘤. 来源于胃黏膜相关淋巴组织的B细胞淋巴瘤被称为胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(胃MALT淋巴瘤). 近年来该病的发病率有增加的趋势, 由于该病的早期发现和治疗可以达到临床痊愈, 但其临床表现又缺乏特异性, 故如何早期诊断和治疗是提高该病治愈率和生存期的关键. 我科1990-01/2002-10共收治胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤21例, 现总结诊治经过如下:

1 材料和方法

1.1 材料 本组的病例均经过X线等检查、胃镜病理/术后病理检查, 均符合1994年确定的胃MALT淋巴瘤诊断标准, 外周血象、上腹部B超及CT均无异常发现. 男12例, 女9例, 年龄28-68岁, 平均45.8岁. 临床症状主要有中上腹隐痛、恶心、呕吐、消瘦及消

化道出血等, 其中出现上腹痛者占81.8%, 1例表现为右上腹痛、发热, 结合腹部B超, 多次就诊均诊断“胆囊结石”, 直至出现黑便. 胃镜资料及病理: 所有病例均通过胃镜检查明确诊断, 病灶位于胃窦部14例, 胃体5例, 胃底体2例, 镜下观察呈黏膜隆起, 表面糜烂或溃疡(单个或多个)19例, 2例为巨大包块. Hp检测采用活检标本快速酶实验及活检标本改良Giemsa染色, 两项均为阳性的才确定有Hp感染. 结果: Hp阳性18例, 占85.7%. 病理免疫组化染色LCA阳性18例, 占85.7%, CD20阳性11例, 占52.4%. 病理分期(Arbor标准) I_E期11例, II_E期4例, III_E期4例, IV_E期2例.

1.2 方法 全胃切除8例, 胃大部切除7例, 术后均进行抗Hp治疗(方法为羟氨苄青霉素750mg、甲硝唑500mg, 3次/d, 部分病例加奥美拉唑40mg, 2次/d, 连续服用14d), 化疗方案为CHOP. 4例未进行手术及化疗及2例行单纯化疗, 随访21例, 时间2-12a.

2 结果

按Ann Arbor分期法, 本组I_E期11例, 5a生存率为90.9%, II_E期4例, 1例在起病后第3年死亡, 3例正于随访中, III_E期4例, 2例随访时间为2a和3a, 另2例于3a内死亡, IV_E期2例均于2a内死亡. 15例行手术加化疗、抗Hp治疗, 5a生存率为84% (本组病例5a内死亡者病理分期均为II_E期以上). 4例因各种原因未进行手术及化疗及2例行单纯化疗的患者均于3a内死亡.

3 讨论

胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤较为少见, 但近年来发病率有增高趋势. 发病年龄多在50岁以上, 表现与胃癌相似, 出现疼痛、贫血、体重减轻等^[1]. 其病因尚不甚明了. 大量研究显示, Hp感染可能在胃淋巴瘤的发病机制中起到一定作用. 正常胃黏膜缺乏淋巴样组织, 但Hp长期感染后慢性胃炎出现淋巴滤泡, 并与胃MALT淋巴瘤的发生有密切联系^[2], 有研究者认为该肿瘤的发生可能是由Hp感染后形成的一个细胞克隆演化而来, Hp抗原的刺激对该克隆的形成和生长起主要作用, 慢性Hp感染经历多阶段的分子生物学事件最终发展为MALT淋巴瘤^[3, 4], 并且有报道根除Hp后胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤消退, 甚至有报道还引起胃外的黏膜相关淋巴组织淋巴瘤一起消退^[5-7]. 国内外的报道均显示胃MALT淋巴瘤患者的Hp感染率高于其他胃良性病

变, 本组病例结果也与其相符合, Hp 阳性 18 例, 占 85.7 %, 并在术后治疗时予以抗 Hp 治疗, 疗效较佳。但并非所有胃 MALT 淋巴瘤患者均有 Hp 感染, 国外某些研究表明 Hp 阴性的胃 MALT 淋巴瘤存在高 t (11; 18)(q21; q21) 发生率, 且易位阳性的胃 MALT 淋巴瘤更具有侵袭性倾向, 故对于胃 MALT 淋巴瘤的分子生物学特征的检测有利于指导选择临床治疗方案^[8-10]。

病理分期目前多采用 Ann Arbor 会议标准, 胃黏膜相关淋巴瘤的病理分期对预后有明显影响。在本组病例中, 在治疗方法相同的情况下, 病理分期 I_E、II_E 期患者的生存率明显比 III_E 期、IV_E 期长, 国外学者有的研究认为对于早期胃黏膜相关淋巴瘤单纯手术切除足够而进展期 (II_E - IV_E) 的胃黏膜相关淋巴瘤需结合术前化疗^[11]。本组研究也表明手术治疗加化疗的患者平均生存期最长。

胃黏膜相关淋巴瘤的传统治疗是手术切除, 近年来由于对 Hp 与胃 MALT 淋巴瘤的关系的进一步认识, 部分学者认为对早期低度恶性的病例首先力争消除 Hp 感染, 如无效再考虑手术治疗。但不少报道认为单纯行抗 Hp 治疗容易因再次感染 Hp 而复发或根除 Hp 后仍残存微小病灶, 治疗后需要观望和等待的阶段^[12], 有的学者提出内镜超声在长期的治疗后随访中应起重要作用^[13]。Radman et al^[14]对 28 例胃 MALT 淋巴瘤患者研究后认为单纯的化疗是很成功的, 外科手术可只作为一些急诊情况下的治疗手段, 预后主要取决于原发灶的部位及病灶的范围。Park et al^[15]认为对于没有 Hp 感染证据或根除 Hp 治疗无变化的低度恶性 MALT 淋巴瘤单纯放疗效果也较好。但国内大部分学者认为应尽量切除原发灶, 术后抗 Hp 治疗或联合化疗。本组病例手术切除联合化疗、抗 Hp 治疗的患者生存期明显长于单纯化疗。我们认为对于高度恶性胃 MALT 淋巴瘤, 即使不能行根治术也可行姑息切除术, 术后抗 Hp 治疗联合化疗, 可望延长生存期, 提高生存质量。

4 参考文献

- 1 Cogliatti SB, Schumacher U, Eckert F, Hansmann ML, Takahashi H, Hedderich J, Lennert K. Primary B cell gastric lymphoma: a clinicopathological study of 145 patients. *Gastroenterology* 1991; 101:1159-1170
- 2 Kusic B, Gasparov S, Katicic M, Dominis M, Antica M. Monoclonality in *Helicobacter pylori*-positive gastric biopsies: an early detection of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Exp Mol Pathol* 2003;74:61-67
- 3 Prskalo M, Sabaric B, Ticak M, Skurla B, Dominis M, Dzebro S, Gasparov S, Colic-Cvrlje V, Naumovski-Mihalic S, Filipec T, Papa B, Ljubanovic D, Presecki V, Katicic M. *Helicobacter pylori* and malignant diseases of the stomach. *Lijec Vjesn* 2002; 124(Suppl 1):57-60
- 4 Boot H, de Jong D. Gastric lymphoma: the revolution of the past decade. *Scand J Gastroenterol* 2002;(Suppl):27-36
- 5 Caletti G, Togliani T, Fusaroli P, Sabattini E, Khodadadian E, Gamberi B, Gobbi M, Pileri S. Consecutive regression of concurrent laryngeal and gastric MALT lymphoma after anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Gastroenterology* 2003;124:537-543
- 6 Arima N, Tsudo M. Extragastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma showing the regression by *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Br J Haematol* 2003;120:790-792
- 7 Valencak J, Trautinger F, Fiebigier WC, Raderer M. Complete remission of chronic plaque psoriasis and gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Ann Hematol* 2002;81:662-665
- 8 Ye H, Liu H, Raderer M, Chott A, Ruskone-Fourmesttraux A, Wotherspoon A, Dyer MJ, Chuang SS, Dogan A, Isaacson PG, Du MQ. High incidence of t (11;18)(q21;q21) in *Helicobacter pylori*-negative gastric MALT lymphoma. *Blood* 2003;101: 2547-2550
- 9 Nakamura S, Matsumoto T, Nakamura S, Jo Y, Fujisawa K, Suekane H, Yao T, Tsuneyoshi M, Iida M. Chromosomal translocation t(11;18)(q21;q21) in gastrointestinal mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Pathol* 2003;56:36-42
- 10 Du MQ. Molecular biology of gastric MALT lymphoma: application in clinical management. *Hematology* 2002;7:339-344
- 11 Kelesis NG, Vassilopoulos PP, Bai MP, Agnantis NJ, Avital SR, Rosenthal RJ. Update of the role of surgery in the multimodal treatment of MALT gastric lymphomas. *Anticancer Res* 2002; 22:3457-3463
- 12 Fischbach W, Goebeler-Kolve M, Starostik P, Greiner A, Muller-Hermelink HK. Minimal residual low-grade gastric MALT-type lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 2002; 360:547-548
- 13 Yeh HZ, Chen GH, Chang WD, Poon SK, Yang SS, Lien HC, Chang CS, Chou G. Long-term follow up of gastric low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma by endosonography emphasizing the application of a miniature ultrasound probe. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:162-167
- 14 Radman I, Kovacevic-Metelko J, Aurer I, Nemet D, Zupancic-Salek S, Bogdanic V, Sertic D, Masic M, Pulanic R, Gasparovic V, Labar B. Surgical resection in the treatment of primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: retrospective study. *Croat Med J* 2002;43:555-560
- 15 Park HC, Park W, Hahn JS, Kim CB, Lee YC, Noh JK, Suh CO. Low grade MALT lymphoma of the stomach: treatment outcome with radiotherapy alone. *Yonsei Med J* 2002;43:601-606



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

