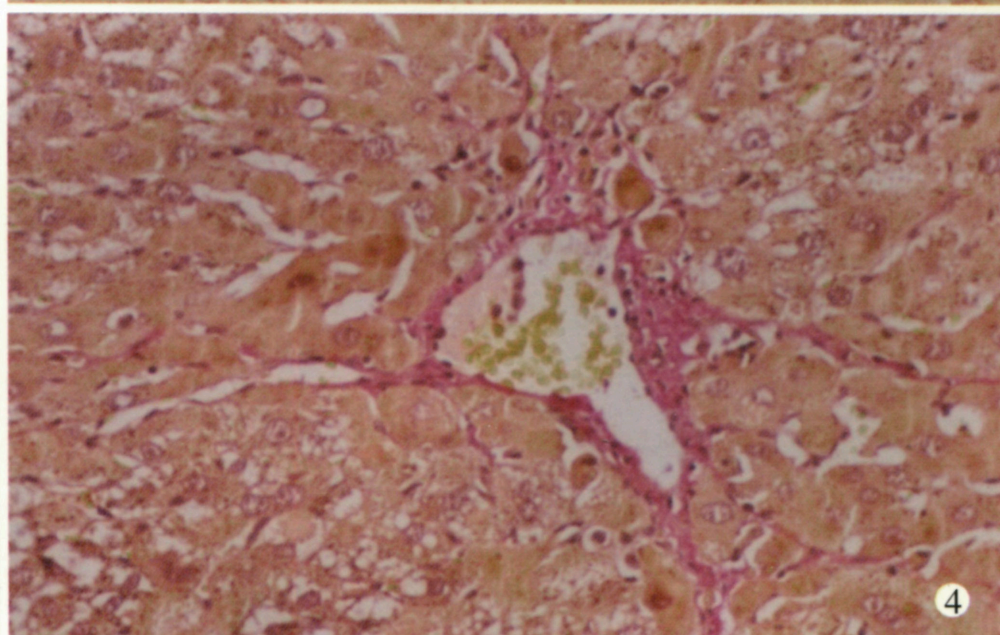
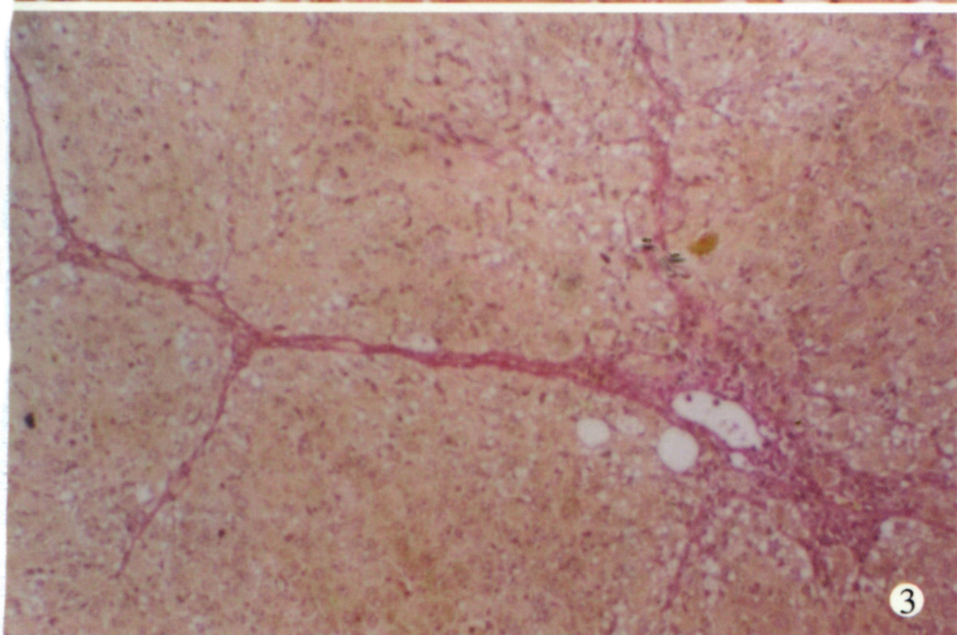
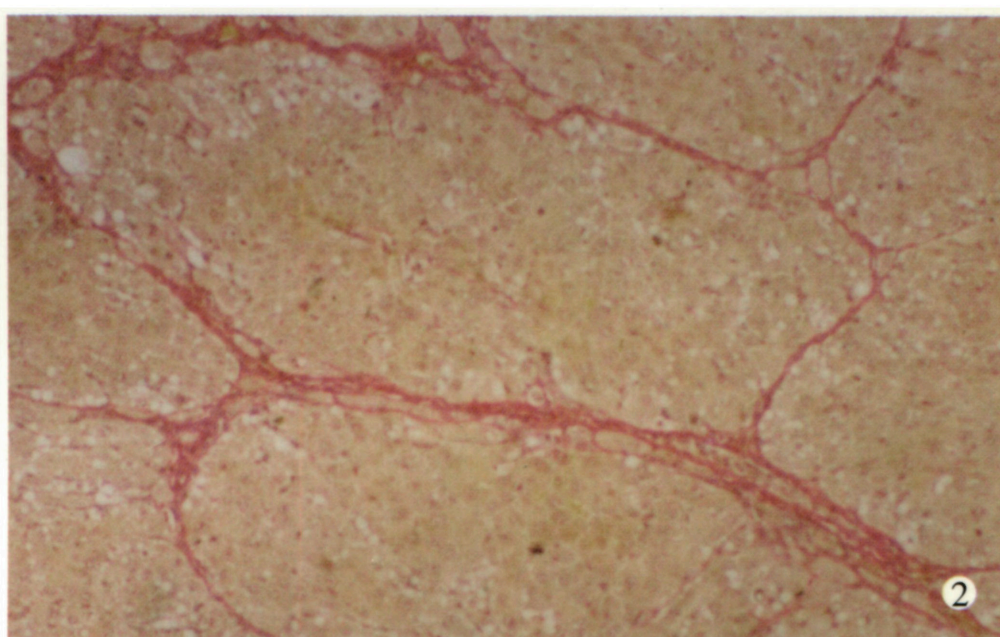
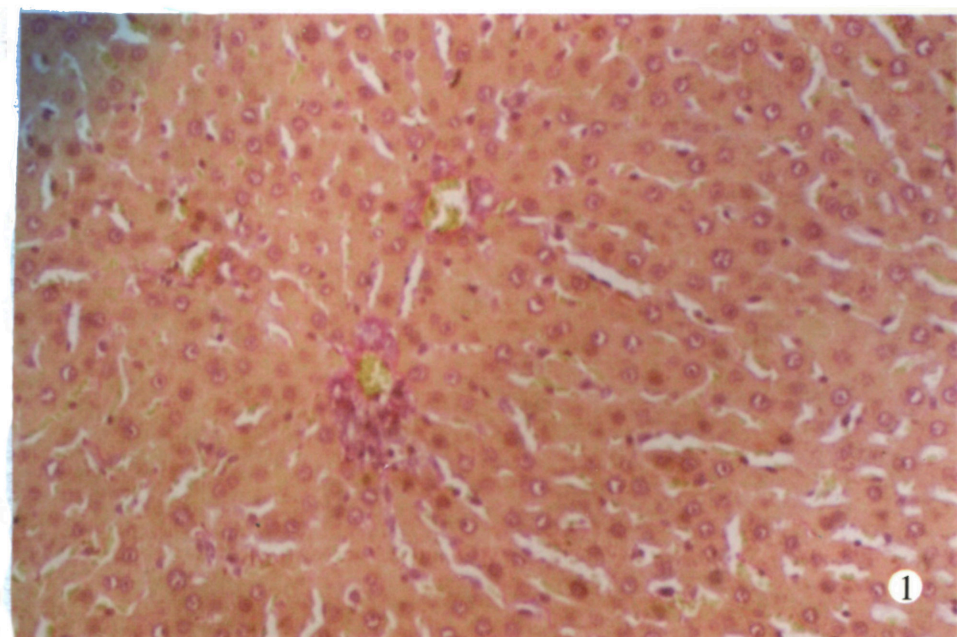


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年7月15日 第11卷 第7期 (Volume 11 Number 7)



7/2003

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7月15日 第11卷 第7期 (总第111期)

述 评	881 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征 聂青和, 罗新栋, 惠武利 888 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制 成军 897 老年消化系统疾病的中西医结合治疗 张万岱
肝 癌	900 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤 凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强 904 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡 908 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎 912 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 的研究 冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉 916 TDI-FP 法分析肝细胞癌组织中 HBV 核心启动子双突变 吕贯廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君
病毒性肝炎	920 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 925 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚 930 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 935 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚 939 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军 943 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军 947 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰 951 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰 955 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林 959 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林 963 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e 系统及 APF 水平 柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖箐, 李建国 966 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在 HepG ₂ 细胞的 HLA-I 表达 陈伟红, 何海棠, 张明霞, 刘志华, 周永兴
基础研究	970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明 975 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉 979 选择性环氧合酶-2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE ₂ 和血管内皮因子表达的影响 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大 982 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究 彭毅志, 袁志强, 肖光夏 986 胃肠道平滑肌细胞作为 eNOS 基因转移靶细胞的研究 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力 990 内皮素-1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭 994 肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用 李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭 997 p ⁵³ 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用 李庆明, 余谦, 闵存云
焦点论坛	1001 乙型和丙型肝炎病毒蛋白反式激活作用机制及其意义的研究进展 成军 1002 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟 1004 乙肝病毒表面抗原基因启动子 II 的结构及调节研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮 1006 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军 1008 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究 王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰 1011 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

焦点论坛

- 1014 丙型肝炎病毒复制子的研究 纪冬, 成军, 王建军
 1018 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
 1020 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林
 1023 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响 成军
 1027 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

课堂讨论

- 1031 北京大学医学部研究生分子肿瘤学课堂讨论及学术论坛纪要 吕有勇, 许小青

文献综述

- 1035 骨髓源性肝干细胞的研究进展 杨明智, 彭志海
 1037 ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控 蒋明德, 马洪德, 解方为
 1040 趋化因子与肝病的研究进展 胡迎宾, 田德安, 刘南植
 1043 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎 高志强, 陆付耳
 1046 KAI1 基因在胰腺癌中抗转移作用的研究 任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义
 1050 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势 谢正勇, 卿三华
 1054 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展 李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书
 1059 NO 和 VIP 与胃肠电-机械活动的关系 章敏, 曲瑞瑶
 1064 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展 刘占奎, 张超
 1068 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用 陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎

消息

- 907 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志
 915 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®
 946 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册
 950 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快
 954 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次
 985 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单
 993 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
 1030 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊
 1053 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
 1058 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版
 1063 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
 附 1 Journal Citation Reports 2002-China
 附 2 Journal Citation Reports 2002-GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY
 附 3 2003 年 Index Medicus 收录中国期刊
 附 4 2003 年 ISI 收录中国科技期刊

封面故事

- 970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明

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 2003-07-15

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

张金哲
 张学庸
 赵东海
 周殿元
 社长总编辑 马连生
 中文编辑 潘伯荣
 王瑾晖
 英文编辑 张建中
 排版 李少华
 校对 李天华

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: wjcd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社
 100023, 北京市 2345 信箱

E-mail: wjcd @ 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(PЖ)》
 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

邮发代号

国外代号

国内定价

广告经营许可证

CN 14-1260/R

82-262

M 4481

每期 24.00 元 全年 288.00 元

1401004000050

一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征

聂青和, 罗新栋, 惠武利

聂青和, 罗新栋, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
惠武利, 武警医学院流行病学教研室 天津市 300162
惠武利博士现在在北京地区从事 SARS 流行病学调研工作
项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com
聂青和博士现在在北京小汤山医院任院专家组成员, 22 病区主任
电话: 029-3377452 传真: 029-3537377
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-06-28

摘要

“严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)”, 又称为“传染性非典型肺炎(infectious atypical pneumonia)”, 是由新型变异的冠状病毒感染引起的一种以肺部感染病变为主要特征的新型传染病, 是一种新的、传染性强、死亡率高的急性呼吸道传染病. SARS传播速度很快, 在全球广泛流行, 到目前为止几个月内我国大陆、香港、台湾、北美、欧洲等 33 个国家或地区均有发现. 截止至 2003-06-06, 全球 SARS 临床诊断病例已达 8 404 例, 累计死亡 779 例; 在我国内地流行形势一度十分严峻, 目前已经得到有效的控制. 经包括我国科技人员在内的世界各国科学家的联合快速攻关, 于 2003-04-16 WHO 正式宣布冠状病毒的变异株(SARS-CoV)是传染性非典型肺炎病原体. 我们认为临床确诊 SARS 患者必须重视流行病学接触史、持续出现的发热、头痛等流感样症状及动态观察患者的胸片均是十分必要的. SARS 目前尚无特异性治疗和预防方法, 主要应用糖皮质激素、抗病毒、抗感染、机械通气、严密隔离等, 新的药物和方法尚在研究中. SARS 流行已严重干扰和影响了我国乃至国际社会的经济和社会的发展, 因此控制其流行、研究 SARS 科学、规范、可靠而有效的治疗方案刻不容缓. 目前的研究尚存在许多待解决的问题, 随着基础研究的进展, 针对 SARS 的技术和药物终将出现, 最终征服这一人类从未面临的疾病.

聂青和, 罗新栋, 惠武利. 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征. 世界华人消化杂志 2003;11(7):881-887

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/881.asp>

0 引言

自 2002-11-16 我国广东省佛山市发现第 1 例原因不明的严重呼吸道传染病^[1]. 与一般病原体(细菌、病毒、支原体、衣原体)所导致的肺炎不同, 该病起病急、病变发展迅速, 容易出现急性呼吸衰竭, 进而导致多器官功能衰竭, 具有较高的死亡率, 并且传染性极强. 由于患者主要表现为高烧、干咳、全身酸痛、呼吸困难等症状, 且病因不明, 各种抗生素治疗无效, 当时广州的

专家根据临床症状判断可能是由变异的新病毒感染引起, 据此称之为“非典型肺炎(atypical pneumonia)”^[1]. 因其传染性强, 传播快, 死亡率较高, 2003-04-08 国务院将其列为我国法定的传染病, 称为传染性非典型肺炎. 2003-02 下旬香港和越南等地也出现了类似病例^[2,3], 当时在越南河内参加救治工作的 WHO 传染病专家意大利籍的 Carlo Urbani 博士首次报道这类疾病^[4], 2003-03-29 Urbani 医生因患 SARS 以身殉职. 为了永恒纪念这位医生, 世界卫生组织(WHO) 2003-04-16 建议将导致这种新疾病的病原体命名为 Urbani-SARS 冠状病毒^[4,5].

WHO 在 2003-03-12 发出关于“非典型肺炎”的全球性警告之后, 2003-03-15 WHO 将其命名为严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS). 经过 WHO 的组织协调, 于 2003-03-17 成立了一个由全球 10 个国家和地区 11 个顶级实验室组成的合作研究网络. 中国的两个实验室(中国疾病预防控制中心病毒研究所和广东省疾病预防控制中心)于 2003-03-28 加入该研究网络. 该网络启动后, 围绕着 SARS 的各方面研究工作迅速展开, 取得了一系列速度惊人的进展.

1 流行病学

1.1 全球传播 SARS 的全球传播始于香港. 2003-02-21, 一名来自广东的医生到香港探亲, 居住于当地一所旅馆的九楼. 来港几天前他就感觉不适, 到香港后情况更为严重. 他于 2003-02-22 入院, 次日很快死亡. 从 2003-02 截止到死亡, 他总共感染了 10 名各国在此旅馆停留的客人. 这些人回去后随之导致了香港、越南、加拿大、新加坡、香港淘大花园等国家和地区的大爆发. 2003-03-14 台湾一对夫妇确诊为 SARS, 男方曾于 2003-02 去过广东和香港. 2003-03-26, 香港淘大花园的一位台胞返台, 所乘火车的所有乘客也都被感染. 截止至 2003-06-06, 全球 33 个国家或地区共发生 SARS 患者 8 404 人, 死亡 779 人; 截止 2003-06-08, 我国已发病 5 328 例, 死亡 339 例.

1.2 传染源和传播途径 关于 SARS 病毒的动物源性宿主及其来源仍未确知, 且相关研究进展甚少. 尽管国内在果子狸等体表和体内检测出了冠状病毒, 与 SARS-CoV 同源性达 99 %, 但与其接触者均未发病, 因此目前尚无有力的证据表明是动物或昆虫传播了此病.

尽管目前对于 SARS 的流行病学特征尚未完全清楚, 但可以确定其传播途径以近距离飞沫传播为主, 同时可以通过手接触呼吸道分泌物经口、鼻、眼传播.

2003-05-17, 在 WHO 总部日内瓦召开了一次 SARS 流行病学专家会议. 大会讨论认为 SARS 基本是通过大的飞沫侵入鼻或肺部的黏膜引起传播, 而非粪(尿)-口途径传播. 除了呼吸道飞沫, 人们还能产生其他具有感染性的气溶胶, 如粪便或尿液的气溶胶也会被吸入而造成传染. 这种传播不同于通常所说的粪-口传播途径, 后者需要粪便污染的食品或水. 该病在密闭的环境中易于传播, 目前该病大多发生于大、中城市, 在家庭和医院中具有明显的聚集现象. 而我国仍有传播途径不明的患者, 不排除另一种可能的传播途径^[6].

1.3 发病病例年龄分布 该病患者以青壮年人为主, 其中 20-29 岁发病率最高(29.2%), 30-39 岁、40-49 岁发病率次之. 19 岁以下青少年发病率低, 9 岁以下儿童发病率更低. 专家认为这个年龄组发病率低的原因可能有接触传染源少、预防措施到位、有对病毒的交叉免疫力等诸多原因^[7].

医院内传播是此次疫情扩散的重要原因, Booth et al^[8] 对多伦多 144 例 SARS 患者的统计结果表明, 大多数患者(77%)有医护环境接触史. 而从职业分布来看, 医护人员发病率为 57.6%, 是我国平均发病率的 38 倍. 离退休人员为 8.1%, 离退休人员发病率较高的原因可能因他们年老体弱, 去医院的机会多, 容易被交叉感染; 学生发病率低, 只有 0.9%. SARS 死亡率随年龄增高而增高, 70-79 岁高达 28%, 其原因是老年人抵抗力差, 多有高血压、心脏病等其他疾病. 最近 WHO 认为 SARS 患者的平均死亡率可达 15% 以上^[9], 并不符合我国国情.

1.4 “超级传播者” 根据 WHO 报道, 确认在感染人群中存在“超级传播者”, 即传染了 10 人以上的患者, 最甚者导致 160 人被感染.“超级传播者”的年龄构成主要是 60 岁以上的老年人, 特别是合并有糖尿病或肾病的老年患者. 其原因可能与老年患者免疫力低下, 导致体内病毒数量大大高于其他患者. 国内外专家对于超级传播者的存在亦感不解, 尚无很好的解释. 此类患者受感染病毒的基因组并无特异之处, 有可能因继发感染而产生了超强的传染性. 在牛当中, 冠状病毒与流感病毒双重感染的病例排毒期更长, 发热及呼吸道疾病也发生延长. 研究人员也提出超级传播也与被感染者的免疫系统有关, 认为传播与受染者的基因有着密切关系^[10].

2 病原学

关于导致 SARS 的病原体, 在其研究之初, 全球各地的研究组曾经存在过多种推断. 最初我国科研人员应用电子显微镜在广东的 SARS 死亡患者体内发现了衣原体样颗粒^[11], 宣布为 SARS 的病原体, 但不能被国内外其他实验室证实, 检测的标本数量也有限. 从临床表现和治疗效果来看, 衣原体作为病原的可能性不大, 有可能为继发感染. 香港疫情发生后, 2003-02-19, 研究者从香港有症状小儿身上分离出禽流感病毒(H5N1), 但

是很快也被排除. 不久后在香港和法兰克福患者的呼吸道检验样品中发现有副黏病毒(paramyxovirus)样的微粒后, 研究于是集中于副黏病毒上. 更进一步的研究发现偏肺病毒(metapneumovirus, hMPV)在许多但非所有的 SARS 患者中出现. 然而所有这些发现都不能被进一步证实.

2003-03-22, 香港大学微生物系首先利用非洲绿猴肾脏细胞(african green monkey kidney cells, Vero E6), 从一个感染者的肺组织中分离到了一种未知的病毒, 推测其很可能即为致病原^[12]. WHO 的研究网络随即集中对该病毒进行了分析, 并且在 2003-03-27 的简报中首次提到 SARS 病原体可能是冠状病毒的一种. 此后 2 wk 内, 该研究网络的多个实验室对 SARS 进行了临床标本、病理组织与影像学、病毒分离培养、血清学与免疫学诊断、分子生物学与遗传同源性等多方面的深入研究与鉴定. 2003-04-12, 加拿大 BC 肿瘤研究所基因组科学中心(BC cancer agency's genome sciences centre)首先完成了该病毒的全基因组测序^[13]. 2003-04-16, WHO 在综合分析各个研究成果的基础上^[14-21], 正式宣布一种以前未知的冠状病毒(Coronavirus)为导致 SARS 的病原体, 并命名为 SARS 冠状病毒(SARS coronavirus, SARS-CoV). 次日, 还公布了用于临床诊断该病毒的 PCR 引物^[22]. 到 2003-05 初, 全世界完成全基因组测序并提交到 Genbank 的病毒株已达到 11 株(分别为 BJ01、CUHK-W1、CUHK-Su10、HKU-39 849、Tor2、Urbani、SIN 系列 5 条). 2003-05-01/02, 加拿大、美国和中国三个研究组各自完成测序的病毒株的基因组分析. 德国 Lübeck 大学生物化学研究所(institute of biochemistry, university of Lübeck)在以往冠状病毒蛋白质研究基础之上, 发表了 SARS 冠状病毒主要蛋白酶的三级结构, 并给出了该酶的重要化学抑制剂.

根据科赫法则(Koch's postulates), 确定一种病毒为某一疾病的病原体需满足 6 个标准. SARS-CoV 已被证明满足前 3 个标准, 即从患病的宿主体内能分离到病毒; 宿主细胞能够培养该病毒; 能够通过滤菌器. 很快 Fouchier et al^[23]以 SARS 患者的 SARS-CoV 经 Vero 细胞培养后接种短尾猿验证了余下的 3 个标准: 培养的病毒能够使相同的或相近的宿主产生类似的症状; 能够从实验感染的宿主体内重新分离到病毒; 能检测到针对病毒发生的特异性免疫反应.

自此 SARS-CoV 作为 SARS 的病原体已经确证无疑, 但这并不排除有其他病原体如肺炎衣原体感染的可能. 其他病原体重叠感染可以加重 SARS 患者的病情, 不是所有的 SARS 患者均有重叠感染, 而且别的病原体通常并不造成 SARS 那样的病理损伤^[23].

SARS 病毒(SARS-Cov), 属于巢状病毒目(order: nidovirales), 冠状病毒科(family: coronaviridae), 冠状病毒属(genus: coronavirus). 根据其基因组结构分类, 其属于单链正义 RNA 病毒, 基因组全长约 30 kb.

冠状病毒共有三个组: 第 1 组和第 2 组含有哺乳动物

病毒, 而第3组仅含有鸟病毒. 这些病毒与人类和家畜的一系列疾病相关, 包括肠胃炎和上呼吸道、下呼吸道疾病. 然而动物的冠状病毒可能在动物引起严重的疾病(如猪传染性肠胃炎病毒、鼠肝炎病毒、猫传染性腹膜炎和鸟传染性气管炎病毒), 人冠状病毒以前只与轻度疾病相关^[24].

在第1组(HCoV-229E)和第2组(HCoV-OC43)中均能找到人冠状病毒(HCoVs), 其是轻度的呼吸疾病的一个主要原因(Makela). 他们能偶尔地引起小孩和成人的严重下呼吸道感染及新生儿坏死性小肠结肠炎(McIntosh, El-Sahlv, folz, sizun). 已知的人冠状病毒能够在环境中存活3 h(Sizun). 冠状病毒能通过飞沫、手接触、污染物和小微粒空气溶胶在人之间面对面传播.

SARS-CoV 由 mRNA 和磷蛋白构成核壳体, 病毒包膜上存在着大量的、特征性的花冠样的钉状突起. S 蛋白可以与宿主细胞受体结合, 然后病毒包膜与宿主细胞膜互相融合. E 蛋白能够与宿主细胞膜的糖基部分结合, 但不解的是 E 蛋白的编码基因还能够与丙型流感病毒的 mRNA 结合. 在复制过程中冠状病毒特有的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶与模板的结合位点常常会改变, 所以当细胞感染多种冠状病毒时, 会导致病毒 RNA 重新组合. 这种具有错配倾向的聚合酶可能造成点突变、基因丢失或外源性病毒基因的插入. SARS 相关冠状病毒可能是毒力大大增强的人冠状病毒变异株或者是动物冠状病毒变异后获得感染人体细胞的能力, 还有可能是两种人或动物冠状病毒基因组的重组体^[25].

一类名为 Caveolin(陷窝蛋白/凹陷蛋白)的 21-24 kD 的膜蛋白, 是构成细胞穴样内陷结构(caveolae)的主要结构成分, 参与许多细胞生命活动, 包括细胞内吞(endocytosis)、胆固醇运输、细胞膜组装、信号传导和肿瘤生成等, 也参与一些病毒的感染过程, 如 HCV、HIV 感染等. 北京大学人类疾病基因研究中心基于文献报道的 Caveolin 的四种 Motif, 利用 DNAsis 对 SARS-CoV 的编码蛋白进行了全面分析. 发现在多个结构蛋白和一个未知蛋白中, 存在着 Caveolin 结合位点. 由于 SARS 一类的冠状病毒在感染、复制的多个阶段涉及脂膜融合, 而 Caveolin 基因家族成员 Caveolin-1 在呼吸道上皮细胞高表达, 因此上述结合位点的发现提示 Caveolin 有可能参与 SARS 病毒侵入细胞时的膜融合与内吞泡形成过程. 同时指出阻断 SARS 与 Caveolin 的结合有可能阻止病毒侵入和复制, 并建议利用体外病毒感染模型尝试 Caveolin 抑制剂如 Rosuvastatin、Filipin III、反义寡核苷酸等阻断细胞病变效应. 如有阳性结果可进一步利用免疫共沉淀或 Pull-down 技术分析 Caveolin 与 SARS 冠状病毒蛋白的相互作用.

上述工作对于阐明 SARS 冠状病毒侵入宿主细胞的机制, 了解其宿主谱系, 进而对其实施有效的阻断与治疗, 有着一定的指导意义.

根据 WHO 多中心 SARS 协作组的研究显示, 室温

下病毒在尿、粪便里至少能存活 1-2 d, 在腹泻患者的粪便里(他的 pH 值比正常大便高)能存活到 4 d 以上, 在塑料的表面可以存活 24 h. 细胞培养上清中的病毒置于 4 °C 和 -80 °C 21 d 后, 病毒滴度只有轻微下降. 细胞培养上清中的病毒在室温放置 2 d 后滴度只下降了一个数量级, 在加热到 56 °C 后, 病毒滴度每 15 min 下降大约 10 000 个单位. 日常用的消毒剂如 750 ml/L 的酒精 5 min 就能使病毒失去感染活力, 含氯的消毒剂 5 min 可以灭活该病毒^[26].

3 临床表现及实验室检查

SARS 的临床表现尚无特异性, 其症状可能与军团菌、支原体和衣原体引起的其他非典型性肺炎相似. SARS 的平均潜伏期是 6.4 d, 潜伏期过后患者表现出发热伴其他一些症状, 包括寒战、强直、头痛、不适、肌痛, 而咳嗽、咽喉炎、鼻卡他症、恶心、呕吐和腹泻少见. 分析认为 SARS 病程分为三个阶段, 分别是病毒复制期(viral replicative phase)、超敏反应期(immune hyperactive phase)和肺损伤期(pulmonary destruction phase), 每个阶段时程约为 1 wk^[18].

3.1 临床症状及体征 香港大学等按 WHO 关于 SARS 的修订定义选取 2003-02-26/03-26 的患者进行临床表现和病因学研究. 临床表现统计: 发热 100%, 寒战 74%, 咳嗽 62%, 肌肉痛 54%, 小部分人有上呼吸道症状如喉咙痛 20%, 胸部 X 线检查结果与呼吸道症状和听诊结果不相合. 采取外周血进行常规检查: 淋巴细胞 60%, 红细胞 18%, 白细胞 26%, 血小板 40%. 谷丙转氨酶和肌酸激酶均升高, 分别为 34% 和 26%^[18].

Booth et al^[6]报道加拿大多伦多 144 患者中有 111 例(77%)表现出 SARS 临床症状. 其中检查证实发热 85%, 干咳 69%, 肌痛 49%, 呼吸困难 42%. 实验室检查中, 乳酸脱氢酶升高者占 87%, 血钙减少者 60%, 淋巴细胞减少者 54%. 仅有 2% 的患者有卡他症状. 144 例中 29 例患者(20%)置于重症监护室处理; 8 例患者死亡(6.5%); 多种因素分析表明, 糖尿病以及其他伴随的疾病与此病的结局相关. 尽管 SARS 有比较高的发病率和死亡率(尤其在伴有糖尿病或其他疾病的人中), 但是大部分(93.7%)患者可存活.

Lee et al^[27]报道一组人群中, 有 66 例男性患者和 72 例女性患者, 这其中有 69 人为卫生保健工作者. 最普遍的症状包括: 发热(100%); 畏寒或寒战、或二者均有(73.2%); 肌肉疼痛(60.9%); 咳嗽和头疼(> 50%). 其他普遍表现为: 淋巴细胞减少(69.6%), 血小板减少(44.8%), 乳酸脱氢酶升高(71.0%), 肌酸激酶升高(32.1%).

3.2 一般实验室检查 33.9% 的患者出现白细胞减少症(白细胞计数 < $3.5 \times 10^9/L$), 而大多数患者的中性白细胞计数和单核细胞计数都处于正常范围. 69.6% 的患者出现中度的淋巴细胞减少症(< $1\ 000/mm^3$), 44.8% 的患者出现血小板减少症(< $1.5 \times 10^5/mm^3$). 在初入院的几

天, 患者淋巴细胞计数呈持续下降. 48.2% 的患者的部分促凝血酶原激酶活性延长(>38 s), 而大多数患者的凝血酶原时间正常. 15.2% 的患者外周血检测到活性淋巴细胞^[27].

大多数患者的血液生化指标在正常范围之内, 但也有一定比例的患者出现了非正常指标. 23.4% 的患者血转氨酶水平升高(平均 60.4 ± 150.4 IU/mL), 只有 2 例患者有慢性肝炎史. 32.1% 的患者肌酸激酶水平升高(平均 126 IU/mL), 没有 1 例肌酸激酶水平升高的患者出现肌酸激酶 MB 和肌钙蛋白 T 水平异常, 提示肌酸激酶的来源不太可能是心肌. 71.0% 的患者乳酸脱氢酶水平升高. 20.3% 的患者出现低钠血症, 25.2% 的患者出现低钾血症^[8]. 少数患者流感嗜血菌、肺炎链球菌、肺炎克雷白菌、流感病毒、呼吸道合胞体病毒培养呈阳性.

3.3 PCR 检测 SARS-CoV 基因组大约 30 000 个碱基对的测序已分别由中、加、美等国完成^[28-33]. 基因序列显示 SARS-CoV 与目前已知的冠状病毒如 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 仅有很少的同源性. 通过多聚酶链反应(PCR)可检查出各种标本如血、便、呼吸道分泌物或组织中的 SARS-CoV 特有的 RNA, 但呼吸道分泌物更容易出现阳性结果. 由 WHO 实验室网络成员提供的许多 PCR 科学资料可在 WHO 网上获得(<http://www.who.int/csr/SARS/primers/en/>). 另外, 可获得 Bernhard Nocht 研究所(<http://www.bni-hamburg.de/>)包含引物及阴阳性对照的 5' - 核苷酸 RT-PCR 试剂盒. 通过欧洲有关外来病毒感染网(ENIVD; <http://www.enivd.de>)可获得诊断用的灭活标准制品. ENIVD 还备有 SARS 化验的国际外部质量方案.

尽管现存的 PCR 试验有时高度敏感, 但因对实验室、技术人员要求较高, 容易出现假阴性或假阳性. 引物设计的合理性未经时间的检验, 也容易出现偏差. 这些都使 PCR 的结果有一定的局限性.

检测 SARS 病毒的确证阳性, 至少需要 2 种不同的临床标本(如鼻咽分泌物和粪便)或采自病程中 2 d 或 2 d 以上的同一临床标本(如 2 份或更多份鼻咽吸出物), 或采用 2 种不同试验或使用原标本在不同情况下重复试验^[35].

3.4 抗体检测 不同的方法提供了一种方式来检测 SARS-CoV 感染产生的抗体. 在感染过程中, 出现不同类型的抗体(IgM 和 IgG), 抗体水平也发生变化. 感染的早期可能测不到抗体. 疾病治愈后通常仍能测到 IgG. 急性期血清抗体阴性随之康复期抗体阳性或康复期血清抗体滴度较急性期高 4 倍以上, 方可确认抗体阳性^[34].

酶联免疫黏附测定(ELISA)、免疫荧光测定(IFA)、中和反应试验(NT)是正在开发的检测手段, 还没有商品化的试剂盒提供. 检测抗体并不能达到早期诊断, 但是具有不依赖样本类型和时间的优势.

表 1 目前检测 SARS-CoV 的有效诊断试验(2003-05)

检测方法	临床材料 / 样本	技术细节	诊断意义
病毒检测			
细胞培养后的病毒分离	呼吸道样品; 痰液; BAL	合适的细胞系; Veoo 系需 III 级生物安全设施	提示存在传染性病毒; 阴性结果不能排除 SARS
聚合酶链反应	呼吸道样品; 痰液; BAL; 咽喉拭子; 咽喉冲洗	不同引物的序列和方案可从 WHO 网址获得	提示存在病毒基因, 未必有病毒, 阴性结果不能排除 SARS
抗体检测			
免疫荧光分析	血清	检测特定的 IgG 或 IgM 抗体, 或二者均测	通常在症状出现后 10 d 开始 IgM 的 IFA 通常为阳性
酶联免疫吸附试验	血清		
中和反应试验	血清	可指定检测特定 IgG 或 IgM 抗体, 或二者均测需要 BSL-3 设备("活病毒")	通常在症状出现后 21 d 结果阳性进行观察研究

3.5 影像学检查 在发热早期, 80% 以上患者显示有肺泡和气道融合. 54.6% 有单侧单个病灶, 而 45.4% 患者有双侧病灶或多点病灶. 所有患者肺部胸片出现模糊影. 最初的影像学改变不易与支气管肺炎相区别, 病变以周边为主. 所有病例中没有出现渗出和肺门淋巴结病变. 一系列胸片显示肺部阴影的吸收是判断治疗有效与否的主要标准^[35]. 周围性病灶, 治疗期间肺部片状阴影从单侧单发发展到单侧多发或双侧受累的常见进程, 目前认为无空洞、淋巴结病及胸腔积液是 SARS 更特征的 X 线表现^[36].

3.6 病理检查 病变可分为 3 期: 炎症或称为渗出期、增生期、以及最终的纤维化期. 早期的形态特征是支气管黏膜上皮脱落、纤毛丢失以及鳞状化生, 巨噬细胞浸润较为突出与其他病毒性肺炎不同. 病程小于 10 d 的患者出现肺透明膜形成, 多核巨细胞和肺泡细胞增生显

著. 多核巨细胞起源于单核细胞或者肺泡上皮细胞. 病程大于 10 d 出现弥漫性肺泡损伤, 这种弥漫性肺泡损伤的特征性表现是渗出性变化继以增生性变化. 另一显著特征是具有增大的核仁以及胞质内嗜双染颗粒的大型肺泡细胞^[37].

4 诊断标准

4.1 WHO 病例定义^[38] 按照世界卫生组织(WHO)的定义, 一个疑似病例被列为患病应具有体温记录($T > 38^{\circ}\text{C}$), 轻度呼吸道综合征, 有与 SARS 患者或与近期去过出现 SARS 病例地区的人的接触史. 疑似病例应具有: (1) 胸部 X 片显示肺炎特征; (2) 呼吸窘迫综合征; (3) 患者死于不能解释的呼吸疾病, 尸检病理解剖结果与呼吸窘迫综合征相符, 但病因不明.

4.1.1 疑似病例 (1)患者在2002-11-01之后出现: (a) 高热($>38^{\circ}\text{C}$) (b) 咳嗽或呼吸困难发病前10 d内具有以下一种或多种情况: (a) 与 SARS 疑似患者或确诊患者有过密切接触; (b) 近期有去过出现 SARS 病例地区的旅行史; (c) 居住于最近出现 SARS 传播的地区. (2) 2002-11-01 之后患者死于不能解释的急性呼吸系统疾病, 但没有尸检. 发病前10 d内具有以下一种或多种情况: (a) 与 SARS 疑似患者或确诊患者有过密切接触; (b) 近期有去过出现 SARS 病例地区的旅行史. 居住于最近出现 SARS 传播的地区: (1) 这段观察期始于2002-11-01即在中国获得非典型肺炎(现在称为SARS)病例的时间. 国际间SARS的传播是于2003-03 首先报道的, 但是在2月发作的. (2) 密切接触是指曾经为疑似或确诊的 SARS 患者进行护理, 共同生活, 或者直接接触其呼吸道分泌物和/或体液.

4.1.2 确诊病例 (1)胸部X片显示与肺炎或呼吸窘迫综合征渗出特征相一致的疑似病例. (2)通过一种或多种检测发现 SARS 冠状病毒阳性的 SARS 疑似病例. 见 SARS 实验室诊断方法的应用. (3)尸检无明确原因, 但病理结果与呼吸窘迫症相符的疑似病例.

4.1.3 排除标准 如果另一种诊断能够完全解释病因则可以排除此病.

4.2 病例的重新分类 当前 SARS 的诊断是一种排除性诊断, 随着时间的变化, 已报告的病例诊断有可能改变. 对患者应该根据临床特征进行管理, 而不考虑是什么疾病. (a) 一个最初被列入疑似或确诊病例, 另一种诊断能够完全解释病因时, 在经过仔细的考虑可能共同感染的情况下, 应当排除 SARS. (b) 一个疑似病例, 经过调查, 符合确诊病例的定义, 应当重新归类为“确诊病例”. 胸部X片正常的疑似病例应当按照相应的措施处理, 并监测7 d. 对于那些恢复不彻底的病例应该用胸部X片检查重新进行评估. (a) 对于那些完全恢复的疑似病例, 另一种诊断也不能充分解释病因, 则依旧归类为“疑似病例”. (b) 对于死亡的疑似病例, 如果没有尸检结果, 应当仍旧归类为“疑似病例”. 但是, 如果这个患者被认为是 SARS 传播链中的一部分, 应当重新归类为“确诊”. (c) 如果进行了尸检, 没有发现呼吸窘迫症的病理证据, 应当排除此病例.

4.3 CDC 病例定义^[39] 对临时监视病例的定义, 美国疾病控制和预防中心补充了冠状病毒相关的SARS(SARS-CoV) 感染证据的实验室标准.

利用这些新的实验室标准, 如果能够满足以下的一条, 即能诊断为SARS: (a) 直接荧光抗体法(IFA)或酶联免疫黏附测定法(ELISA)检测到 SARS-CoV 抗体. (b) 组织培养分离出 SARS-CoV. (c) 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 检测出 SARS-CoV 的 RNA, 用第二次 RT-PCR 进行了确定.

病毒培养或患病21 d内抗体检测为阴性的实验室结果不能排除冠状病毒感染. 在这些病例中, 为了检测是否感染, 需要取疾病发作21 d以后的标本进行抗体检测.

4.4 重症病例诊断标准 符合下列标准的其中1条即可诊断^[40]: (1)多叶病变或X线胸片48 h内进展 $>50\%$; (2)呼吸困难, 呼吸频率 >30 次/min; (3)低氧血症, 吸氧3-5 L/min条件下 $\text{SaO}_2 < 93\%$ 或氧合指数 < 300 mmHg; (4)出现休克、ARDS或多器官功能衰竭等.

SARS 的非典型症状对患者、医护工作者和探视者来说都是一种潜在的威胁. WHO的疾病定义是一个有效的流行病防制手段, 但这不能代替对疾病的临床表现、实验室检查和胸片的完全的分析. 医生在处理患者时不能生搬硬套流行病的诊断标准^[41]. 患者患有其他病症可能导致不发热, 也有可能重症爆发性疾病使免疫力受损而不发热.

根据实际经验和文献^[54]报道, 我们认为临床确诊 SARS 患者必须重视流行病学接触史、持续出现的发热、头痛等流感样症状及动态观察患者的胸片均是十分必要的.

5 处理和预防

目前对 SARS 尚无特效的治疗措施. 80% 的患者在前两个阶段, 即病毒复制期和超敏反应期, 经过及时有效的器械辅助及药物治疗之后, 即可出现好转, 并最终痊愈. 另外20% 则出现肺损伤期症状, 需要接受更进一步的治疗. 而且, 有10% 左右的患者需要接受特别的康复治疗, 以恢复正常的呼吸功能.

5.1 成人 SARS 的治疗方案^[42]

5.1.1 抗生素的治疗 (1) 1次/d 静脉给予或口服左旋氧氟沙星500 mg; (2) 如患者未满18岁或为孕妇或怀疑为结核感染, 则改为口服甲红霉素500 mg, 2次/d; 同时加用 amoxiclav (amoxicillin + clavulanic acid) 375 mg, 3次/d, 口服.

5.1.2 利巴韦林和甲基泼尼松龙 当出现以下情况时联合运用利巴韦林和甲基泼尼松龙: (1) 胸片显示大范围的阴影或双侧阴影; (2) 胸片有持续性恶化或高热持续2 d以上; (3) 临床表现、胸片或实验室检查提示有恶化; (4) 不吸氧时氧饱和度低于95%;

5.1.3 21 d 标准皮质类固醇摄生法治疗 (1) 静脉给予1 mg/kg 的甲基泼尼松龙(每日3 mg/kg), 8 h/次, 持续5 d; (2) 静脉给予1 mg/kg 甲基泼尼松龙(每日2 mg/kg), 12 h/次, 持续5 d; (3) 口服0.5 mg/kg 强的松龙(每日1 mg/kg), 2次/d, 持续5 d; (4) 口服0.5 mg/kg 强的松龙, 1次/d, 持续3 d; (5) 口服0.25 mg/kg 强的松龙, 1次/d, 持续3 d; (6) 最后停药.

5.1.4 10-14 d 的利巴韦林摄生法 (1) 静脉给予400 mg 利巴韦林, 8 h/次, 至少持续3 d; (2) 口服1 200 mg 利巴韦林(2 400 mg/d), 2次/d.

5.1.5 甲基泼尼松龙-脉冲法治疗 (1) 如临床情况、胸片恶化或氧饱和度下降(至少有两种), 及有持续性淋巴细胞减少时, 脉冲给予甲基泼尼松龙; (2) 静脉给予甲基泼尼松龙500 mg, 2次/d, 持续2 d, 然后恢复标准的皮质

类固醇治疗。

5.2 通气 当每分钟供氧量大于6升时血氧饱和度仍不到96%时或患者主述有呼吸困难时,应考虑给予吸氧或呼吸机。插管通气的指征:(1)经无创通气治疗病情无改善,表现为 $\text{SaO}_2 < 93\%$,面罩氧浓度5 L/min,肺部病灶仍增加;(2)不能耐受无创通气明显气促;(3)中毒症状明显,病情急剧恶化^[43-47]。

机械通气时应掌握的一个重要原则是允许存在高碳酸血症,可减少潮气量和每分钟氧供。通常在出现大面积实变、顺应性差、易发生气胸时使用。 $\text{SaO}_2 < 90\%$, PEEP在10-15 cm H₂O,可防止肺泡萎陷,改善供氧。钟南山院士提出了四条有效的临床治疗经验^[40]:(1)在起病初期患者出现类似流感症状时,用中西医结合方法清热解毒治疗有效;(2)肺纹理或病理改变酷似纤维化病程时,及时用大剂量糖皮质激素;(3)患者出现缺氧,呼吸困难时,及早采用无创通气;(4)对中后期严重免疫功能低下者,关注患者的继发感染。

5.3 研究中的治疗 香港报道^[48]以少量痊愈患者的血清对较重的SARS患者进行治疗,取得了较好的临床疗效。但是例数不多,存在用血安全^[49]和血源不足的问题,临床使用受限。其他蛋白酶抑制剂^[50]、肺泡表面活性物质^[51]正在开发中。

6 防护

由于SARS病毒具有很强的传染性,医护人员在诊治SARS患者的过程中,比如在使用气雾剂进行氧疗、采取鼻咽部标本、气管插管、吸痰、以及给没有气管插管的患者进行胸部理疗时都能增加医护人员感染SARS病毒的机会。所以在研究有效治疗方案的同时,还要寻找使医护人员免于感染的方法^[43]。

预防SARS病毒感染首先应该对ICU的工作人员进行岗前培训,培训内容包括:尽快熟悉高危环境中的医疗操作程序、在病房中如何减少暴露程度及提高工作效率、学习在互不接触的情况下如何穿脱隔离衣、时刻警惕防止SARS病毒感染、自身健康状况的监护、一旦发现感染SARS病毒及时报告等。

ICU工作人员最好选用N95或FFP2型呼吸器,他可以持续保护8 h,而一般呼吸器只能在4 h内有效防止病毒通过空气传播。医护人员进入病房前应穿两层隔离衣、两顶帽子、两副手套和鞋套,并且每到另一病房之前都应更换隔离衣、手套、帽子、面罩、鞋套和眼罩。笔和纸等私人物品不能带出ICU病房,进行气管插管和气管镜检查等危险性较大的操作时应穿戴具有高效空气净化作用的面罩。

SARS患者需要使用负压的单人间病房,房门要保持关闭。病房内要配备必要的基础设施和急救药品,病房内的设备不能共用。还应安装录像设备、监护患者的窗口及消毒设备,并不间断地用含乙醇的消毒剂进行消毒。

SARS患者应尽可能避免转运,确实需要转运时应预

先考虑好每一个可能增加病毒传播机会的环节,时刻警惕防止病毒传播。使用氧气袋的气管插管患者进行转运时应在氧气袋和气管插管连接处放置滤膜。ICU的工作人员如果已经感染SARS病毒或者出现病因不明的发热应及时报告并停止工作。

7 结论

通过知识共享,我们将可以做到提高SARS患者生存率,保护人类健康。SARS是由一种新出现的病毒引起的疾病,他的传染性很强。目前我们只是初步了解了这个疾病的病原学和流行病学。在互相协作和信息交流的过程中,使我们对SARS的认识不断深入,WHO作为发起者和组织者起到了重要的不可替代的作用,也为国际间联合攻克医学难题提供了全新的方式。尽管以后使用的预防、治疗等措施将不断完善,但是彻底的控制和防治SARS还有许多问题需要研究,这些问题包括^[52,53]:(1)SARS病毒来源、变异、生活周期和传播途径与规律的深入研究。(2)病毒在体内复制、扩增和入侵细胞机制的研究。(3)病毒免疫和继发反应与细胞凋亡和急性肺损伤的发病机制。(4)快速诊断和疫苗的研制。(5)特异性抗病毒药物包括核酸药物等生物工程药物的开发。

8 参考文献

- 1 WHO. Cumulative number of reported cases of severe acute respiratory syndrome (SARS). March 31,2003 (http://www.who.int/csr/sarsarchive/2003_03_31/en)
- 2 WHO. Weekly epidemiological record. 14 MARCH 2003, 78th YEAR/14 MARS 2003. <http://www.who.int/wer/pdf/2003/wer7811.pdf>
- 3 Berned Sebastian Kamps & Kamps-Hoffmann. 1. Timeline. SARS Reference (First Edition). May 8,2003.<http://sarsreference.com/index.htm>
- 4 Reilley B, Van Herp M, Sernand D, Dentico N. SARS and Carlo Urbani. *N Engl J Med* 2003;348:1951-1952
- 5 WHO. Coronavirus never before seen in humans is the cause of SARS. 16 April 2003. http://www.who.int/csr/sarsarchive/2003_04_16/en/
- 6 Robert Walgate. SARS transmitted via droplets(Main SARS infection routes, etiology, and control methods confirmed). *The Scientist Daily News* May 19,2003
- 7 Chan-Yeung M, Yu WC. Outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Special Administrative Region: case report. *BMJ* 2003;326:850-852
- 8 Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, Rachlis AR, Rose DB, Dwosh HA, Walmsley SL, Mazzulli T, Avendano M, Derkach P, Ephantimos IE, Kitai I, Mederski BD, Shadowitz SB, Gold WL, Hawryluck LA, Rea E, Chenkin JS, Cescon DW, Poutanen SM, Detsky AS. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater toronto area. *JAMA* 2003; 289:2801-2809
- 9 Stein R, Connolly C. Estimated SARS death rate rises to 15%. *washington post staff writers*, thursday, May 8, 2003:A26. <http://cmbi.bjmu.edu.cn/news/0305/92.htm>
- 10 Catherine Zandonella. SARS unanswered questions. *The scientist daily news* may 19,2003. <http://www.sarsweekly.net/epidemic/E030519-01.MHT>
- 11 洪涛,王健伟,孙异临. 电镜观察从非典型肺炎患者尸检标本中发现衣体样和冠状病毒样颗粒. *中华医学杂志* 2003;83:632-636
- 12 Lab CDC. Analysis suggests new coronavirus may cause SARS. March 24, 2003. <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r030324.htm>

- 13 SARS suspect sequenced. 14 April 2003. <http://sciencenow.sciencemag.org/cgi/content/full/2003/414/3>
- 14 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-1966
- 15 Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003;300:1394-1399
- 16 Falsey AR, Walsh EE. Novel coronavirus and severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1312-1313
- 17 Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escricou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-1976
- 18 Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1319-1325
- 19 No authors listed. Severe acute respiratory syndrome (SARS) and coronavirus testing-United States, 2003. *Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:297-302
- 20 From the centers for disease control and prevention. Severe acute respiratory syndrome (SARS) and coronavirus testing-United States, 2003. *JAMA* 2003;289:2203-2206
- 21 Update 31 - Coronavirus never before seen in humans is the cause of SARS. http://www.who.int/csr/sarsarchive/2003_04_16/en/
- 22 PCR primers for SARS developed by WHO Network Laboratories. 17 April 2003 <http://www.who.int/csr/sars/primers/en/>
- 23 Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, Van Amerongen G, Van Doornum GJ, Van Den Hoogen BG, Peiris M, Lim W, Stohr K, Osterhaus AD. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 2003;423:240
- 24 聂青和. 冠状病毒感染. 现代感染性疾病与传染病学. 北京:科学出版社, 2000:715-721
- 25 Holmes KV. SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med* 2003;348:1948-1951
- 26 First data on stability and resistance of SARS coronavirus compiled by members of WHO laboratory network. <http://www.sarsweekly.net/basic/B030507-01.htm>
- 27 Lee N, Hui D, Wu A, Chan P. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1986-1994
- 28 Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattra J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Krajden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, Roper RL. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003;300:1399-1404
- 29 Dye C, Gay N. Modeling the SARS Epidemic. *Science* 2003; [epub ahead of print]
- 30 Lipsitch M, Cohen T, Cooper B, Robins JM, Ma S, James L, Gopalakrishna G, Chew SK, Tan CC, Samore MH, Fisman D, Murray M. Transmission Dynamics and Control of Severe Acute Respiratory Syndrome. *Science* 2003; [epub ahead of print]
- 31 Riley S, Fraser C, Donnelly CA, Ghani AC, Abu-Raddad LJ, Hedley AJ, Leung GM, Ho LM, Lam TH, Thach TQ, Chau P, Chan KP, Lo SV, Leung PY, Tsang T, Ho W, Lee KH, Lau EM, Ferguson NM, Anderson RM. Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: Impact of Public Health Interventions. *Science* 2003; [epub ahead of print]
- 32 Fisher DA, Chew MH, Lim YT, Tambyah PA. Preventing local transmission of SARS: lessons from Singapore. *Med J Aust* 2003;178:555-558
- 33 Stohr K. A multicentre collaboration to investigate the cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1730-1733
- 34 Use of laboratory methods for SARS diagnosis. <http://www.who.int/csr/sars/labmethods/en/print.html#lab>
- 35 Lee N, Hui D. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1986-1994
- 36 Wong KT, Gregory FR, Antonio E. *Radiology* 2003, 10.1148/radiol.2282030593. Published online before print May 20, 2003
- 37 Nicholls JM, Poon LL, Lee KC, Ng WF, Lai ST, Leung CY, Chu CM, Hui PK, Mak KL, Lim W, Yan KW, Chan KH, Tsang NC, Guan Y, Yuen KY, Peiris JS. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1773-1778
- 38 Wong KT, Antonio GE, Hui DS, Lee N, Yuen EH, Wu A, Leung Rainer TH, Cameron P, Chung SS, Sung JJ, Ahuja AT. Case definitions for surveillance of severe acute respiratory syndrome SARS. <http://www.who.int/csr/sars/casedefinition/en/>
- 39 Updated interim US. Case definition of severe acute respiratory syndrome (SARS). May 23, 2003, 10:00 PM. <http://www.cdc.gov/ncidod/sars/diagnosis.htm>
- 40 钟南山. SARS 临床诊治现状. *中国医学论坛报* 2003;4:29
- 41 Fisher DA, Lim TK, Lim YT, Singh KS, Tambyah PA. Atypical presentations of SARS. *Lancet* 2003;361:1740
- 42 So LK, Lau AC, Yam LY, Cheung TM, Poon E, Yung RW, Yuen KY. Development of a standard treatment protocol for severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1615-1617
- 43 Lapinsky SE, Hawryluck L. ICU management of severe acute respiratory syndrome. *Intensive Care Med* 2003 May 9 [epub ahead of print]
- 44 The acute respiratory distress syndrome network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1301-1308
- 45 Allegra L, Blasi F. Problems and perspectives in the treatment of respiratory infections caused by atypical pathogens. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:21-27
- 46 Atabai K, Matthay MA. The pulmonary physician in critical care. 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. *Thorax* 2002;57:452-458
- 47 Cordingley JJ, Keogh BF. The pulmonary physician in critical care. 8: Ventilatory management of ALI/ARDS. *Thorax* 2002;57:729-734
- 48 Wong VWS, Dai D, Wu AKL, Sung JY. Treatment of severe acute respiratory syndrome with convalescent plasma. *HK MJ*. <http://www.hkmj.org/hkmj/update/SARS/cr1606.htm>
- 49 WHO Recommendations on SARS and Blood Safety. <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/bloodsafety/en/>
- 50 Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: Basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 2003 May 13 [epub ahead of print]
- 51 Moller JC, Schaible T, Roll C, Schiffmann JH, Bindl L, Schrod L, Reiss I, Kohl M, Demirakca S, Hentschel R, Paul T, Vierzig A, Gronbeck P, Von Seefeld H, Schumacher H, Gortner L. Treatment with bovine surfactant in severe acute respiratory distress syndrome in children: a randomized multicenter study. *Intensive Care Med* 2003;29:437-446
- 52 Zhang JZ. Severe acute respiratory syndrome and its lesions of digestive system. *World J Gastroenterol* 2003;9:1135-1138
- 53 Nie QH, Luo XD, Hui WL. Advances in clinical diagnosis and treatment of severe acute respiratory syndrome. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1139-1143

病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制

成军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
成军,男,1963-08-17生,山东省淄博市人,汉族。1986年毕业于第一军医大学军医系,获医学学士学位,1989年毕业于军医进修学院,获传染病学硕士学位,1994年毕业于北京医科大学,获传染病学博士学位,1994-11-17/1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究,教授,主任医师。现任中华医学会传染病与寄生虫学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫学分会全国常委、全军医学科学技术委员会传染病与寄生虫学分会委员。目前从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作,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,已出版专著5部,发表论文及综述300篇。
国家自然科学基金资助课题, No.C39970674, No.C03011402,军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
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:2003-01-13 接受日期:2003-02-18

摘要

病毒性肝炎的发病机制中涉及到复杂的反式调节(trans-regulation)机制。肝炎病毒的反式调节机制至少包括三方面的含义:一方面是肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因组表达调节的反式调节,即肝炎病毒蛋白与肝细胞基因组启动子DNA结合,对于肝细胞基因表达谱产生影响;第二方面是肝细胞蛋白对于肝炎病毒基因表达的反式调节。肝炎病毒属于简单的生物类型,要完成其生活周期,必须借助于肝细胞中的蛋白成分,肝细胞中特有的一些蛋白成分,与肝炎病毒基因组DNA/RNA结合,对于肝炎病毒基因表达进行调节,这也是决定肝炎病毒嗜肝特性的重要的分子生物学机制;第三方面是肝炎病毒蛋白对于肝炎病毒基因组表达的反式调节。这是所有病毒复制和表达调节的一般机制。关于肝炎病毒反式调节机制的研究,主要是阐明肝炎病毒为何在肝细胞中的复制和表达处于最佳状态,阐明肝炎病毒的致病机制,有助于据此设计新型的抗肝炎病毒的治疗技术和治疗方法。

成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11(7):888-896
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/888.asp>

0 引言

基因表达的调节方式分为顺式(cis)调节和反式(trans)调节,肝炎病毒基因表达的调控也不例外。分子结构内部的基因表达调节元件的作用形式称为顺式调节,而分子间的基因表达调节元件的作用形式称为反式调节。例如,肝炎病毒基因启动子对于本身下游编码基因的转录表达的调节就属于分子内部不同部分之间的调节,称为顺式调节;而与肝炎病毒DNA/RNA结合的肝炎病毒蛋白、肝细胞蛋白对于肝炎病毒基因表达的调节则

称为反式调节。肝炎病毒与哺乳动物细胞的基因表达调节的机制相类似,主要是转录水平的反式调节机制。乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)虽然分属于DNA病毒和RNA病毒,但是,这两种肝炎病毒的基因复制和表达均存在复杂的调节机制,其中反式调节机制是重要的组成部分^[1]。HBV基因编码的蛋白除了与自身的基因组DNA/RNA结合并进行调控之外,某些肝炎病毒的蛋白如HBxAg、截短型表面抗原中蛋白(MHBs^d),HCV基因编码的核心蛋白、NS3蛋白、NS5A蛋白等都具有显著的肝细胞靶基因的反式调节功能^[2-4]。同时,HBV的DNA、RNA以及HCV RNA等调节基因区等都有肝细胞蛋白的结合位点,肝细胞蛋白与这些调节基因之间的结合,调节这些肝炎病毒的基因表达与转录,也是决定这些肝炎病毒均具有一定程度的嗜肝特性的分子生物学机制^[5,6]。

1 肝炎病毒蛋白对于肝炎病毒基因的反式调节

HBV基因表达的精确调节是HBV DNA复制过程中的必须环节。HBV的基因组是在前-C/基因组启动子(CP)、表面抗原基因启动子SP I、SP II和X基因启动子(XP)的分别调节作用下进行的。除了SP I之外,其他的所有启动子DNA序列都缺乏典型的转录起始复合物典型的TATA盒式结构,因此代表了一类特殊类型的启动子序列结构。在HBV DNA序列之中,还存在着2段启动子序列和一些负性调节元件,提示HBV DNA的复制过程受到严密的调控。所有这些顺式调节元件都包埋在基因组的编码基因序列之中,说明HBV DNA是一种紧密结构,最大程度地利用了较小的基因结构,发挥最大的调节功能,利用率之高,实为罕见。HBV DNA的这些调控元件也都是肝细胞特异性的,这也是决定HBV嗜肝特性的重要的分子生物学机制。HBV基因编码的一些蛋白对于HBV DNA/RNA的结合与调节是HBV反式调节机制中重要的内容和组成部分^[7]。HCV的基因表达调节也是如此,5'-非翻译区(5'-NTR)和3'-非翻译区(3'-NTR)的RNA序列,是关于HCV复制和表达的关键的基因结构序列。HCV的5'-NTR可以折叠成为4段茎环(stem-loop)结构,主要与HCV RNA的复制过程的调节有关,3'-NTR则主要与HCV RNA的复制过程有关。肝炎病毒蛋白的结合实现其自身的反式调节机制。

HBV DNA的复制与逆转录病毒的复制过程不同,不需要有核苷酸片段作为引物,可直接从称为 ϵ (epsilon)元件的RNA茎环结构开始合成全新的HBV RNA分子。从

ε 开始合成一小段 DNA, 与 P 蛋白共价相连, 然后合成就停止. 起始位点的选择和合成停止的信号就包含在 P 蛋白/ ε 元件形成的复合物中. 因为 P 蛋白的活性是细胞分子伴侣依赖性的, 因此利用体外兔网织红裂解物进行鸭 HBV DNA P 蛋白的体外翻译, 也可以形成这种复合物. 根据共价结合的鸭 HBV DNA P 蛋白的标记, 可以研究引物合成过程中 ε RNA 元件的功能. 应用这一体外系统, 结合一系列的 RNA-DNA 突变体, 发现在第 57 个核苷酸茎-环结构的 5 个核糖基团才是功能性模板, 模板区只有一个残基, 在低位的茎结构的顶端有 2 个碱基, 都是基本结构的组成部分. 2'-OH-基团的存在以及起始位点稍下游碱基性质包含起始位点的选择和合成停止的信号. 具有复制功能的嗜肝病毒核心颗粒的装配需要核心蛋白、聚合酶与病毒前基因组中包装信号 ε 之间的相互作用. 核心蛋白 N-末端部分(aa 1-149) 可以自发地装配成核壳结构, 而 C-末端部分(aa 150-183) 可与前基因组 RNA 结合. Waris et al^[9] 构建了 2 种 HBV 核心蛋白的突变体(C144Arg 和 C144Lys), 其 C-末端的 SPRRR(Ser-Pro-Arg-Arg-Arg) 基序以精氨酸或赖氨酸残基替换, 以研究这一基序在前基因组装配和病毒成熟中的作用. 以表达突变或野生型核心蛋白的表达质粒与缺失核心蛋白编码区的质粒共转染人肝癌细胞系 HuH-7, 研究反式互补对于病毒复制效率的影响. 在所有共转染的细胞质中, 都存在密度有差别的核颗粒, 但由 C144Arg 和 C144Lys 突变体构成的核颗粒由于缺乏内源性的聚合酶活性, 不能修复 HBV DNA. 另外, 以 pHBVC144Arg 或 pHBVC144Lys 与产生具有复制功能的核颗粒的质粒进行共转染, HBV DNA 的修复信号下降 40-80 倍, 这是因为野生型与突变型结合形成的嵌合体, 对于 HBV DNA 修复功能的影响. 提示位于核心蛋白 C-末端的 SPRRR 基序对于 HBV DNA 的复制和成熟非常关键.

2 肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因表达的反式调节

2.1 HBV 截短型表面抗原中蛋白的反式激活作用

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. 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^[9,10].

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^[11,12].

2.2 乙型肝炎病毒 X 蛋白的反式激活作用

慢性 HBV 感染者, HBxAg 蛋白在 HCC 形成过程中具有十分重要的意义. Ogden et al^[13] 发现 HBxAg 的反式激活功能, Vero 细胞中表达的 HBxAg 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 HBxAg 蛋白可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-DR(HLA-DR)、主要组织相容性抗原-I(MHC-I) 及白介素-8(IL-8) 等都有反式激活作用. 为了研究 HBV 感染者 HBxAg 蛋白在肝细胞恶性转化过程中的具体作用, Lee et al^[14] 构建了受四环素严格调控的 HBxAg 蛋白表达载体, 建立表达 HBxAg 蛋白的分化细胞系 3pX-1 和去分化细胞系 4pX-1. 只有 3pX-1 细胞系有恶性转化的现象, 主要机制就是持续的 Ras-Raf-MAPK 系统的激活. 没有发生转化的 4pX-1 细胞系具有持续的 JNK 信号转导系统的激活. HBxAg 蛋白在 3pX-1 和 4pX-1 细胞系中参与的信号转导通路是有差别的. 对于这 2 个细胞系的细胞周期参数进行比较研究, 3pX-1 细胞系表现出 HBxAg 蛋白依赖性的 G1、S 和 G2/M 期的进展, 表现为细胞周期素 D1、A 和 B1 的表达水平升高, Cdc2

激酶的激活等. 在 4pX-1 细胞系中可以见到 HBxAg 蛋白依赖性的 G1 和 S 期的进入, 之后是 S 期的停止, 缺乏 Cdc2 激酶的激活. 4pX-1 细胞系表现出 HBxAg 蛋白诱导的细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p21(Cip1)、肿瘤抑制蛋白 p19(ARF)、细胞凋亡蛋白 bax 以及胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)的表达. 尽管出现了 HBxAg 蛋白诱导的生长停滞, 也没有 Cdc2 的激活, 但 4pX-1 细胞系并没有出现 HBxAg 蛋白依赖性 G2/M 阻滞或细胞凋亡.

HBV 的 HBxAg 蛋白可以诱导 Fas 配体(FasL)的表达, 从而帮助肝细胞癌(HCC)细胞逃避宿主的免疫监视系统. Lee et al^[15]研究了 HBxAg 蛋白诱导转录因子 Nur77 基因的表达. Nur77 是细胞核内的一种孤生受体, 在 FasL 表达上调中具有重要作用. 以表达 HBxAg 蛋白的 Chang X-34 细胞系进行研究时, 发现 HBxAg 蛋白的表达可以诱导 Nur77 的表达. 将反义基因或者负显性突变体导入细胞中对于 Nur77 基因的表达进行阻断时, 可以显著阻断 HBxAg 蛋白对于 FasL 的基因表达的诱导. 说明 Nur77 在 HBxAg 蛋白诱导 FasL 的表达过程中具有重要的作用. 进一步的研究结果表明, 表达 HBxAg 蛋白的细胞系具有较高的 Nur77 转录水平以及 DNA 的结合能力, 说明 Nur77 在 HBxAg 蛋白诱导 Fas/FasL 信号转导过程中具有关键的调节作用.

HBxAg 蛋白对于细胞基因表达的影响是十分广泛的, 这也是 HBV 相关的 HCC 发生发展的重要机制. 但是, 关于 HBxAg 蛋白的分子生物学作用机制, 大部分都是以肝癌细胞系作为细胞模型进行研究的, Nijhara et al^[16]构建了转导正常肝细胞的有效基因转移途径, 结果表明, 这种基因转移技术可以使 50% 以上的细胞表达 HBxAg 蛋白. Tarn et al^[17]证实 HBxAg 引起的肝细胞的恶性转化过程与 RAS-RAF-MAPK 和 JNK 信号转导途径有关. Kang-Park et al^[18]证实 HBxAg 蛋白通过转录因子 Sp1 调节胰岛素样生长因子 II(IGF II)启动子 4 的活性. 在这一调节系统中, PKC 和 p44/p42 MAPK 是必须的. 首先, PMA 对 PKC 的激活, 或者 PKC 的表达载体可以促进 Sp1 转录因子的磷酸化, 提高 P4 启动子的转录活性. PKC 的抑制剂 Go6976 可以降低 Sp1 的磷酸化, 同时降低 P4 启动子的活性以及 IGF-II mRNA 的转录表达水平. MEK 激活抑制剂 U0126 降低 Sp1 的磷酸化水平, P4 启动子活性和 IGF-II mRNA 转录表达水平下降. 这些结果说明 PKC、p44/p42 MAPK 信号转导通路是 HBxAg 通过 Sp1 介导的 IGF-II 基因激活的重要条件. Pflum et al^[19]证实, HBxAg 与 CREB 之间可以结合, 并且可以促进这种蛋白的 DNA 结合能力. HBxAg 在反式激活靶基因转录调节的机制中, 需要 Ser-133 位点没有发生磷酸化修饰的 CREB 的参与. HBxAg 可以上调 Camp 应答基因的表达, 说明在肝细胞的增生, 直至肝细胞的恶性转化过程中都有十分重要的作用. Park et al^[20]对 p53 基因发生突变的 Hep3B 细胞系进行了研究, 以 HBxAg 表达载体进行稳定转化时, p21(waf1/cip1)mRNA 转录和蛋白表达水

平显著升高, 与 CDK2 结合的水平显著升高, 显著抑制了细胞周期素 E 和 CDK2 复合物的形成以及组蛋白 H1 的磷酸化修饰, p21 启动子活性增强. 利用基因突变技术, 证实 p21 启动子在 -1185 和 -1482 nt 之间. 基因突变分析结果表明, HBxAg 应答位点与 ets 因子结合位点重叠. 说明在这一细胞系中, HBxAg 可以克服由于 p53 功能缺失造成的下游 p21(waf1/cip1)表达调节的障碍.

HBxAg 蛋白功能域的分析: Guo et al^[21]认为至少有一个位于 103-117 aa 的功能域对其作用非常重要. Madden et al^[22]结果显示, 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 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. Shamay et al^[23]认为 C 末端 134-139 aa(LGGCRHK)较保守, 缺失后 HBxAg 的反式转录活性几乎完全丧失. Bouchard et al^[24]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), 这三段序列在不同的嗜肝病毒中高度保守, 第一段序列形成组氨酸/天冬氨酸功能样特征, 第二与第三段序列与 Kunitz 样丝氨酸蛋白酶抑制剂的 Kunitz 功能区高度同源. N 末端 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 HBxAg 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.

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: 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; 其次, 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, 而病毒蛋白在患者体内水平通常很低; 第一, 不同的细胞类型将有不同的应答; 第二, 细胞培养环境不可能完全真实地反映活体内环境; 最后, 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.

2.3 丙型肝炎病毒核心蛋白的反式调节 丙型肝炎病毒核心蛋白是 HCV 基因组编码的一种结构蛋白, 具有多种生物学调节作用, 与 JAK-STAT 信号转导系统的调节有密切关系^[25]. JAK-STAT 信号转导系统是干扰素 α (IFN α) 和 I 型细胞因子广泛采用的信号转导途径. 这些细胞因子首先激活 JAK 激酶, 然后磷酸化和激活 STAT 蛋白. 在磷酸化和激活之前, STAT 蛋白存在于细胞质之中, 激活之后就发生细胞内转位, 到达细胞核中, 对肝细胞基因组的表达进行调控. 研究发现, HCV 抑制 IFN α 介导的 JAK-STAT 信号转导系统, 主要机制是阻断 IFN α

刺激的基因因子3(ISGF3)复合物的形成. 但是其下游的信号转导通路以及主要的 HCV 蛋白类型目前还不是特别清楚. Li et al^[26]对 HCV 核心蛋白对于 IFN α 和干扰素 γ (IFN γ)介导的 JAK-STAT 信号转导的影响进行了研究. HCV 核心蛋白的表达对于 IFN α 诱导的 STAT1 表达具有显著的下调作用, 凝胶阻滞分析(gel retardation assay)表明表达 HCV 核心蛋白的细胞, 受到 IFN α 刺激后反式激活因子 GAF 和 ISGF3 的形成显著降低. 蛋白表达和 RNase 保护研究表明, GAF 或 ISGF3 形成能力的降低, 与 STAT1 蛋白表达水平的降低有关. 但这些信号转导途径的改变对于下游靶基因如 IFN α 调节因子 -1(IRF-1)、561 的表达没有显著影响. 以 HCV 结构和非结构基因稳定转染的细胞, 也有类似的效应, 原因不清楚.

为了研究 HCV 的恶性转化作用, Kim et al^[27]建立了稳定表达 HCV 核心蛋白的 BALB/3T3 A31-I-1 细胞系, 这一细胞系在受到 HCV 核心蛋白与 v-H-ras 的基因共转染时, 就失去生长接触抑制, 发生形态学改变, 呈现非贴壁生长, 而且出现非血清依赖性生长的特点. 表达 HCV 核心蛋白的细胞系在受到生长因子的刺激以后, 生长速度显著加快. 另外, 以人工合成的反义寡聚脱氧核糖核苷酸(ODN)阻断细胞中 HCV 核心基因的表达, 对于其生长具有一定的抑制作用. HCV 核心蛋白可激活 MAPK 和血清应答元件(SRE).

HCV 的基因分型和 HCV 核心蛋白的一级结构序列对于其功能也具有十分重要的意义. Lee et al^[28]研究证实 HCV 基因型 1 a 和 3 的核心蛋白对于 MEK1 和 Erk1/2 MAPK 都有激活作用, HCV 核心蛋白持续表达可产生 Raf1 和 MAPKK 高基础水平的表达, 这种现象可以通过内源性 Raf1 活性的体外分析及高度磷酸化的 Erk1 和 Erk2 的水平检测而得到反映, 甚至在血清饥饿状态下也存在这种现象. Erk1/2 及其下游转录因子 Elk-1 的激活时间在细胞受到 EGF 的刺激以后显著延长. 尽管存在 MAP 磷酸酶 MKP 的反馈调节, 表达 HCV 核心蛋白的细胞在受到 EGF 的刺激后这种激活仍然存在, 可能与 Raf-1 的持续激活有关. HCV 核心蛋白对于 MAPK 激酶链具有直接的激活作用, 这也是 HCV 核心蛋白对于细胞具有转化作用的机制之一. Ahn et al^[29]建立了四环素控制的表达全长(191 aa)或部分序列(160 aa)的 HepG2 细胞系. 发现 HCV 核心蛋白可以激活细胞外信号调节激酶(ERK)、c-jun N-末端激酶(JNK)、p38 丝裂原激活蛋白(MAP)激酶、诱导 MAP 激酶磷酸酶 MKP-1 的表达, 并促进细胞的增生. 同时伴有 c-jun 和 ATF-2 的激活, 但没有 Elk-1 和 c-fos 的激活. 另外, AP-1 的激活过程与 c-fos 的状态无关. 全长或截短型 HCV 核心蛋白具有相似的作用.

HCV 核心蛋白对于细胞凋亡具有促进和抑制的双向调节作用, 主要决定于诱导细胞的刺激因素和当时细胞所处的状态. Tsuei et al^[30]研究了 HCV 核心蛋白对于血清饥饿诱导的细胞凋亡的影响进行了研究. 稳定表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 细胞系对于血清饥饿诱导的细

胞凋亡具有一定的抑制作用. 但 p53、p21Waf1 和 Bax 在血清饥饿诱导后都有诱导性表达, 与 HCV 核心蛋白是否表达无关. 表明这种情况下的细胞凋亡是 p53 非依赖性的. 不表达 HCV 核心蛋白的细胞系, 细胞受到血清饥饿后诱导的细胞凋亡可由 p38/MAPK 的特异性抑制剂 SB203580 部分逆转, 但在表达 HCV 核心蛋白的细胞系中没有阻断作用. 血清饥饿激活的 p38 MAPK, 在表达 HCV 核心蛋白的细胞系中, 其磷酸化形式的蛋白水平有显著下降. 表明 HCV 核心蛋白对于血清饥饿诱导的细胞凋亡具有抑制作用, 而且这种抑制作用是 p38 MAPK 激活依赖性的.

MAPK 信号转导系统在细胞的增生、恶性转化和应激应答的调节中具有重要作用. HCV 核心蛋白具有潜在的致癌作用, 但机制目前还不十分清楚. MAPK 细胞外信号调节激酶(ERK)的激酶(MEK)-ERK 信号转导途径以及其下游的靶基因, 即血清应答元件(SRE), 在 BALB/3T3 表达 HCV 核心蛋白时被激活. 为了阐明 HCV 核心蛋白激活 MEK-ERK 途径的机制, Huang et al^[31]以 HCV 核心蛋白瞬时转染几种不同的细胞系, 并应用 Gal4-Elk1 萤火虫素酶报告基因表达载体、体外 MAPK 的 Western blot 杂交分析对其信号转导途径进行了研究. 发现存在有丝分裂原的刺激时, HCV 核心蛋白可增强 MEK 下游的 Elk1 的激活, 而对 ERK 活性及 Elk1 的磷酸化没有影响. 研究结果表明 HCV 核心蛋白可通过经典的磷酸化修饰链激活 Elk1. 说明 HCV 感染引起肝细胞发生恶性转化的可能的机制之一.

HCV 感染与 HCC 有关, 而 HCC 的发生与 MAPK/ERK 信号转导途径有关, 因此 Pileri et al^[32]研究了 HCV 核心蛋白对于 MAPK/ERK 级联反应的影响. HCV 核心蛋白可显著激活 MAPK/ERK 的级联反应, 包括 Elk1. HCV 核心蛋白单独情况下就可以激活 MAPK/ERK. 有趣的是, Elk-1 的活性在受到促癌因子 12-O-四萜酸佛波乙酯(12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate, TPA)的作用下进一步升高, 但表达 HCV 核心蛋白的 NIH 3T3 和 HepG2 细胞受到表皮生长因子(EGF)和肿瘤坏死因子 α (TGF α) 的刺激后, 没有进一步的升高. HCV 核心蛋白对 MAPK/ERK 的激活作用, 当受到 MEK1 特异性抑制剂 PD98059 时则被阻断. 这些研究结果表明, HCV 核心蛋白激活 ERK 是肝细胞有丝分裂原介导的信号非依赖性的, 但与 TPA 有协同作用. HCV 核心蛋白可能存在对 MEK1 的调节作用, 或者对更为上游的信号转导环节产生影响.

在针对病原体的早期免疫应答过程中有补体成分的参与, 补体成分在清除病原体感染宿主血清中的抗原中具有十分重要的作用. Rice et al^[33]研究表明 HCV 核心蛋白在 HCV 感染的初期首先表达, 并且在 HCV 感染宿主的血液循环中存在, 通过与补体受体的结合, 即 C1q 受体球状位点(gC1qR)的结合, 抑制 T 细胞的增生反应. 为了研究 HCV 核心蛋白与 C1qR 相互作用及其对 T 细胞增生的抑制作用及机制, 研究了 HCV 核心蛋白对于 T

细胞激活早期事件的影响. 发现HCV核心蛋白抑制ERK和丝裂原激活ERK激酶(MEK)蛋白的磷酸化. HCV核心蛋白对于ERK/MEK MAPK的干扰, 造成了白介素-2(IL-2)和白介素-2受体 α (IL-2R α)基因转录水平的下降, 最终造成IL-2的产生以及高亲和力IL-2R的表达水平的下降. 抗-gC1qR抗体可以逆转HCV核心蛋白对ERK/MEK磷酸化水平的影响, 说明HCV核心蛋白和gC1qR与ERK/MEK MAPK的激活有关. 表明HCV核心蛋白可通过补体依赖性的调节途径阻断T细胞激活的细胞内事件, 在HCV慢性感染的形成过程中发挥重要作用.

2.4 丙型肝炎病毒的NS3蛋白的反式调节 慢性丙型肝炎发病机制中氧化应激产生的活性氧(ROS)发挥一定的作用. 吞噬细胞及激活的巨噬细胞释放的ROS是主要氧化应激产物的来源. 但是HCV蛋白作用于单个核细胞后产生活性氧的情况目前还不十分清楚. Higginbottom et al^[34]对于HCV刺激的单个核细胞产生活性氧的情况进行了研究. 健康正常人的外周血单个核细胞(PBMC)受到HCV的核心蛋白、NS3、NS4、NS5蛋白刺激以后, 以化学发光技术对于产生的ROS进行了测定. 发现只有NS3蛋白可以触发PBMC产生ROS, 主要包括阴离子氧离子. PBMC受到NS3刺激以后, 出现快速而短暂的细胞内钙水平的升高. 应用不同的代谢抑制剂, 证实ROS的产生需要钙离子的流入, 以及酪氨酸激酶以及应激激活蛋白激酶p38的参与. 发现p47(PHOX)发生磷酸化和细胞内转位, 表明在这一过程中有NADPH氧化酶的参与. NS3对于佛波豆蔻酸乙酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导的氧化爆发(oxidative burst)具有抑制作用. 研究结果表明HCV NS3蛋白可激活NADPH氧化酶, 调节ROS的产生, 在HCV感染的发病机制中具有一定作用.

2.5 丙型肝炎病毒的NS5A蛋白的反式调节 Flint et al^[35]建立四环素应答元件严谨控制的HCV全长编码区表达型转染细胞系, 并研究了HCV蛋白对IFN α 介导的信号转导的影响. HCV蛋白的表达, 强烈抑制IFN α 介导的JAK-STAT系统的信号转导. 这种抑制作用与STAT酪氨酸磷酸化下游的信号转导途径有关, 而且对于JAK-STAT信号转导途径的抑制作用不仅限于IFN α , 而且可抑制白血病抑制因子(LIF)诱导STAT3的信号转导. 但对于TNF α 诱导的转录因子NF- κ B的激活没有影响. HCV干扰IFN α 介导的JAK-STAT信号转导, 与对IFN α 治疗的抗性作用无关, 而可能与HCV感染后免疫逃逸以及慢性感染的形成过程有关.

HCV亚基因组复制子(replicon)在肝细胞中的复制, 可刺激干扰素 β (IFN β)启动子, 并使人肝癌细胞系产生IFN β . 研究发现, HCV RNA的复制可激活NF- κ B和IFN调节因子(IRF-1)的激活和DNA结合功能. 在细胞核中, 激活形式的IRF-3也增多. 含有HCV复制子的肝癌细胞系, 由IFN β 激活的一系列的抗病毒作用基因的基础表达水平都显著提高. HCV RNA的复制, 可刺激细胞抗病毒机制, 并使细胞进入抗病毒状态. 稳定的HCV RNA

复制要面对一些抗病毒作用机制的应答, 提示HCV可能会编码一种或多种病毒蛋白, 克服细胞产生的这些抗病毒机制, 以形成慢性感染.

Flint et al^[36]应用HCV亚基因组复制子细胞模型, 研究了HCV-肝细胞之间相互作用的可能机制. 研究结果证实, HCV RNA亚基因组的复制可刺激双链RNA(dsRNA)的信号转导系统, 阻断IRF-1和PKR的信号转导, 与dsRNA结合以及抑制dsRNA对PKR的激活作用有关. NS5A蛋白单独情况下就足以阻断IRF-1的激活以及dsRNA依赖性IRF-1基因表达的诱导. PKR结合位点及其附近核苷酸序列的突变, 可以解除NS5A的上述抑制作用, 导致IRF-1表达水平升高, HCV RNA复制水平降低. 这些研究结果表明在dsRNA信号转导中具有重要作用的PKR, 以及病毒感染激活的IRF-1的功能异常, 是HCV NS5A阻断宿主抗病毒应答以及形成慢性感染的主要机制. HCV NS5A具有通过氧化应激机制诱导细胞质中转录因子NF- κ B和STAT-3的作用. NS5A可导致细胞内钙的异常. Ca²⁺所介导的信号触发线粒体活性氧成分的提高, 导致转录因子蛋白NF- κ B和STAT-3向细胞核内的转位. 研究表明NS5A可以持续激活STAT-3. 在抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)或Ca²⁺螯合剂(EGTA-AM, TMB-8)存在的条件下, NS5A诱导的NF- κ B和STAT-3的激活作用消失. HCV NS5A与对IFN α 的抗性有关, 其机制之一就是NS5A对于IFN α 诱导关键酶, 即双链RNA激活的蛋白激酶(PKR)的抑制作用, 但IFN α 敏感和抵抗的HCV NS5A在Hela细胞中对于ISGF-3的表达的影响没有显著的差别. NS5A蛋白缺失氨基末端110、222和334个氨基酸残基, 以及羧基末端缺失117、230氨基酸残基时, 对于IFN α 诱导ISGF-3的表达也没有显著的影响. HCV NS5A的表达也不影响IFN α 诱导的STAT-1酪氨酸磷酸化以及上调PKR及MHC-I抗原的表达. 但NS5A可以诱导人细胞中IL-8 mRNA和蛋白的表达, 这一效应与体外NS5A抑制IFN α 的抗病毒作用有关. NS5A可诱导IL-8启动子指导的报告基因的表达, 这种调节作用与IL-8启动子序列中133 bp的序列有关. 氨基末端缺失110、222个氨基酸残基的NS5A突变体, 具有比全长NS5A更强的诱导IL-8启动子活性作用, 因为这种突变形式的NS5A蛋白更能分布在细胞核中. IL-8启动子突变研究表明, NF- κ B和AP-1转录因子的结合是NS5A对其进行调节的必要环节. 因此, HCV NS5A蛋白对于趋化因子的调节, 也是影响细胞对于IFN α 敏感性的重要机制之一.

在HCV感染者外周血单个核细胞(PBMC)受到IFN α 的刺激以后, IRF-1 mRNA和IRF-1/IRF-2比率较正常人显著升高. Sendai病毒刺激以后, 正常人和HCV感染者外周血单个核细胞的IRF-1、IRF-2和IFN α mRNAs, 以及IFN α 蛋白表达水平也显著高于基础水平. 自然感染HCV诱导PBMC的IFN α 5表达水平升高. 这些细胞体外感染Sendai病毒可以提高正常人和HCV感染者的IFN α 8的表达水平. 病毒感染诱导的IFN α

表达具有型特异性, 认为 HCV 感染可以特异性地诱导 PBMC 中 IFN α 5 的表达^[37].

丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白对于 PKR 具有抑制作用. PKR 所介导的 IFN α 抗病毒作用部分地通过抑制 eIF2 α 的磷酸化, 进而抑制 mRNA 翻译而实现. Lahm et al^[38] 研究了 HCV NS5A 蛋白对 PKR 影响 mRNA 翻译过程的抑制作用. 痘苗病毒载体 VV E3L 表达的蛋白是 PKR 很强的一种抑制因子. 以 IFN α 预处理表达缺陷型基因的 VVDeltaE3L HeLa S3 细胞, PKR 和 eIF2 α 的磷酸化水平都显著升高. 当表达 NS5A 蛋白的 VVNS5A 细胞系受到 IFN α 刺激时, PKR 和 eIF2 α 的磷酸化水平出现瞬时下降. 表达 VVDeltaE3L 的细胞系受到 IFN α 的刺激以后, p38 MAPK 活性升高, 符合其位于 PKR 信号转导的下游的事实. 另外观察到这些细胞中 eIF4E 的磷酸化水平升高, 这是 p38 下游的信号转导环节. 在 VVNS5A 感染的细胞系中这些调节作用都有不同程度的下降. NS5A 还具有抑制表达 NS5A 蛋白受到 EGF 激活时的 p38-eIF4E 磷酸化的作用. NS5A 诱导的 eIF2 α 和 eIF4E 磷酸化可能在调节 mRNA 翻译过程中有矛盾. 事实上表达 VVNS5A 的细胞系受到 IFN α 的刺激以后, 只是部分短暂地回复 VVDeltaE3L 细胞与病毒的 mRNA 翻译过程. 综上所述, NS5A 作为一种 PKR 的抑制物, 在总体上具有维持 HCV 感染早期 mRNA 翻译水平的功能, 而感染晚期更使 HCV mRNA 适合帽状结构非依赖性的翻译过程.

在细胞内, HCV NS5A 蛋白可在细胞丝氨酸/苏氨酸激酶的催化作用下发生磷酸化. 为了确定 NS5A 蛋白在细胞内磷酸化的位点, Borowski et al^[39] 以同位素标记 HCV-H NS5A 的磷酸多肽, 进行纯化, 对于磷酸化氨基酸残基位点进行分析, 并通过 Edman 降解法证实. 发现 HCV-H NS5A 蛋白磷酸化的位点是 Ser(2 321). 这一磷酸化位点的确定, 得到了另外 2 种方法研究结果的证实. 如对于 Ser(2 321) 突变为 Ala, 磷酸化蛋白修饰立即消失, 对于合成多肽片段的磷酸化修饰研究结果进行分析, 证实 NS5A 蛋白的磷酸化修饰位点为 Ser(2 321). 对于 NS5A 的 Ser(2 321) 位点进行定点诱变, 表明 NS5A 蛋白的磷酸化修饰是 NS4A 和 PKR 结合非依赖性的. NS5A 蛋白富含脯氨酸的位点恰好位于 Ser(2 321) 的周围, 如 PLPPRS(2 321)PPVPPR, 表明细胞内脯氨酸特异性激酶是 HCV NS5A 磷酸化的激酶类型, 这与以前以蛋白激酶抑制剂研究的结果是一致的.

NS5A 蛋白分子结构中存在几个富含脯氨酸(proline-rich)的序列结构, 与 SH3 结合位点结构一致, 提示在信号转导的调节过程中具有十分重要的作用. NS5A 可以与 Grb2 接头蛋白(adaptor protein)结合. Kato et al^[40] 以抗-Grb2 抗体的免疫印迹分析结果表明, 从表达 HCV NS5A 蛋白的 HeLa S3 细胞来源的免疫复合物, 发现了 NS5A 与 Grb2 的结合. Grb2 蛋白 N-末端 SH3 结构域的突变显著影响与 NS5A 蛋白之间的结合, 但 C-末端的 SH3 位点的基因突变则影响不大. Grb2 分子中 2 个位点同时突变

则造成 Grb2 与 NS5A 蛋白之间的结合完全消失, 说明 Grb2 蛋白分子中的这 2 个 SH3 结构域在与 NS5A 蛋白的结合过程中具有协同作用. NS5A 的突变分析结果表明, 富含脯氨酸的 SH3 结合区在所有基因型的 HCV 病毒株都是保守的. NS5A 蛋白在细胞内的表达抑制 HeLa S3 细胞中 ERK1/2 的磷酸化. 稳定表达 NS5A 蛋白的 HeLa 细胞在受到 EGF 的刺激后 ERK1/2 不发生磷酸化. 在这些细胞受到 EGF 的刺激后发生 NS5A 与 Grb2 蛋白之间的结合. 因此, NS5A 可能是通过与选择性接头蛋白的结合, 干扰 Grb2 介导的信号转导.

3 肝细胞蛋白对于肝炎病毒基因表达的反式调节

3.1 肝细胞蛋白对于 HBV DNA 元件的调节作用 HBV DNA 中的 CP 指导两个相关的 RNA 分子的转录, 即前-C 和核心 RNA 的转录. 既往的研究表明, 慢性 HBV 感染者的 CP 经常发生 2 个核苷酸的突变, 从而造成核受体结合位点与转录因子(HNF-1)的结合能力下降, 造成转录水平的抑制. 这种基因突变同时也造成与 X 蛋白编码区的 2 个密码子的变化. Li et al^[41] 的研究结果表明, X 蛋白及其突变体在体内外可以与 HNF-1 结合. X 蛋白及其突变体都可以提高 HNF-1 的基因转录水平以及与 X 蛋白的结合能力. 这一结果首次发现了 X 蛋白能够促进转录因子蛋白的 DNA 结合活性. X 蛋白及其突变体在刺激 HNF-1 活性中的作用不同, 仅仅少量的 X 突变体蛋白就可以产生较大的反式激活作用, 显著提高 HNF-1 的 DNA 结合能力. X 蛋白与突变体蛋白之间的这种差别, 在 HBV 感染的致病机制中具有重要意义, 也说明了不同的 CP 结构具有不同的 HNF-1 的结合位点的原因.

干扰素刺激应答元件(ISRE)/干扰素调节元件(IRE)位于 HBV DNA 的 1 091-1 100 nt 之间, 恰好位于增强子 I(Enh I)/X 基因启动子区, 与 XP 活性调节密切相关, 增强子 I/X 基因启动子/ISRE/IRE 组成了一个功能性的调节集团, 与 IFN α 和 ISGF3 的特异性转录激活过程有关.

3.2 肝细胞蛋白对于丙型肝炎病毒基因元件的调节作用丙型肝炎病毒基因组结构的 5' -NTR 具有特殊的二级结构形式, 这是保证 HCV 进行正确翻译过程的重要的先决条件之一. HCV RNA 5' -NTR 的核苷酸长度为 341 nt. 研究表明, 几乎所有这些核苷酸都参与了内部核糖体进入位点(IRES)的形成. 其基本的二级结构包括四个茎-环(stem-loop)结构, 即第 I-IV 茎-环结构^[42]. 研究表明, 这四段不同的二级结构形式, 在 HCV RNA 翻译过程中都具有十分重要的作用^[43,44]. 每一个不同的茎-环结构通过与不同的翻译有关的蛋白质因子的结合, 对 HCV RNA 的翻译过程起重要的调节作用.

丙型肝炎病毒 RNA 5' -NTR 的翻译起始过程是一种由 IRES 介导的帽状结构形成非依赖性的过程. Worman et al^[45] 应用研究 RNA-蛋白结合的紫外交联技术, 证实多聚嘧啶核苷酸序列结合蛋白(PTB)能够至少与 5' -NTR 中的 3 段不同的结构区段进行结合, 在 HCV RNA 5' -NTR

的翻译过程中发挥重要的调节作用. 对于 PTB 蛋白结合的这三段 5' -NTR 的核苷酸序列进行分析, 证实都有高度保守的多聚嘧啶核苷酸序列. 应用 HCV RNA 5' -NTR 结构区的序列而设计的竞争性核苷酸序列进行的竞争性结合实验研究结果表明, 这种结合是蛋白质因子类型和核苷酸序列特异性的过程. 应用免疫沉淀技术证实, 从 HeLa 细胞中提取的 PTB 蛋白的同分异构体形式的这种蛋白, 能够与 HCV RNA 5' -NTR 结合. 以 PTB 的单克隆抗体事先将 HeLa 细胞中的 PTB 蛋白免疫清除的实验结果表明, PTB 蛋白与 HCV RNA 5' -NTR 的结合, 是 HCV RNA 翻译过程所必须的步骤. 另外还发现, 如果向免疫清除 HeLa 蛋白混合物中再补足 PTB 蛋白, 也不能有效地恢复由 HCV RNA 5' -NTR 介导的翻译过程, 说明除了 PTB 蛋白之外, HCV RNA 5' -NTR 介导的翻译过程, 还必须有另外的 PTB 蛋白质相关因子的参与. 也就是说, 在以 PTB 蛋白特异性单克隆抗体免疫清除 PTB 蛋白的同时, 可能也将另外的与 HCV RNA 翻译有关的 PTB 结合蛋白一起去除了. 因此, 单纯向这种蛋白复合物中添加 PTB 蛋白是远远不够的. 要完成 HCV RNA 的翻译过程, 必须有包括 PTB 蛋白等多种细胞蛋白质因子的参与.

Casbarra et al^[46]的研究表明, La 自身抗原(La autoantigen)也是一种 HCV RNA 5' -NTR 结合蛋白, 并对 HCV RNA 的翻译起始活动具有关键的调节作用. 同样也是应用紫外交联技术对于 HCV RNA 结合蛋白的种类进行了分析. 结果表明, La 自身抗原是 HCV RNA 5' -NTR 特异性结合的蛋白质分子. 进一步的研究表明, 几乎完整 HCV RNA 5' -NTR 的 341 个核苷酸组成的茎 - 环结构, 都是与 La 自身抗原进行结合所必须的, 而且这种 RNA - 蛋白之间的结合, 可以启动 HCV RNA 的翻译过程. 有趣的是, HCV RNA 结构中的翻译起始点(AUG)也是 5' -NTR 与 La 自身抗原结合的必备条件. 如果将完整 HCV RNA 5' -NTR 的核苷酸序列, 只是缺失掉 AUG 或替换成其他核苷酸, 则不具备与野生型 HCV RNA 5' -NTR 竞争性结合 La 自身抗原的能力. 说明 La 自身抗原与 HCV RNA 之间的结合过程, 不仅是茎 - 环二级结构完整性依赖性的, 同时也是翻译起始密码子依赖性的. 因此 La 自身抗原是调节 HCV RNA 翻译活动的重要的宿主细胞的蛋白质因子.

Fukuda et al^[47]对多聚胞嘧啶结合蛋白 1(PCBP-1)和 PCBP-2 等 HCV RNA 5' -NTR 特异性结合蛋白进行了研究. 首先以与谷胱甘肽 S- 转移酶(GST)融合蛋白的形式, 以大肠杆菌表达 PCBP-1 和 PCBP-2 重组蛋白, 并证实了与 HCV RNA 进行特异性结合的能力. 制备了 PCBP-2 的特异性抗血清, 同时证实了这种特异性抗血清能够与 HCV RNA 5' -NTR 和从 HeLa 细胞质提取的蛋白三者共同形成超级复合物. 对于这种结合的 HCV RNA 5' -NTR 的结构依赖性进行研究, 发现几乎所有的内部核糖体进入位点(IRES)的核苷酸序列, 都是与

PCBP-2 结合所必备的. 说明 HCV RNA 5' -NTR 与 PCBP-2 之间的结合, 是 IRES 序列依赖性的, 而且也是 IRES 结构完整性依赖性的. 根据 PCBP-2 在细胞内的分布特点, 认为 HCV RNA 5' -NTR 与 PCBP-2 之间的结合发生在 HCV 感染细胞的细胞质内.

丙型肝炎病毒这些结构比较简单的生物类型, 一般来讲, 都必须借助于感染的宿主细胞内的环境因素, 才能完成其生活周期. HCV RNA 5' -NTR 仅有 341 个核苷酸长度, 但是却指导长达 10 kb 的开放读码框架(ORF)的翻译过程, 因此, 除了其自身的基因组翻译成的蛋白质分子以外, 还必须借助于感染宿主细胞的一些蛋白质因子. 自然想到的是细胞中一些参与蛋白翻译过程的蛋白质因子. Tsuchihara et al^[48]研究了真核细胞翻译起始因子(eIF3)在 HCV RNA 翻译起始过程中的作用. 研究结果表明, eIF3 能够与 HCV 以及经典猪发热病毒(CSFV)RNA 中的 IRES 结合, 对这两种病毒的翻译起始具有重要的调节作用. 利用化学和酶学足迹法对于 eIF3' -IRES 复合物进行分析, 结果表明, eIF3 的结合可以保护 IRES 第 III 茎 - 环结构中的 IIIb 位点的茎部顶端单链核苷酸序列区. 应用 RNA 酶 ONE 和 V1 两种酶的足迹实验都得到了相同的研究结果. 以引物延伸实验也证实了茎 - 环结构 IIIb 或者其相邻的 IIIc 发夹状结构的完整性, 都是 eIF3 与 IRES 区结合所必备的条件. 以 ³²P- 标记的 HCV RNA 探针进行的紫外交联实验的研究结果表明, HCV RNA 的 5' -NTR 至少与 eIF3 蛋白复合体中的 4 种蛋白质成分(P170, P116, P66 和 P47)进行结合. 这一研究结果表明, 病毒的 IRES 蛋白翻译过程, 是要通过借助病毒感染细胞翻译起始蛋白质因子的作用才能实现的.

Reed et al^[49]以高度保守的 HCV RNA 5' -NTR 为探针, 应用凝胶电泳迁移率法, 对于 HCV RNA 5' -NTR 结合的蛋白质成分进行了研究, 以阐明 HCV 感染的靶细胞中的某些蛋白质成分对于 HCV 复制和表达过程的调节作用. 结果发现分子量为 87 kD 和 120 kD 的两种蛋白质分子能够与 HCV RNA 的 5' -NTR 区进行特异性结合. 对于 HCV RNA 5' -NTR 序列结构特点, 与细胞蛋白结合的序列结构依赖性进行研究, 发现 5' -NTR 的 131-253 nt 之间的核苷酸序列, 是这两种蛋白结合的关键序列结构. 如果将 5' -NTR 中的第 III 段茎 - 环结构中的多聚嘧啶区的核苷酸序列 191-UCCUUUCUU-199, 换成 191-UCCUUUggU-199 时, 这种 RNA - 蛋白复合物则不再形成. 因此, 87 kD 和 120 kD 这两种细胞蛋白是 5' -NTR 第 III 茎 - 环结构结合特异性的蛋白质分子, 但多聚嘧啶核苷酸区发生基因突变时, 仅仅造成 87 kD 蛋白与 5' -NTR 结合能力的丧失, 而对于 120 kD 蛋白与 5' -NTR 的结合没有显著的影响. 作者根据这些研究结果, 提出 87 kD 蛋白与 HCV RNA 的复制过程有关, 而 120 kD 的蛋白质则与 HCV RNA 5' -NTR 的翻译过程有关.

4 肝炎病毒反式调节机制研究的意义

4.1 促进对肝炎病毒分子生物学的研究 肝炎病毒在肝细胞中的复制和表达存在十分复杂的机制, 虽然肝炎病毒, 特别是乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒主要是感染肝细胞, 但是对其他细胞类型也具有一定的感染能力. 决定HBV、HCV嗜肝细胞特性的分子生物机制, 主要还是肝细胞中存在特殊的大分子环境, 适合肝炎病毒完成其复制和表达的生活周期, 这种大分子条件是肝细胞中所存在的蛋白质成分, 这些蛋白质成分与肝炎病毒基因组DNA/RNA的结合以及反式调节, 决定了肝炎病毒相对嗜肝细胞的特点. 因此, 关于肝炎病毒反式调节机制的研究, 从理论上可以加深对于肝炎病毒的分子生物学调控机制的深入了解, 为探索抗肝炎病毒的新技术、新疗法奠定坚实的理论基础^[50,51].

4.2 促进新型治疗技术和方法发展 肝炎病毒存在复杂的反式调节机制, 这一特点也是设计新型治疗技术和方法的重要理论根据. 例如显负性突变体(dominant negative mutant)的设计与抗乙型肝炎病毒复制的研究, 利用反式调节机制提高基因治疗中目的基因的表达水平, 或者作为基因治疗的目的基因何时表达的开关, 都有重要的意义.

显负性突变体的构建, 在抗病毒基因治疗新兴技术的设计中具有重要地位. 乙型肝炎病毒的核心蛋白等其他类型的病毒蛋白在HBV的复制和表达过程具有十分重要的促进和调节作用. 如果构建核心蛋白的突变体, 作为基因治疗的目的基因进行表达, 这种显负性突变体的表达, 可以竞争地结合野生型核心蛋白的结合靶位, 但是却缺乏野生型核心蛋白的反式调节作用. 从一定程度上形成了竞争性结合抑制, 对于乙型肝炎病毒的复制和表达进行有效抑制, 实现抗病毒的基因治疗^[52,53].

利用反式调节机制提高目的基因表达水平和作为基因治疗时目的基因表达的开关, 不仅仅限于肝炎病毒的新型治疗技术的设计, 在人免疫缺陷病毒(HIV)的新型治疗技术和方法的设计中得到更为广泛的应用. 已知HIV的长末端重复序列中存在HIV基因编码的反式激活蛋白Tat的应答元件, 在HIV的复制和表达的调节中具有重要作用. 因此, 将干扰素 α 的编码基因构建到LTR启动子序列的下游, 构建基因治疗的表达载体, 如果没有反式激活剂Tat蛋白的存在时, 目的基因的表达水平只是处于很低的水平, 但是当环境中因为出现HIV的感染而表达反式激活剂Tat蛋白时, 受到反式激活以后, 基因治疗的靶基因, 即干扰素的表达水平显著升高, 与基础表达水平相比较可以提高200倍. 这种反式激活作用机制至少具有两方面的意义, 一是可以满足基因治疗过程中目的基因表达水平普遍偏低的情况, 另外, 这种反式调节机制, 更加适合基因治疗目的基因表达水平调节的目的, 即没有HIV感染时, 基因治疗的目的基因表达水平可以只是很低的基础水平的表达, 不至于基因治疗目的基因持续高水平的表达导致机体功能的紊乱, 但是一旦有感染存在时, 就立即启动目的基因的

表达, 进行抗HIV的基因治疗. 随着基因治疗的效果的显现, 病毒复制表达水平又进一步降低, 环境中的反式激活病毒蛋白水平下降, LTR中的启动子活性又开始逐渐下降, 目的基因水平的表达也随之进一步下降, 恢复到对机体影响较小的基础表达水平, 以减少基因治疗目的基因高水平持续表达所带来的可能的毒副作用. 因此, 可以实现抗病毒基因治疗过程中目的基因表达水平的实时调控. 这一点是其他的基因治疗技术和方案所不能比拟的. 因此, 病毒基因表达的反式调节机制在新型抗病毒基因治疗技术的设计中也有重要的应用前景.

Basu et al^[54]在研究脊髓灰质炎病毒(PV)IRES介导的PV病毒基因组翻译过程调节的过程中, 发现一小段来源于酵母细胞的RNA片段(60 nt), 对于PV的IRES介导的翻译功能具有显著的抑制作用. 这一小段RNA片段即称为抑制性RNA(IRNA)片段. 联想到HCV RNA的翻译过程也是由IRES结构介导的, 因而推测这种IRNA片段可能对HCV的翻译功能也有抑制作用. Heim et al^[55]构建了HCV IRES介导的报道基因表达载体和IRNA的表达载体, 共同转染肝癌细胞系Huh7时, 发现IRNA的表达, 对于HCV RNA IRES介导的翻译活性具有明显的抑制作用. 持续IRNA表达对于Huh7细胞系的生长特点没有显著的影响. 同时注意到, IRNA的表达只是抑制由IRES介导的帽状结构形成非依赖性的翻译过程, 而对于宿主细胞的帽状结构形成依赖性翻译机制没有显著的影响^[56,57]. 当以HCV IRES与PV的其他部分重组构建嵌合病毒时, IRNA也能显著抑制这种嵌合病毒的复制和表达. 研究表明, IRNA对于HCV RNA 5' -NTR 翻译机制的干扰和抑制作用, 主要是通过对La自身抗原与HCV RNA 5' -NTR结合过程的抑制作用而实现的. 因此, 对HCV RNA 5' -NTR结构及其结合蛋白的研究将为抗HCV新型治疗方法的设计奠定坚实的基础.

5 参考文献

- 1 成军,张玲霞. 抗HCV的基因治疗方案—根据HCV与肝细胞相互作用的分子生物学机制设计. 国外医学流行病学传染病学分册 1999;26:59-61
- 2 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
- 3 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 4 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS4A的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:14-17
- 5 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒3' -非翻译区RNA结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:17-21
- 6 成军,张玲霞. 丙型肝炎病毒基因的干扰素敏感决定区. 国外医学流·行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 7 刘妍,成军,董菁,李克,夏小兵,王刚,杨继珍,王琳. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 8 Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002;76:2721-2729
- 9 董菁,成军,王勤环,王刚,施双双,刘妍,夏小兵,斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜蛋白基因的克隆化与序列分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 10 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

- 11 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能. 中华肝病杂志 2002;10:354-357
- 12 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
- 13 Ogden SK, Lee KC, Barton MC. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem* 2000;275:27806-27814
- 14 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
- 15 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
- 16 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 17 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
- 18 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 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:303-307
- 19 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
- 20 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
- 21 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 22 Madden CR, Slagle BL. Stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein. *Dis Markers* 2001;17:153-157
- 23 Shamay M, Barak O, Doitsh G, Ben-Dor I, Shaul Y. Hepatitis B virus pX interacts with HBXAP, a PHD finger protein to coactivate transcription. *J Biol Chem* 2002;277:9982-9988
- 24 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
- 25 成军. 慢性丙型肝炎病毒肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 26 Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- 27 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
- 28 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
- 29 Ahn JY, Chung EY, Kwun HJ, Jang KL. Transcriptional repression of p21(waf1) promoter by hepatitis B virus X protein via a p53-independent pathway. *Gene* 2001;275:163-168
- 30 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
- 31 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
- 32 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941
- 33 Rice CM. Is CD81 the key to hepatitis C virus entry? *Hepatology* 1999;29:990-992
- 34 Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 2000;74:3642-3649
- 35 Flint M, Dubuisson J, Maidens C, Harrop R, Guile GR, Borrow P, McKeating JA. Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 2000;74:702-709
- 36 Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999;73:6235-6244
- 37 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,李莉. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 38 Lahm A, Yagnik A, Tramontano A, Koch U. Hepatitis C virus proteins as targets for drug development: the role of bioinformatics and modelling. *Curr Drug Targets* 2002;3:281-296
- 39 Borowski P, Heiland M, Feucht H, Laufs R. Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidences for action on the level of substrate and enzyme. *Arch Virol* 1999;144:687-701
- 40 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
- 41 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
- 42 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
- 43 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
- 44 Alcantara FF, Tang H, McLachlan A. Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer 1 region of the hepatitis B virus genome. *Nucleic Acids Res* 2002;30:2068-2075
- 45 Worman HJ, Lin F. Molecular biology of liver disorders: the hepatitis C virus and molecular targets for drug development. *World J Gastroenterol* 2000;6:465-469
- 46 Casbarra A, Piazz FD, Ingallinella P, Orru S, Pucci P, Pessi A, Bianchi E. The effect of prime-site occupancy on the hepatitis C virus NS3 protease structure. *Protein Sci* 2002;11:2102-2112
- 47 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
- 48 Tsuchihara K, Hijikata M, Fukuda K, Kuroki T, Yamamoto N, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology* 1999;258:100-106
- 49 Reed KE, Rice CM. Identification of the major phosphorylation site of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321. *J Biol Chem* 1999;274:28011-28018
- 50 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
- 51 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
- 52 成军,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58
- 53 董菁,施双双,皇甫竟坤,成军,王勤环,李莉,斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因接种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 54 Basu A, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein modulates the interferon-induced transacting factors of Jak/Stat signaling pathway but does not affect the activation of downstream IRF-1 or 561 gene. *Virology* 2001;288:379-390
- 55 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
- 56 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
- 57 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

老年消化系疾病的中西医结合治疗

张万岱

张万岱,中国人民解放军第一军医大学南方医院 广东省广州市 510515
项目负责人:张万岱,510515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方医院. zwd999@263.net
电话:020-61641547 传真:020-87280770
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-12-18

张万岱. 老年消化系疾病的中西医结合治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(7): 897-899

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/897.asp>

1 老年期消化系疾病的特点

消化系疾病为老年人常见病之一, 约占所有老年病的18%, 1989年一组国内资料报道, 在住院的消化系疾病患者, 中老年人占9.6%, 以消化性溃疡、急性胃肠炎、肝硬化、慢性胆囊炎、胆石症、上消化道出血及肿瘤等最常见. 上消化道出血、恶性肿瘤、肝硬化及急性胰腺炎等又为老年人死亡的主要原因. 老年人消化系疾病发病隐袭, 病情较复杂, 并发症亦多, 因而死亡率高. 由于衰老、消化系解剖及生理功能的改变, 老年人常有不同程度的消化、吸收、代谢及排泄功能障碍, 加之老年人特有的精神、心理变化, 消化系疾病的表现多不典型. 另外, 老年人对一些特殊检查的耐受性下降, 使之不能满意进行, 往往导致疾病诊断与治疗的延误. 所以了解与掌握老年消化系疾病的一些特点, 对临床医务工作者至关重要.

1.1 多病性 患消化疾病的老人常同时有其他疾病存在, 如高血压、动脉粥样硬化、慢性支气管炎、肺气肿, 或兼有肾功能损害, 这从临床上可以发现, 从尸检中则更加常见. 北京报告, 64例80岁以上患者尸检的结果, 竟无1例为单一脏器病变, 虽然大部分脏器病变并不致命, 但当某一脏器功能减退时, 其他脏器的病变必然影响全身抵抗力, 给治疗带来一定困难, 在防治老年人疾病时应予注意. 由于同一人患有多种疾病, 在症状和体征方面相互影响, 必然使临床表现变得更为复杂和不典型.

1.2 不典型性 老年人的多病性是临床表现不典型的原因之一. 同样的症状在不同年龄的诊断可以不同, 例如烧心上腹痛, 在青年人以溃疡病可能性大, 而老年人则以真菌性食管炎为多见; 同样的疾病在不同的年龄组中可以表现不同, 例如口炎性腹泻, 在青年人患此病时表现为恶臭性腹泻, 而老年人表现为骨质疏松, 股骨颈骨折. 老年人敏感性降低, 自觉症状轻微. 老年人体温调节能力低, 发热不如年轻人明显, 甚至在严重感染时也是如此; 对冷的反应也差, 容易发生低温状态而不自觉. 老年人对疼痛的反应较差, 有剧烈疼痛的疾病, 如肠

穿孔、腹膜炎等可能仅有轻微不适或全无主诉. 急性阑尾炎或胆石症发作时亦可症状不多, 但可引起穿孔, 老年人消化性溃疡特点是溃疡大, 可以突然发生上消化道出血.

1.3 发病快、病程短、容易发生全身衰竭 老年人脏器储备功能低下, 尤其是高龄老人, 活动能力减退, 长期卧床, 食欲逐渐减退, 饮水量也减少, 其血钾、血钠均较青年人低, 而尿素氮却较高, 免疫力下降, 内环境的稳定性已有改变, 一旦受到应激因素, 如消化道出血或急性胆道感染, 病情可迅速恶化, 原来处于勉强平衡状态的某些脏器功能, 容易在发病后短期内迅速衰竭, 治疗极为困难, 预后恶劣. 据统计, 40.6%的80岁以上的患者在住院1 wk内死亡, 5%甚至来不及住院而死在家中.

1.4 易有意识障碍 高龄患者不论患何种疾病, 都容易发生意识障碍, 如老年人脑血管硬化、血压改变、感染、毒血症和电解质紊乱等均是重要因素. 据报道, 70岁以上老年人17%可出现体位性低血压, 其收缩压可达8 kPa(60 mmHg). 意识障碍的出现给诊断和治疗带来很多困难. 在分析老年人意识障碍时, 必须排除医源性因素, 如服用安定药、抗抑郁药等的作用.

1.5 容易引起水、电解质紊乱 老年人脏器呈萎缩状态, 由于口渴中枢敏感性降低, 因此饮水量不多, 轻微的原因即可引起水和电解质失调. 老年人脱水可有缺水性脱水与低钠性脱水, 缺水性脱水时血压尚可维持. 周围循环衰竭症状少见, 但由于细胞内水分丢失可引起脑细胞失水, 容易发生中枢神经功能障碍, 由于老年人口渴感觉不灵敏, 在照顾时更应注意舌的干燥与否、皮肤弹性, 以及有无少尿或体重减轻. 老年人患肿瘤、中枢神经疾患或肺疾病时, 可有抗利尿激素分泌异常引起的慢性缺钠性脱水. 老年人肾处理钾的能力减低, 如有腹泻或呕吐, 容易产生低血钾, 如因便秘而使用泻药或用利尿剂, 必需小心防止失钾, 而肾功能减退伴有感染时, 又容易发生高血钾. 肾功能减退比较隐匿, 不作化验很难发现, 对老年人肾功能变化应予格外警惕.

1.6 容易发生后遗症和并发症 老年人患病后容易产生后遗症和并发症. 由于长期卧床, 可以引起坠积性肺炎、便秘, 也可引起肌肉萎缩和体位性低血压, 也可以引起肢体挛缩、骨质疏松、褥疮、静脉血栓形成和肺栓塞等, 对此均应作出早期预防措施, 例如勤翻身, 清洁皮肤, 腹肌及肢体肌肉的按摩等. 近年来已注意到

老年人容易发生播散性血管内凝血, 并发症常是引起老年人死亡的重要原因, 例如严重的电解质紊乱是老年急性腹泻患者的常见并发症, 死亡率很高。

1.7 对治疗的反应不同 同样的一种药物治疗, 在青-老年之间的反应不同, 老年人的耐受性低, 容易出现副反应, 并且个体之间的差异也较大。

2 老年期消化系疾病的治疗

老年期消化系疾病的发病率常高于一般人群, 约有20%老年患者死于消化系严重病变, 而恶性肿瘤的发病率尤高。老年人胃肠病的表现、诊治和预后与年轻人有明显区别而处理各异。因此, 对老年期消化系病的诊断处理就显得更为重要。

2.1 消化性溃疡 老年消化性溃疡以胃溃疡多见, 多发生在胃角至贲门区, 且有随年龄增大而上移的特点。在内镜下常显示巨大溃疡而被疑为恶变, 但相当比例的溃疡经内科治疗可愈合。临床症状不典型, 有节律性上腹痛者仅在30%, 常表现消瘦、纳差、呕吐、贫血等而易被误诊为胃癌。病程长, 约有83.5%的患者在60岁前已患本病, 并有反复发作史。常伴发多种疾病, 合并症多且严重。

治疗上以黏膜保护剂(铋剂、麦滋林、硫糖铝、喜克溃、施维舒、欣络维等)为主, 以抑酸剂(质子泵抑制剂、 H_2 受体阻断剂等)为辅, 兼以调整神经胃肠功能对症治疗。中医辨证分型治疗: 脾胃虚寒型以黄芪建中汤加减, 肝胃不和型以柴胡疏肝汤加减, 胃阴不足型以一贯煎加减, 寒热夹杂型以甘草泻心汤加减治疗之。若合并幽门螺杆菌(Hp)感染, 则应以铋剂或抑酸剂加二种抗生素(如羟氨苄青霉素、甲硝唑、替硝唑、呋喃唑酮、四环素、克拉霉素等任选两种)形成三联疗法以根除之。也可采用固定方中成药治疗, 我们研制的胃必宁片, 服用4 wk总有效率达97%, 溃疡愈合率达80%, 5 a疗效巩固率达67%, 此外如胃乃安、胃热清等均可酌情应用。

2.2 慢性胃炎 老年慢性胃炎可有浅表性胃炎和/或萎缩性胃炎, 尤以后者较年轻人多见, 可合并幽门螺杆菌(Hp)感染或肠化和不典型增生等癌前病变。临床上以功能性消化不良症状(上腹痛、早饱、腹胀、嗝气、恶心等)为多见。确诊以胃镜及活检病理所见为依据。同时也有表现不典型, 病程长, 合并症多, 难治愈等特点。

治疗上同样以黏膜保护剂为主, 以功能调节剂(如促动力剂)为辅, 根据不同情况分别应用抑酸剂或酶类补充剂或抗Hp剂。中医辨证分型治疗, 张子理对68例合并不典型增生或肠化的萎缩性胃炎进行分型治疗, 用黄芪建中汤治疗脾胃虚寒, 用四逆散治疗肝胃不和, 用香橼积术汤治疗脾虚气郁, 总有效率达94.12%, 不典型增生逆转率58.14%, 肠化逆转率64%。固定方中成药治疗, 我们研制三九胃泰对各类慢性胃炎总有效率94.6%, 萎缩性病变更逆转率52%, 糜烂性病变更逆

转率89.89%, 此外, 如摩络丹、消胀冲剂, 舒肝健胃冲剂, 胃细胞逆转丸等均可酌情采用。朱庄庄 et al 自拟清热祛瘀方(蒲公英、神曲、太子参、山药、赤芍、丹参、郁金、木香、黄连)加减及中小量雷尼替丁(150 mg/d)治疗老年糜烂性胃炎30例, 总有效率96.7%优于对照组(单用雷尼替丁150 mg 2次/d)之81.8%($P < 0.01$), 刘运林采用补阳还五汤(生黄芪、赤芍、当归、地龙、川芎、桃仁、红花)加减及阿莫西林(1 g, 2次/d)治疗老年幽门螺杆菌相关性胃炎, 结果Hp根除率及治愈率75.76%明显优于对照组(阿莫西林1 g 2次/d)之45.5% ($P < 0.05$)。

2.3 胃癌 老年人胃癌发生率高, 但脏器转移反而有减少的倾向, 约1/3患者可向肝、胰腺转移。老年胃癌病灶多位于下半胃, 为 < 2 cm之隆起型早期胃癌, 多为分化型, 除溃疡恶变外, 溃疡型较少见。症状不典型, 约1/2患者有胃肠道症状, 但很少出现上腹痛、烧心、嗝气等, 部分患者无症状或表现为非胃肠道症状如心悸、气短、贫血或浮肿等。若胃肠道症状经正规治疗不缓解或出现黑便、贫血及消瘦等应尽快行胃镜检查。胃镜和活检病理检查是确诊早期胃癌唯一可靠方法。

治疗上, 一旦确诊应争取尽早行根治手术, 效果常比年轻人好。有研究报道老年胃癌进展较年轻人慢。但如有严重合并症, 不宜行手术。一般老年胃癌预后较年轻人佳, 术后或不能手术者常用以5FU为主的化学治疗。中医辨证分型治疗, 肝胃不和型多见于早中期胃癌及术后患者, 常以柴胡舒肝散加减; 脾胃虚寒型多见于中晚期胃癌, 常以理中汤合平胃散加减; 病毒内阻型多见于进展期胃癌, 常以膈下逐瘀汤合失笑散加减; 胃热伤阴型多见于中期胃癌及合并放疗反应的患者, 常以麦门冬汤合玉女煎加减; 痰浊中阻型多为中晚期胃癌合并贲门或幽门梗阻者, 常以二陈汤合海藻玉壶汤加减; 气血双亏型多见于晚期胃癌, 常以十全大补汤加减治疗。抗癌中成药有复方天仙胶囊、平消胶囊、参莲胶囊、冬凌草片、肿节风片、华蟾素、羟基喜树碱等。

2.4 慢性肝炎 老年患者由于输血及应用血液制品机会增多而易患乙型病毒性肝炎和丙型病毒性肝炎, 由于存在多种疾患, 用药多致肝损害机会多, 易患药物性肝炎。随年龄增长而趋向慢性过程者居多。表现常不典型, 有些症状轻微而被忽视, 有些症状严重, 乏力和恶心常见, 黄疸较深, 消退缓慢, 淤胆型者常见。诊断方面应重视病史、临床特点、肝功能、病原学检查及肝穿刺活检病理检查而确诊。老年性肝炎易发展为暴发性肝炎和重症肝炎, 常有肝炎并发症及其他多种合并症而预后不佳死亡率较青壮年者为高。

治疗上应争取综合治疗, 包括适当休息、合理饮食、心理治疗及药物治疗。后者应包括护肝、降酶、退黄、缓解炎症, 调节免疫, 抗病毒药物及基因导入治疗等; 中药在防止肝纤维化、改善肝功能方面疗效显

著. 中医辨证论治, 湿热证多见于肝炎初期、急性期, 也见于中重度慢性肝炎和重症肝炎, 常以龙胆泻肝汤加减; 疫毒证多见于肝炎急性活动期及重症肝炎, 常以清瘟败毒饮或黄连解毒汤加减; 气滞证多见于肝炎慢性期、恢复期或慢性黄胆型肝炎, 常以柴胡舒肝散合平胃散加减; 阴虚证多见于肝炎慢性期、可见于慢性肝炎各期、瘀胆型肝炎, 常以一贯煎合六味地黄丸加减; 血瘀证多见于肝炎慢性期、可见于慢性肝炎各期、瘀胆型肝炎, 常以血府逐瘀汤加减; 阳虚证多见于肝炎慢性期、肝肾功能衰竭, 常以暖肝煎加减治疗之.

2.5 肝硬化 近年来本病老年人发病率有增高趋势, 其病因在国内主要继发于肝炎病毒感染, 长期瘀胆和循环障碍等. 老年肝硬化肝脏多不萎缩, 呈小结节颗粒状, 假小叶常不规整, 纤维增生减少, 结节再生力弱, 较少有腹水、门脉高压和肝功能衰竭, 故临床表现多不典型, 起病隐匿, 病程长, 症状轻或无, 有的体检才发现肝脾肿大, 甚至死亡后尸检时才发现肝硬化.

治疗上, 一旦出现门脉高压表现时, 耐受出血和耐受手术能力差, 门腔静脉分流术容易诱发肝性脑病, 但可以耐受内镜诊治, 食管下端静脉曲张局部注射硬化剂或结扎术均可取得较好效果. 老年人肝肾功能减低, 药物治疗应格外注意, 强调个体化用药, 密切观察毒副反应. 中医辨证分型治疗, 在肝硬化代偿期, 可概括为积聚型, 其中肝硬化早期多表现为肝郁脾虚, 以柴胡疏肝散合四君子汤加减; 中期多为气滞血瘀, 以化瘀汤加减. 在肝硬化失代偿期可概括为鼓胀型, 其中水湿内阻相当于腹水轻症, 以胃苓汤加减; 瘀血阻络相当于明显门脉高压者, 以膈下逐瘀汤加减; 肝肾阴虚相当于反复出血、神昏、潮热起伏者, 以一贯煎加减; 脾肾阳虚相当于肝硬化晚期, 附子理中汤合五苓散加减治疗之.

2.6 胆石症和胆道感染 老年人胆石症的发生率随增龄而升高, 70岁以上老人胆石形成率可达21-50%, 总胆管结石发病率比青年人高2倍. 老年患者症状不典型, 甚至无症状, 出现症状常很突然, 病情变化亦快. 老年人胆石症并发急性梗阻性化脓性胆管炎及休克者占56%, 约有1/3死亡. 患者疼痛和体温升高与病变严重程度常不相符, 易发生胆囊坏疽、积脓和穿孔. 胆道内瘘、胆石性肠麻痹和肝脓肿等并发症发生率较高. 因此, 时常延误诊断并急需紧急手术而增加了死亡率. 老年患者常存在多种疾病, 使各器官代偿功能减退, 特别是冠心病、糖尿病等增加了手术的难度, 同

时易致感染扩散或某些厌氧菌感染, 有发展成多器官功能衰竭之可能. 急性胆囊炎缓解后有的可遗留为慢性胆道感染, 表现更不典型, 仅有右上腹隐痛、B超声可示相应征象(如胆囊或胆管壁毛糙、增厚、结石影等)而诊断.

治疗上应用内镜下乳头肌切开取石及腹腔镜下胆囊切除使老年患者争取了更多的手术机会. 慢性胆道感染则给消炎、解痉、利胆治疗. 中医辨证治疗, 肝胆气滞证, 以大柴胡汤或柴胡疏肝散加减; 肝胆湿热证以茵陈蒿汤或龙胆泻肝汤加减; 肝胆脓毒证以清营汤合茵陈蒿汤加减; 气滞血瘀证以膈下逐瘀汤加减; 肝阴不足证以一贯煎加减治疗之.

2.7 胃肠道出血

2.7.1 上胃肠道出血 常见原因为消化性溃疡, 约占老年上胃肠道出血的半数. 其余30-40%出血是由于急性胃黏膜病变、糜烂性食管炎、食管胃底静脉曲张破裂和贲门撕裂症. 最后3-4%为食管裂孔疝和胃癌等. 更少见的原因有吻合口溃疡、卓-艾氏综合征、胃息肉和食管癌. 老年人常有多病基础, 一旦遇有某些应激、酗酒或药物刺激等易招致上胃肠道出血, 甚至有重要脏器功能衰竭, 常无先兆而突然发生, 有的无呕血和黑便, 而以失血性休克为主症而求诊.

治疗上对老年人上胃肠道出血除常规方法外, 应注意某些特点. 老年人脏器多有功能减低, 故应防治并发症如电解质紊乱、心肺功能不全、肾功衰竭和感染等. 还应注意多病共存和用药上的特殊性, 如应用垂体后叶素可诱发心绞痛、房颤等; 疑有恶性病变或内科治疗无效者应及早手术治疗. 中医辨证分型治疗, 胃中积热型, 以大黄、黄连泻心汤加减; 肝火犯胃型, 以丹栀逍遥散加减; 脾虚不摄型, 以补中益气汤合归脾汤加减; 气衰血脱型以参附汤加减治疗之.

2.7.2 下胃肠道出血 常见于肠憩室病和结肠癌, 也见于结肠血管扩张和动脉发育异常, 其他原因尚有肠息肉, 缺血性结肠炎, 肠道炎症和痔出血. 肛门指诊、结肠镜检查、血管造影等为主要诊断手段.

治疗上除一般止血、输血治疗外, 应针对病因进一步采取措施. 对于老年人出血常需内外科医师密切协作, 权衡利弊选择治疗方法. 如有报道憩室病的5-10%需手术治疗, 但其死亡率可达30%左右; 结肠血管病变反复出血, 内科治疗无法控制时应行左半结肠或右半结肠切除术. 中医辨证分型治疗, 肠道湿热型以地榆散加减; 气虚不摄型以归脾汤加减; 脾胃虚寒型以黄土汤加减治疗之.

经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤

凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强

凌昌全, 李琦, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院中医科 上海市 200433
刘晓华, 陈庆华, 上海医药工业研究院 上海市 200437
凌昌全, 男, 1957-07-12 生, 安徽安庆市人, 汉族. 1992 年上海中医药大学博士研究生毕业, 教授, 博士生导师. 主要从事中西医结合防治肝癌的研究. 军队九五重点课题, No.98JD3269
上海市卫生局百人计划, No.97BR044
项目负责人: 凌昌全, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院中医科. zyk@hotmail.com
电话: 021-25070606 传真: 021-65562275
收稿日期: 2002-05-07 接受日期: 2002-06-26

Infusion of Melittin-poly lactic-co-glycolic acid microspheres via hepatic artery for hepatocarcinoma in rats

Chang-Quan Ling, Qi Li, Xiao-Hua Liu, Qing-Hua Chen, Yong-Hai Peng, Ruo-Yin Luo, Xue-Qiang Huang

Chang-Quan Ling, Qi Li, Yong-Hai Peng, Ruo-Yin Luo, Xue-Qiang Huang, Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital Affiliated Second Military Medical University, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China

Xiao-Hua Liu, Qing-Hua Chen, Shanghai Institute of pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China

Supported by the 95 Important Scientific Research of PLA, No. 98JD3269. and Shanghai Scientific Development Foundation, No. 98XD14020

Correspondence to: Dr. Chang-Quan Ling, Chang-Quan Ling, Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital Affiliated Second Military Medical University, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China. zyk@hotmail.com

Received: 2002-05-07 Accepted: 2002-06-26

Abstract

AIM: To observe the therapeutic effects of poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) microspheres containing Melittin (M-MS) infused via artery on hepatocarcinoma in rats.

METHODS: M-MS was prepared with biodegradable poly lactic-co-glycolic acid by multiple emulsions in liquid evaporation process. Rats bearing transplanted hepatoma were established and were randomly divided into control group, melittin group, blank microsphere (B-MS) and M-MS group with 16 rats in each group, in each respective group, normal saline (NS, 1.5 mL/kg), melittin (0.35 mg/kg), blank microspheres (10 mg/kg), and M-MS (10 mg/kg) were infused via gastro duodenal artery into hepatic artery. The tumor growth, severity of necrosis and survival of rats were documented.

RESULTS: Compared with control group, the tumor growth in melittin and B-MS groups were significantly inhibited (12.4 ± 7.1 , 10.1 ± 8.2 vs 28.3 ± 13.6 , $P < 0.01$) and the tumor necrosis degree were dominantly in low- and moderate-grade, but the survival were not prolonged obviously (15.8 ± 2.0 d, 16.5 ± 3.0 d vs 13.7 ± 2.2 , $P > 0.05$). Meanwhile, the tumor

growth in M-MS group (1.1 ± 1.1) was much slower than that of other 3 groups and tumor necrosis degree were mainly in severe and the survival (31.0 ± 3.9 d) of rats was also significantly prolonged ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The anti-tumor effect of M-MS administered via hepatic artery is much higher than that of melittin and B-MS.

Ling CQ, Li Q, Liu XH, Chen QH, Peng YH, Luo RY, Huang XQ. Infusion of Melittin-poly lactic-co-glycolic acid microspheres via hepatic artery for hepatocarcinoma in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):900-903

摘要

目的: 观察蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球(M-MS)经动脉给药对大鼠肝肿瘤的疗效。

方法: 采用改良的复乳-液中蒸发法制备蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球, 建立大鼠移植性肝癌模型并随机分为对照组, 蜂毒素组, 空白微球组和蜂毒素微球组, 每组 16 只. 分别经肝动脉注入生理盐水(NS, 1.5 mL/kg)、蜂毒素(Melittin, 0.35 mg/kg)、空白聚乳酸/羟乙酸微球(B-MS, 10 mg/kg)和蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球(M-MS, 10 mg/kg). 比较治疗后各组大鼠的肿瘤生长情况、肿瘤坏死程度和生存时间。

结果: 治疗后, 与对照组比较, 蜂毒素组和空白微球组肿瘤生长率均显著降低(12.4 ± 7.1 , 10.1 ± 8.2 vs 28.3 ± 13.6 , $P < 0.01$), 肿瘤坏死程度以轻中度为主, 但两组动物生存时间均未能明显延长(15.8 ± 2.0 d, 16.5 ± 3.0 d vs 13.7 ± 2.2 d, $P > 0.05$). M-MS 组肿瘤生长率(1.1 ± 1.1)明显低于其他 3 组($P < 0.01$), 肿瘤坏死更广泛, 更彻底, 且与对照组比较经蜂毒素微球治疗的大鼠生存期(31.0 ± 3.9 d)显著延长($P < 0.01$).

结论: 蜂毒素以药物微球的剂型经肝动脉给药, 抗肿瘤效果明显优于单纯的蜂毒素和空白微球。

凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强. 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):900-903
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/900.asp>

0 引言

目前肝癌的手术切除率仅有 20 %^[1], 对于不能手术切除的肝癌, 肝动脉化疗栓塞(TACE)是首选的治疗方法^[2-12]. 药物微球作为一种新剂型通过肝动脉介入, 可栓塞至

肝动脉末梢, 有效的阻断肝癌的营养来源, 而且在肿瘤局部缓释其包裹的药物, 具有控释、末梢栓塞、靶向等多重作用, 能够提高药物肝动脉介入的抗肿瘤效果^[13-15]. 我们参照文献^[16], 采用改良的复乳-液中干燥法制备蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球, 经肝动脉灌注治疗大鼠移植性肝癌, 取得了初步的研究结果, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料

蜂毒素(melittin)由第二军医大学长海医院中西医结合肿瘤实验室从中华蜜蜂毒中分离、纯化(纯度>95%). 蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球(M-MS)、聚乳酸/羟乙酸空白微球(B-MS)由上海医药工业研究院采用改良的复乳-液中蒸发法制备, 微球粒径均为40-100 μm, M-MS载药量为3.5%. 微球经 1.0×10^6 Gy剂量的⁶⁰Co照射灭菌, 照射后经检测其形态、蜂毒素生物活性、含量等无改变. 体外溶出试验: 首日释药15%, 以后以2.6%/d的速度持续释放5 wk以上. 双人双目手术显微镜、显微外科手术包购自苏州医疗器械总厂. ♂ SD大鼠, 质量200-250 g, 购自第二军医大学实验动物中心. 大鼠Walker-256瘤株由上海长海医院上海市中西医结合肿瘤实验室提供. 大鼠移植性肝癌模型的制作参照Trubenbach et al^[17]的方法而有所改进: Walker-256瘤株从液氮中复苏后培养扩增, 调整细胞悬液浓度至 1×10^6 /L细胞, 注入质量为100 g左右SD幼鼠腹腔1 mL. 1 wk后幼鼠出现腹水, 抽取腹水, 以1 000 r/min的速度离心3 min, 生理盐水洗涤2遍后再离心, 吸弃上清, 得糊状细胞匀浆, 备用. SD大鼠术前禁食12 h, 用20 g/L戊巴比妥钠40 mg/kg剂量腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于手术板上, 术区常规消毒, 无菌条件下, 在剑突下, 沿腹白线切开1.5 cm左右, 暴露肝脏, 托出肝左外叶, 用1 mL一次性注射器抽取细胞匀浆, 针头与肝脏成30°角斜刺入肝脏0.5 cm, 注入细胞匀浆0.05 mL, 拔除针头, 棉签压迫, 检查无渗血后关腹.

1.2 方法

参照Lindell et al (Eur Surg Res 1988;9:347-352)的肝动脉插管方法, 大鼠造模后7 d, 无菌下再次剖腹, 暴露肝脏. 在手术显微镜下: 用游标卡尺测定肿瘤最大长径和最短径; 分离胃十二指肠动脉、肝总动脉和肝固有动脉. 结扎胃、十二指肠动脉远端, 血管夹暂时阻断肝总动脉, 在胃、十二指肠动脉上作一小切口, 由此插入外径为0.4 mm的自制硅胶导管, 上行至肝固有动脉, 用9-0缝合线固定, 回血后, 分别缓慢注入不同制剂, 拔出导管, 结扎胃十二指肠动脉近端, 放开肝总动脉上的血管夹, 关腹分笼饲养. 随机分为对照组、melittin组、B-MS组和M-MS组, 每组16只. 分别经肝动脉灌注生理盐水1.5 mL/kg, melittin 0.35 mg/kg, B-MS 10 mg/kg, M-MS 10 mg/kg. 后3组药物均溶于生理盐水, 大鼠肝动脉灌注体积均为1.5 mg/kg. 各组随机取6只大鼠于治疗后次日观察生存天数, 并以生理

盐水组为对照组计算生命延长率(%). 生命延长率(%)=(治疗组平均存活天数/对照组平均存活天数-1)×100%. 各组余下动物于治疗后8 d处死, 测量肿瘤长径(a)和短径(b), 按公式 $V=ab^2/2$ ^[18]计算肿瘤体积, 再根据治疗前后的肿瘤体积比计算肿瘤生长率(growth rates, GR)^[19,20]. $GR = \text{治疗后的肿瘤体积} / \text{治疗前的肿瘤体积}$. 完整切取以上处死的大鼠瘤块, 置40 g/L甲醛液中固定, 常规石蜡包埋, 取瘤体最大剖面作2-3处病理切片, HE染色, 光镜下, 根据坏死组织所占整个瘤体的比例分为3度: 轻度(0-30%)、中度(31-70%)及重度(71-100%), 比较各组肿瘤坏死程度.

统计学处理 运用SPSS10.0统计软件, 采用student t, rank sum test, SNK 检验方法进行统计分析. $P < 0.05$ 具有显著性差异.

2 结果

2.1 蜂毒素微球对大鼠肝肿瘤生长的影响

由于手术操作损伤血管, 4组64只大鼠术中及术后有5只出血死亡. 治疗前各组肿瘤体积无显著性差异($P > 0.05$)具有可比性. 对照组治疗后肿瘤体积显著增大($P < 0.01$), 部分大鼠出现肿瘤侵袭腹壁、胃等周围组织及腹水形成; Melittin组和B-MS组肿瘤体积较治疗前也明显增大($P < 0.01$), 两组肿瘤生长率均低于对照组($P < 0.01$); M-MS组肿瘤体积与治疗前相比无明显改变($P > 0.05$), 其中治疗后1例肿瘤消失, 1例无明显改变, 4例缩小, 其余4例均有不同程度的增大, 肿瘤生长率明显低于其他3组($P < 0.01$, 表1, 图1).

表1 各组治疗前后肿瘤体积比较

组别	n	肿瘤体积(cm ³)		肿瘤生长率
		治疗前	治疗后	
对照组	10	0.07 ± 0.02	1.82 ± 0.83 ^c	28.3 ± 13.6
melittin组	7	0.06 ± 0.03	0.83 ± 0.69 ^{bc}	12.4 ± 7.1 ^a
B-MS组	8	0.08 ± 0.05	0.65 ± 0.4 ^{bc}	10.1 ± 8.2 ^a
M-MS组	10	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.06 ^{abd}	1.1 ± 1.1 ^{ab}

^a $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs melittin组, B-MS组; ^c $P < 0.01$, ^d $P > 0.05$ vs 治疗前.

2.2 蜂毒素微球对荷瘤大鼠生存时间的影响

治疗后各组荷瘤大鼠平均生存时间有显著差异($F = 46.0626$, $P < 0.01$, 表2). M-MS组与对照组、B-MS、Melittin组相比, 生存时间明显延长($P < 0.01$). 经B-MS、Melittin治疗的荷瘤大鼠生存时间虽长于对照组, 但其差异均无统计学意义.

2.3 蜂毒素微球经肝动脉灌注对大鼠肿瘤坏死程度的影响

病理结果显示: 治疗后对照组肿瘤坏死程度以轻度坏死为主(图2), Melittin组和B-MS组肿瘤坏死程度以轻中度为主(图3, 4), M-MS组肿瘤坏死程度以重度为主(表2, 图5).

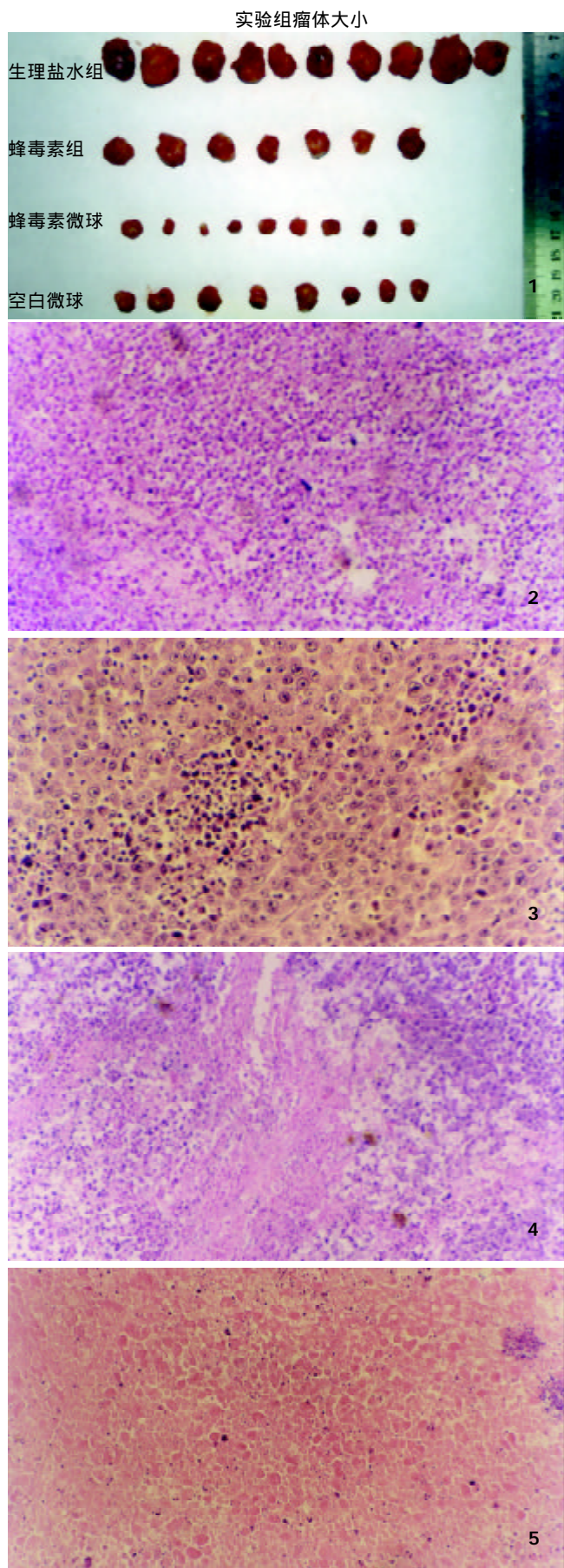


图1 治疗后各组瘤体体积比较。
 图2 对照组肿瘤组织轻度坏死(15 × 10)。
 图3 蜂毒素组肿瘤组织中度坏死(15 × 20)。
 图4 空白微球组肿瘤组织中度坏死(15 × 10)。
 图5 蜂毒素微球组肿瘤组织重度坏死(15 × 20)。

表2 治疗后各组生存时间和肿瘤坏死程度的比较

组别	生存时间			组别	肿瘤坏死程度			
	n	生存时间(d)	生命延长率		n	轻度	中度	重度
对照组	6	13.7 ± 2.2	-	对照组	10	8	1	0
melittin 组	6	15.8 ± 2.0 ^a	15.8 %	melittin 组 ^c	7	2	5	0
B-MS 组	6	16.5 ± 3.0 ^a	20.7 %	B-MS 组 ^c	8	2	5	1
M-MS 组	6	31.0 ± 3.9 ^b	126.8 %	M-MS 组 ^d	9	1	2	7

^aP > 0.05 vs 对照组; ^bP < 0.01 vs 对照组, melittin 组, B-MS 组; ^cP < 0.05 vs 对照组, M-MS 组; ^dP < 0.01 vs 对照组。

3 讨论

对不能手术切除的肝癌, 肝动脉化疗栓塞(TACE)是首选的治疗方法. 临床上常用的栓塞剂碘油, 作为药物载体虽然可选择性滞留在肿瘤组织, 具有缓释性, 但碘油只能到达较细的血管分支, 无法栓塞微血管网^[1], 且碘油与化疗药相溶性差, 药物释放不稳定; 明胶海绵仅能栓塞至肝动脉 2-3 级分枝, 栓塞后, 侧支循环容易建立^[21], 以及常规 TACE 存在的毒副作用^[22,23], 致使 TACE 近期疗效显著, 远期疗效并不理想^[24-28]. 提高肝癌介入的效果, 除改进导管操作技术外, 研制栓塞、抗癌、低毒高效的介入新制剂, 是该领域研究的重要发展方向之一. 药物微球是近二十年来研制的一种新剂型, 由于微球粒径可以按照人为的需要制备, 通过肝动脉栓塞能栓塞至肝窦前小动脉水平, 与其他栓塞剂相比栓塞更彻底, 侧支循环不易形成, 所以能很好的切断肿瘤的营养来源. 在发挥栓塞作用的同时, 微球内药物可在肝癌局部持续缓慢释放, 使局部保持较高的浓度, 起到良好的被动靶向抗癌作用, 能显著降低系统毒性, 具有控释、末梢栓塞、靶向的多重功效^[29-32]. 业已证实药物微球具有抗癌效果好, 使用方便, 用量小, 末梢栓塞作用强等优点.

蜂毒素为蜜蜂毒液中的一种多肽, 由 26 个氨基酸组成, 以往临床上主要用于治疗自身免疫性疾病. 但近 20a 来, 先后发现对多种实验性肿瘤有强烈的杀灭作用^[33,34], 引起了人们的极大关注. 蜂毒素能使肿瘤细胞微粒体膜溶解, 使其呼吸受到抑制, 从而发挥抗肿瘤作用. 但蜂毒素具有溶血等毒副作用, 限制了在临床上的应用, 至今未见有用于治疗肿瘤的临床报道. 我们在体外细胞试验和局部注射治疗肿瘤取得了肯定疗效的基础上, 将蜂毒素以药物微球的方式, 经肝动脉介入给药, 药物在肿瘤局部缓慢释放, 局部药物浓度高, 全身浓度低, 起到了很好的减毒增效作用. 蜂毒素微球在抑制肿瘤生长, 延长荷瘤大鼠生存时间方面明显的优于蜂毒素和空白微球. 一方面是蜂毒素微球通过选择性栓塞肿瘤血管引起肿瘤缺血、缺氧坏死, 另一方面蜂毒素从微球中缓慢释放, 局部药物浓度高, 对肿瘤组织的作用时间长, 缺氧状态的癌细胞对药物更敏感, 使治疗效果增强. 单纯蜂毒素动脉灌注, 虽然也能提高局部药物浓度,

但由于肝脏存在门静脉、肝动脉双重血供, 血流量大, 经肝动脉灌注的药物易被血流冲洗, 使局部停留时间短, 故单纯蜂毒素动脉灌注, 抗癌效果不理想. 另外, 实验中未发现溶血等毒副作用, 可能与药物主要分布在肿瘤组织, 全身浓度较低有关. 我们以聚乳酸羟乙酸作为载体, 制成的蜂毒素 - 聚乳酸/羟乙酸微球, 国内外尚未见报道. 我们的研究结果表明, 将蜂毒素以微球的剂型肝动脉给药治疗肝癌是可行的, 而且能够达到“祛邪而不伤正”的目的. 有关蜂毒素 - 聚乳酸/羟乙酸微球的抗癌确切机制尚有待于进一步研究.

4 参考文献

- Qi YY, Zou LG, Bian XW. Angiogenesis and transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:960-965
- Gao ZE, Zhang CX, Pang MX, Sun P. Characteristics of blood donation in liver cancer and significance in conventional treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1449-1451
- Lau WY. Management of hepatocellular carcinoma. *J R Coll Surg Edinb* 2002;47:389-399
- Achenbach T, Seifert JK, Pitton MB, Schunk K, Junginger T. Chemoembolization for primary liver cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:37-41
- Alsowmely AM, Hodgson HJ. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1-15
- Lin Z, Ren Z, Xia J. Appraisal of postoperative transcatheter arterial chemoembolization(TACE) for prevention and treatment of hepatocellular carcinoma recurrence. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2000;22:315-317
- Sakon M, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Umeshita K, Murakami T, Nakamura H, Monden M. Intrahepatic recurrences of hepatocellular carcinoma after hepatectomy: analysis based on tumor hemodynamics. *Arch Surg* 2002;137:94-99
- Liu L, Huang PL, Tong GS. Experimental study of the antitumor effect of phosphorus-32 glass microspheres on the tumor loaded nude mice. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):58
- Ramsey DE, Kernagis LY, Soulen MC, Geschwind JF. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(Suppl 9):S211-221
- Maeda S, Fujiyama S, Tanaka M, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Survival and local recurrence rates of hepatocellular carcinoma patients treated by transarterial chemolipiodolization with and without embolization. *Hepatol Res* 2002;23:202-210
- Chan AO, Yuen MF, Hui CK, Tso WK, Lai CL. A prospective study regarding the complications of transcatheter intraarterial lipiodol chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:1747-1752
- Georgiades CS, Ramsey DE, Solomon S, Geschwind JF. New nonsurgical therapies in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Tech Vasc Interv Radiol* 2001;4:193-199
- Kyotani S, Nishioka Y. The development of embolizing materials for chemo-embolization therapy of hepatocellular carcinoma. *Yakugaku Zasshi* 2000;120:1173-1184
- Takeuchi I, Ishida H, Inokuma S, Nakada H, Oosawa T, Sakimoto T, Hashimoto D, Kashimada A, Osada H. Hepatic arterial injection of degradable starch microspheres (DSM) combined with adriamycin (ADM) and mitomycin C (MMC) in patients with liver metastasis of colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27:1904-1906
- Kumada T, Nakano S, Sone Y, Kiriyama S, Hisanaga Y, Rikitoku T, Tamoto A, Honda T. Clinical effectiveness of degradable starch microspheres (DSM) in patients with liver cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999;26:1678-1683
- Qu W, Chen QH, Zhao RQ, Li N, Zhou MH. Study on biodegradable sustained release alarelin microspheres injection. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* 2000;31:14-18
- Trubenbach J, Graepler F, Pereira PL, Ruck P, Lauer U, Gregor-M, Claussen CD, Huppert PE. Growth characteristics and imaging properties of the morris hepatoma 3 924 A in ACI rats: a suitable model for transarterial chemoembolization. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2000;23:211-217
- Zhang JS, Wang H, Huang WQ, Sun L, Huang GS, Zhang YQ. Growth inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone analog on hHCC hepatocarcinoma cell xenografts in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:759-764
- Minamimura T, Sato H, Kasaoka S, Saito T, Ishizawa S, Takemori S, Tazawa K, Tsukada K. Tumor regression by inductive hyperthermia combined with hepatic embolization using dextran magnetite-incorporated microspheres in rats. *Ant J Oncol* 2000;16:1153-1158
- Cao W, Wang ZM, Liang ZH, Zhang HX, Wang YQ, Guan Y, Li WX, Pan BR. Effects of angiogenesis inhibitor TNP-470 with lipiodol in arterial embolization of liver cancer in rabbit model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:629-632
- Wu W, Deng R, Ou Y. Therapeutic efficacy of microsphere-entrapped curcuma aromatica oil infused via hepatic artery against transplanted hepatoma in rats. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2000;8:24-26
- Lu CD, Peng SY, Jiang XC, Chiba Y, Tanigawa N. Preoperative transcatheter arterial chemoembolization and prognosis of patients with hepatocellular carcinomas: retrospective analysis of 120 cases. *World J Surg* 1999;23:293-300
- Huang YS, Chiang JH, Wu JC, Chang FY, Lee SD. Risk of hepatic failure after transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: predictive value of the monoethylglycine-exylidide test. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1223-1227
- Chan AO, Yuen MF, Hui CK, Tso WK, Lai CL. A prospective study regarding the complications of transcatheter intraarterial lipiodol chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:1747-1752
- Kim YB, Park YN, Park C. Increased proliferation activities of vascular endothelial cells and tumor cells in residual hepatocellular carcinoma following transcatheter arterial embolization. *Histopathology* 2001;38:160-166
- Lee JK, Chung YH, Song BC, Shin JW, Choi WB, Yang SH, Yoon HK, Sung KB, Lee YS, Suh DJ. Recurrences of hepatocellular carcinoma following initial remission by transcatheter arterial chemoembolization. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:52-58
- Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:1164-1171
- Loewe C, Cejna M, Schoder M, Thurnher MM, Lammer J, Thurnher SA. Arterial embolization of unresectable hepatocellular carcinoma with use of cyanoacrylate and lipiodol. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:61-69
- Pohlen U, Berger G, Binnenhei M, Reszka R, Buhr HJ. Increased carboplatin concentration in liver tumors through temporary flow retardation with starch microspheres (Spherex) and gelatin powder (Gelfoam): an experimental study in liver tumor-bearing rabbits. *J Surg Res* 2000;92:165-170
- Tamura T, Fujita F, Tanimoto M, Koike M, Suzuki A, Fujita M, Horikiri Y, Sakamoto Y, Suzuki T, Yoshino H. Anti-tumor effect of intraperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres to human tumor xenografted nude mice. *J Control Release* 2002;80:295-307
- Kumada T, Kiriyama S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, Fujita M, Hasegawa T, Kitabatake S, Miyazaki K, Ishiguro Y, Yamamoto T. A new embolic agent--DSM(degradable starch microsphere). *Nippon Rinsho* 2001;59:539-544
- Nielsen F, Rook D, Brandt C, Meijer R, Dullens H, Zonnenberg B, de Klerk J, van Rijk P, Hennink W, van het Schip F. Targeting of liver tumour in rats by selective delivery of holmium-166 loaded microspheres: a biodistribution study. *Eur J Nucl Med* 2001;28:743-749
- Kubo H, Loegering DA, Adolphson CR, Gleich GJ. Cytotoxic properties of eosinophil granule major basic protein for tumor cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:426-428
- Lee SY, Park HS, Lee SJ, Choi MU. Melittin exerts multiple effects on the release of free fatty acids from L1210 cells: lack of selective activation of phospholipase A2 by melittin. *Arch Biochem Biophys* 2001;389:57-67

大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义

薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡

薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡, 广州中山大学中山医学院病理学教研室 广东省广州市 510080

薛玲, 女, 1956-03-01 生, 安徽省寿县人, 汉族. 1983 年广州中山医科大学本科毕业, 1986 年中山医科大学硕士研究生毕业, 1996 年博士毕业, 2000 年美国加州大学戴维斯分校博士后, 教授, 主要从事肝癌及消化系统肿瘤研究, 发表论文 20 篇.

国家教委回国人员启动基金资助项目, No.2000479

项目负责人: 薛玲, 510080, 广东省广州市中山二路 74 号, 中山大学中山医学院病理教研室. pathol@gzsums.edu.cn

电话: 020-87331783 传真: 020-87331679

收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-14

Expressive characteristic and biological significance of oncogenes during rat hepatocarcinogenesis

Ling Xue, Bing Liao, Guo-Qiang Zhao, Rui-De Hu, Li-Hong Che, Jun Dong

Ling Xue, Bing Liao, Guo-Qiang Zhao, Rui-De Hu, Li-Hong Che, Jun Dong, Department of Pathology, Zhongshan Medical College, Zhongshan University, Guangzhou 510080, Guangdong Province China

Supported by the foundation of National Education Committee, No.2000479

Correspondence to: Dr. Ling Xue, Department of Pathology, Zhongshan Medical College, 74 Zhongshan 2th Road, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. pathol@gzsums.edu.cn

Received: 2002-11-06 Accepted: 2002-11-14

Abstract

AIM: To explore the expressive characteristic and biological significance of oncogenes during experimental hepatocarcinogenesis in rat

METHODS: A rat model of liver carcinoma was induced with carcinogen 3'-Me-DAB. The hepatic expressive characteristic of Ha-ras, c-myc and Ki-ras rats in varied stages in induction of cancer were examined with in situ hybridization and RNA slot blot hybridization.

RESULTS: The hepatic expression and distribution of Ha-ras and c-myc were similar in different periods of cancer induction. In early stage of carcinoma induction, there were more positive cells of Ha-ras and c-myc but little Ki-ras positive cells. In late stage of carcinoma induced, the number of positive cells of three oncogenes was decreased; On the 17th week of induction of cancer, the signals of three oncogenes in all the cancer nodules were negative or weak but stronger in hepatic peri-cancer tissues.

CONCLUSION: Oncogenes Ha-ras and c-myc were activated and had synergistic effect on the malignant transformation of cells in early stage of hepatocarcinogenesis. Ki-ras might be activated in late stage of hepatocarcinogenesis and associated with malignant transformation of hepatocytes.

Xue L, Liao B, Zhao GQ, Hu RD, Che LH, Dong J. Expressive characteristic and biological significance of oncogenes during rat hepatocarcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):904-907

摘要

目的: 探讨癌基因在实验性大鼠肝癌形成过程中的表达变化特点及其生物学意义.

方法: 应用化学致癌剂 3'-Me-DAB 建立大鼠肝癌模型, 取其肝脏用核酸原位杂交和 RNA Slot blot 杂交方法, 动态检测 c-myc、Ha-ras 和 Ki-ras 在实验性大鼠肝癌形成过程中的表达变化.

结果: 在诱癌全过程中, c-myc 和 Ha-ras 均为同步表达; 在诱癌的早期可检测到较多 c-myc 和 Ha-ras 的阳性表达细胞, 而 Ki-ras 阳性的细胞数则很少, 且反应强度弱; 而诱癌后期, 各癌基因 mRNA 阳性表达细胞均减少; 至 17 wk, 所有癌组织内均显示 3 种癌基因表达阴性, 或仅见个别小癌巢内少数癌细胞呈弱阳性. 而癌旁肝组织内却可见三种癌基因的大量表达.

结论: c-myc 与 Ha-ras 被激活是肝癌发生过程中的早期事件, 且二者之间具有协同作用, 而这种协同作用在肝癌的启动上可能具有重要意义; Ki-ras 的激活则发生较晚, 可能与促进细胞恶性转化有关.

薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡. 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):904-907

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/904.asp>

0 引言

肝癌的发生涉及多种癌基因的激活和抑癌基因的失活^[1-11], 但对于不同癌基因的选择性表达以及他们在时间上的顺序激活对肿瘤的发生发展有何意义仍不完全清楚. 我们应用核酸原位杂交和 RNA Slot blot 杂交, 动态检测 c-myc、Ha-ras 和 Ki-ras 在实验性大鼠肝癌形成过程中的表达变化, 旨在探讨上述癌基因在肝癌发生中的作用及其生物学意义.

1 材料和方法

1.1 材料 3'-Me-DAB 诱发大鼠肝癌模型: 由本校实验动物中心提供标准动物, 选择健康 ♂ SD 品系大白鼠 50 只, 体质量 100-120 g, 稳定饲养 1 wk 后, 40 只作为实验组, 用含 0.6 g/L 3'-Me-DAB 的饲料喂养 14 wk 后停药, 之后继续以正常饲料喂养至 17 wk; 另外 10 只作为对照组, 以标准饲料喂养. 自投以致癌剂之日起, 分别在 4, 6, 8, 14 和 17 wk 处死 5 只大鼠, 取其肝脏, 部分置液氮中冻存, 用于提取组

织总 RNA; 部分用 40 g/L 中性甲醛固定, 石蜡包埋. 所有蜡块均作 5 μm 厚的连续切片, 用于 HE 染色及核酸原位杂交.

1.2 方法 癌基因核酸原位杂交: 所用癌基因探针质粒(c-Ha-ras PBR322 6.6 kb BamH I、Ki-ras PBR322 1.0 kb ECoR I、c-myc PBR322 8.5 kb Hind III /ECoR I)由北京中国医学科学院肿瘤研究所提供, DIG 标记(标记试剂盒为德国宝灵曼公司产品), 标记方法为随机引物法. 石蜡包埋切片 5 μm , 蛋白酶 K 40 mg/L 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 预杂交, 42 $^{\circ}\text{C}$, 1 h; 杂交过夜, 42 $^{\circ}\text{C}$; 1/500 辣根过氧化物酶标记的抗 Dig 抗体 1 h, DAB 显色, TE 终止显色, 中性树脂封片, 镜检. 常规提取不同时期大鼠肝组织标本的总 RNA, 紫外分光光度计(pharmacia, ultrospec 2000)测其 A 值, 260/280 在 1.7 以上者用于杂交实验. RNA-DNA 狭缝杂交(slot blot hybridization)按《分子克隆》一书介绍的方法加以改进进行. 用狭缝点样器将变性之 RNA 点于尼龙膜(德国宝灵曼公司)后进行杂交. 所用癌基因探针标记方法同上. 常规洗膜. 将膜封入杂交袋内, 加入 50 g/LCSPD(德国宝灵曼公司), 10 min 后倾出 CSPD 液, 将膜压入 X 光暗盒曝光于 X 光胶片, 常规显影, 定影. 胶片用 Kontron IBASS 2.0 图像分析处理仪(German)扫描分析结果.

2 结果

诱癌 4 wk 的大鼠肝体积明显缩小, 质地柔软, 镜下除见大量肝细胞坏死外, 显著的变化为门管区及坏死的肝细胞区内均见大量增生的卵圆细胞. 诱癌 6 wk, 大鼠肝内仍有大量卵圆细胞, 部分卵圆细胞变为立方形, 核呈圆形, 似胆管上皮细胞, 并可围成管腔样结构. 与此同时, 在大片的卵圆细胞中还可看到一些嗜碱性细胞、小肝细胞及过渡细胞. 诱癌 8 wk, 大鼠肝镜下可见典型假小叶形成, 假小叶周围为增生的纤维组织及较多的卵圆细胞, 其间仍可见过渡细胞和胆管上皮细胞. 诱癌 14 wk, 肝内已出现不典型增生的肝细胞灶. 诱癌 17 wk, 大鼠肝脏除肝硬化改变外, 还可见癌结节形成. 所形成的 5 例肝癌中, 1 例为胆管上皮癌, 其余 4 例为混合性肝癌.

2.1 癌基因 c-myc、Ha-ras、Ki-ras mRNA 原位杂交 凡细胞胞质内见有均匀一致分布的棕黄色颗粒者即为阳性反应细胞. 在化学诱癌不同时期的大鼠肝脏标本中均可检测到 3 种癌基因的表达, 其中以 Ha-ras 检出率最高且反应强度最强, Ki-ras 的反应最弱. 3 种癌基因的表达分布范围基本一致. 在诱癌的 4-8wk, 癌基因 c-myc 和 Ha-ras 的阳性表达细胞呈逐渐增多趋势, 而 Ki-ras 阳性的细胞数很少, 且反应强度弱. 阳性表达细胞多为肝细胞坏死区周围或假小叶外围的小肝细胞; 而门管区卵圆细胞和过渡细胞亦可见少量阳性反应细胞. 诱癌 14 wk 时, 各癌基因阳性表达细胞数量均减少, 但仍可见部分小肝细胞、嗜碱性肝细胞呈阳性反应. 至 17 wk, 所有

癌组织内均显示三种癌基因表达阴性, 或仅见个别小癌巢内少数癌细胞呈弱阳性. 而癌旁肝组织内无论是 HE 切片中显示形态完全正常的肝细胞, 亦或是具有一定异型性, 甚至不典型增生之肝细胞均可见三种癌基因的大量表达(图 1-3).

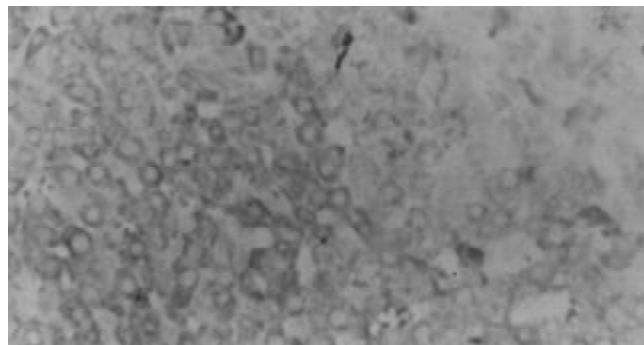


图 1 诱癌 8 wk 时 c-Ha-ras 原位杂交示大量阳性细胞.

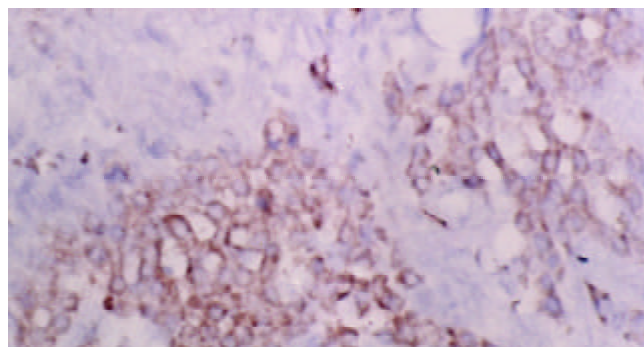


图 2 诱癌 17 wk 时癌旁肝组织内见大量 c-Ha-ras 阳性细胞.

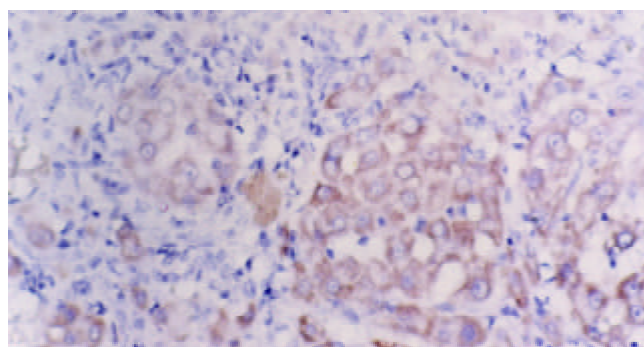


图 3 诱癌 17 wk 时癌旁肝组织内见较多 c-myc 阳性细胞.

2.2 c-myc, Ha-ras, Ki-ras mRNA 表达的 Slot blot 杂交半定量 在大鼠诱癌的过程中, c-myc、Ha-ras 和 Ki-ras 的表达程度如何, 仅靠原位杂交来反映是不够的, 故我们提取了诱癌不同时期大鼠肝的总 RNA 进行 Slot blot 杂交, 然后通过图像分析仪将杂交信号的强弱转换为平均灰度值, 以求客观反应上述三种癌基因在大鼠肝癌发生、发展过程中相对量的表达变化情况, 可见, c-myc 与 Ha-ras 的表达是同步的, 二者均从诱癌 4 wk 开始升高, 8 wk 升高更为显著, 之后下降; 至肝癌形成时(17 wk), 癌组织内二者的表达均很低, 而癌旁组织则有高表达. Ki-ras 仅在癌旁组织中检出. (表 1).

表1 癌基因 Slot blot 杂交信号的平均灰度值

t/wk	c-myc	Ha-ras	Ki-ras
0	7.0	1.2	-
4	7.5	6.4	-
6	12.1	7.7	-
8	18.6	10.9	-
14	5.4	4.1	-
17/癌组织	4.3	1.8	-
\癌旁组织	28.3	18.9	5.2

3 讨论

在肝癌发生发展的过程中, 各阶段有其特异的基因表达^[12]. N-ras 在人原发性肝癌中是一个转化基因, 他可能在癌形成的早期或癌前期即被激活^[13,14]. 而在动物(包括大鼠和小鼠), 不少化学致癌剂首先激活的是 Ha-ras 和 Ki-ras, 从而导致肝癌的形成, 这已为许多实验所证实^[15-20]. 由此看来, 无论在人或动物, ras 基因都可能是肝的致瘤因子作用的靶基因, 从而也提示他可能是在肿瘤发生的启动阶段被激活的肿瘤基因. c-myc 的过量表达普遍见于各种肝癌细胞系和肝癌组织中, 表明 c-myc 的激活亦是肝癌发生中的常见事件, 可能参与肝癌发生的机制^[21-29]. 但对于他在肝癌发生过程中检出的时间, 各家结果不尽一致. Yaswen et al^[30]在诱癌早期增生的卵圆细胞内即发现有 c-myc 的表达升高; 而 Beer et al^[31]则仅在诱癌后期检测到 c-myc 的表达. 以往的研究发现, 绝大多数人肝癌组织中同时有 c-myc 和 ras 的过表达. 动物实验也发现, 在化学诱癌早期可出现 c-myc 或 Ha-ras 的过表达^[32]. c-myc 和 ras 的表达对细胞的增生发挥作用, 可能参与肝癌的形成或维持. Tashiro et al^[33]用黄曲霉素 B1 诱发大鼠肝癌, 分析癌细胞内的 RNA 和 DNA, 发现 c-myc 与 Ha-ras 之间具有协同作用; Corcos et al^[34]在 DENA 诱发的大鼠肝癌及癌旁肝细胞内检测到 Ha-ras、Ki-ras 和 c-myc, 认为这可能是化学致肝癌过程中较早出现的事件, 与肝癌的形成启动有关, 由此认为二者可能是一类互补基因, 之间具有一定特异性的协同作用, 而这种特异的协同作用在肝癌的启动上可能有重要意义.

我们的结果显示, 在诱癌的整个过程中, Ha-ras 的表达不仅总是与 c-myc 的表达相伴出现, 呈现出同步升高或同步降低, 而且二者在核酸原位杂交中的显示阳性表达细胞的类型及分布范围基本一致, 表明二者之间确实存在某种联系, 这与以往许多学者的研究结果相吻合. 在诱癌的早期和中期(诱癌的 4-8 wk), 在增生的卵圆细胞、过渡细胞和小肝细胞中都可以检测到 c-myc 和 Ha-ras 的表达, 且表达强度不断升高. 而在诱癌晚期(诱癌的 14 wk), 上述两种癌基因的表达强度降低. 在肝癌形成之后, 我们仅在癌旁组织内检出 c-myc、Ha-ras 的表达升高, 而癌组织内则呈低水平

表达. 这提示二者可能是在肝细胞癌变的早期(启动阶段)被激活, 而在肝癌形成的后期, 不需要上述二种癌基因的过表达来维持细胞的恶性表型, 而可能有其他癌基因或抑癌基因参与其中. Ki-ras 的表达仅在癌旁组织中检测到, 表明他可能是本模型中较晚出现的事件, 其作用可能与促进细胞恶性转化有关.

4 参考文献

- Lin GY, Chen ZL, Lu CM, Li Y, Ping XJ, Huang R. Immunohistochemical study on p53, H-rasp21, c-erbB-2 protein and PCNA expression in HCC tissues of Han and minority ethnic patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:234-238
- Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001;7:33-36
- 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
- Martins C, Kedda MA, Kew MC. Characterization of six tumor suppressor genes and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *World J Gastroenterol* 1999;5:470-476
- Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001;7:131-135
- Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR. Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001;7:136-139
- Yang JM, Han DW, Xie CM, Liang QC, Zhao YC, Ma XH. Endotoxins enhance hepatocarcinogenesis induced by oral intake of thioacetamide in rats. *World J Gastroenterol* 1998;4:128-132
- Jiang Y, Zhou XD, Liu YK, Wu X, Huang XW. Association of hTcf-4 gene expression and mutation with clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:804-807
- 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
- Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:356-360
- 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
- Pitot HC. Stage-specific gene expression during hepatocarcinogenesis in the rat. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:257-265
- Luo D, Liu QF, Gove C, Naomov N, Su JJ, Williams R. Analysis of N-ras gene mutation and p53 gene expression in human hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 1998;4:97-99
- Richards CA, Short SA, Thorgeirsson SS, Huber BE. Characterization of a transforming N-ras gene in the human hepatoma cell line Hep G2: additional evidence for the importance of c-myc and ras cooperation in hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1990;50:1521-1527
- Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991;64:281-302
- Wang Q, Lin ZY, Feng XL. Alterations in metastatic properties of hepatocellular carcinoma cell following H-ras oncogene transfection. *World J Gastroenterol* 2001;7:335-339
- Yin ZZ, Jin HL, Yin XZ, Li TZ, Quan JS, Jin ZN. Effect of *Boschniakia rossica* on expression of GST-P, p53 and p21 (ras) proteins in early stage of chemical hepatocarcinogenesis

- and its anti-inflammatory activities in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:812-818
- 18 Boivin-Angele S, Lefrancois L, Froment O, Spiethoff A, Bogdanffy MS, Wegener K, Wesch H, Barbin A, Bancel B, Trepo C, Bartsch H, Swenberg J, Marion MJ. Ras gene mutations in vinyl chloride-induced liver tumours are carcinogen-specific but vary with cell type and species. *Int J Cancer* 2000;85:223-227
- 19 Baba M, Yamamoto R, Iishi H, Tatsuta M. Ha-ras mutations in N-nitrosomorpholine-induced lesions and inhibition of hepatocarcinogenesis by antisense sequences in rat liver. *Int J Cancer* 1997;72:815-820
- 20 Ruan Y, Wu Z, Yang M. Expression of PCNA and protooncogenes during experimental hepatocarcinogenesis in rats. *Zhonghua Bingli Xue Zazhi* 1996;25:39-40
- 21 Farshid M, Tabor E. Expression of oncogenes and tumor suppressor genes in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. *J Med Virol* 1992;38:235-239
- 22 Suchy BK, Sarafoff M, Kerler R, Rabes HM. Amplification, rearrangements, and enhanced expression of c-myc in chemically induced rat liver tumors in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1989;49:6781-6787
- 23 Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor signal coupling to various transcription factors depends on triggering of Met receptor and protein kinase transducers in human hepatoma cells HepG2. *Exp Cell Res* 2000;256:272-281
- 24 de La Coste A, Mignon A, Fabre M, Gilbert E, Porteu A, Van Dyke T, Kahn A, Perret C. Paradoxical inhibition of c-myc-induced carcinogenesis by Bcl-2 in transgenic mice. *Cancer Res* 1999;59:5017-5022
- 25 Niu ZS, Li BK, Wang M. Expression of p53 and C-myc genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:822-826
- 26 Blake M, Niklinski J, Zajac-Kaye M. Interactions of the transcription factors MIBP1 and RFX1 with the EP element of the hepatitis B virus enhancer. *J Virol* 1996;70:6060-6066
- 27 Giri RK, Das BR. Differential expression of c-jun and c-myc in N-nitroso diethylamine-induced hepatic oncogenesis in AKR mice. *Cancer Lett* 1996;109:121-127
- 28 Ahn SG, Jeong SY, Rhim H, Kim IK. The role of c-Myc and heat shock protein 70 in human hepatocarcinoma Hep3B cells during apoptosis induced by prostaglandin A2/Delta12-prostaglandin J2. *Biochim Biophys Acta* 1998;1448:115-125
- 29 Li J, Yang XK, Yu XX, Ge ML, Wang WL, Zhang J, Hou YD. Overexpression of p27(KIP1) induced cell cycle arrest in G(1) phase and subsequent apoptosis in HCC-9204 cell line. *World J Gastroenterol* 2000;6:513-521
- 30 Yaswen P, Goyette M, Shank PR, Fausto N. Expression of c-Ki-ras, c-Ha-ras, and c-myc in specific cell types during hepatocarcinogenesis. *Mol Cell Biol* 1985;5:780-786
- 31 Beer DG, Schwarz M, Sawada N, Pitot HC. Expression of H-ras and c-myc protooncogenes in isolated gamma-glutamyl transpeptidase-positive rat hepatocytes and in hepatocellular carcinomas induced by diethylnitrosamine. *Cancer Res* 1986;46:2435-2441
- 32 Simile MM, Pascale R, De Miglio MR, Nufri A, Daino L, Seddaiu MA, Gaspa L, Feo F. Correlation between S-adenosyl-L-methionine content and production of c-myc, c-Ha-ras, and c-Ki-ras mRNA transcripts in the early stages of rat liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 1994;79:9-16
- 33 Tashiro F, Morimura S, Hayashi K, Makino R, Kawamura H, Horikoshi N, Nemoto K, Ohtsubo K, Sugimura T, Ueno Y. Expression of the c-Ha-ras and c-myc genes in aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;138:858-864
- 34 Corcos D, Defer N, Raymondjean M, Paris B, Corral M, Tichonicky L, Kruh J, Glaise D, Saulnier A, Guguen-Guillouzo C. Correlated increase of the expression of the c-ras genes in chemically induced hepatocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:259-264

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

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志®

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

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡

吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎

吴苏冬, 海军总医院肿瘤科 北京市 100037
刘长利, 北京市红十字血液中心 北京市 100088
王慧川, 陕西省中医医院肿瘤科 陕西省西安市 710003
鲍德虎, 西安交通大学医学院免疫学教研室 陕西省西安市 710061
吴苏冬, 女, 1976-09-05 生, 陕西省咸阳市人, 汉族. 2002 年西安交通大学医学院硕士毕业, 主要从事肿瘤内科的临床工作.
陕西省科委基金资助课题, No.97K12G22
项目负责人: 王慧川, 710003, 陕西省西安市, 陕西省中医医院肿瘤科.
电话: 13691002919
收稿日期: 2002-01-11 接受日期: 2002-02-07

Apoptosis of human liver cancer cell line SMMC-7721 induced by Senjiu capsule

Su-Dong Wu, Chang-Li Liu, Hui-Chuan Wang, De-Hu Bao

Su-Dong Wu, Department of Oncology, Navy Hospital, Beijing 100037, Beijing, China
Chang-Li Liu, Beijing Red Cross Blood Center, Beijing 100088, Beijing, China
Hui-Chuan Wang, Department of Oncology, Traditional Chinese Medical Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China
De-Hu Bao, Department of Immunology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Supported by the Natural Scientific Foundation of Shaanxi Province, No.97K12G22
Correspondence to: Hui-Chuan Wang, Department of Oncology, Traditional Chinese Medical Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China.
Received: 2002-01-11 Accepted: 2002-02-07

Abstract

AIM: To study the apoptosis of human liver cancer cell line SMMC-7721 induced by Senjiu Capsule.

METHODS: Apoptosis was detected by HE staining, electron microscopy (TEM) and TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL).

RESULTS: SJ significantly inhibited the growth of SMMC-7721 cells and the inhibitory effect was positively related to the concentration and exposure time to SJ. And SJ could induce extensive apoptosis of SMMC-7721 cells. After exposure with 10 μ g/ml SJ for 48 h, the cells showed classical morphological and biochemistry features of apoptosis under light microscope and electron microscope. Apoptosis cells in different phases were observed by TUNEL.

CONCLUSION: SJ significantly inhibited the growth of human cancer cells, but also induced extensive apoptosis. The apoptotic effect of SJ on tumor cells might play a key role in its anticancer activities. SJ could be used as a potential natural apoptosis-inducer in liver cancer therapy.

Wu SD, Liu CL, Wang HC, Bao DH. Apoptosis of human liver cancer cell line SMMC-7721 induced by Senjiu capsule. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):908-911

摘要

目的: 研究“参白胶囊”(SJ) 诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用。

方法: 采用 HE 染色、透射电镜观察、原位末端标记技术 (TUNEL) 等方法, 观察 SJ 作用于 SMMC-7721 细胞后细胞形态的改变。

结果: HE 染色及透射电镜分别从微观、超微观水平观测肿瘤细胞经 SJ 作用后的形态学变化: 细胞变圆、缩小, 折光性增强, 细胞破碎, 经 HE 染色后, 细胞核呈兰黑色, 胞质呈淡红色, 细胞出现凋亡改变, 单个散在分布, 表现为核染色质致密浓缩, 核碎裂或核染色质断裂, 形成大小不等的凋亡小体, 证实 10 μ g/mL SJ 作用 SMMC-7721 48 h 后细胞出现典型的凋亡征象; TUNEL 法检测到发生在各期的凋亡细胞。

结论: SJ 可诱导 SMMC-7721 细胞凋亡, 可望作为一种新的细胞凋亡诱导剂用于肝癌的治疗。

吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎. 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):908-911

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/908.asp>

0 引言

恶性肿瘤与细胞凋亡调节紊乱、细胞增生分化/死(凋亡)平衡失调等多种因素有关^[1-4]。细胞凋亡在肿瘤形成的不同阶段均具有十分重要的作用, 他可以在基因水平被多种生物和理化因素诱导而启动, 通过自主清除恶变的或者可能恶变的细胞而调控肿瘤的发生发展^[5-11]。近年来, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为筛选抗癌药物的一个新的指标, 开发低毒并可诱导肿瘤细胞凋亡的新药及设计相应的新疗法已成为肿瘤化疗、放疗、生物治疗、基因治疗、诱导分化治疗研究的新领域。中药复方参白胶囊(SJ)在长期临床实践中收到了较为满意和可靠的疗效, 并获陕西省科委基金资助, 对其抗癌作用及其机制进行研究。初期实验发现该方剂具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 显示了该药广阔的应用前景与价值。我们分别从细胞、亚细胞、分子水平研究了 SJ 诱导肝癌细胞凋亡的机制, 为该药的进一步开发和应用提供了必要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SJ 由陕西省中医药研究院附属医院王慧川主

任医师提供, 具体药物如下: 人参, 补骨脂, 郁金, 桃耳七, 半枝莲, 水蛭, 甘草. SJ制备: 以上各味中药按一定比例, 制成粉剂, 于冷水中浸泡2 h后, 加热煮沸2 h, 定量, 调整浓度为1 kg/L(相当于生药浓度), 8 000 r/min × 10 min离心, 上清高压灭菌后, 4 °C冰箱保存. 使用前, 无菌条件下以培养液梯度稀释成所需浓度. 人肝癌细胞株SMMC-7721由第四军医大学口腔医院生物学教研室吴军正教授提供. RPMI1640培养基为Gibco公司产品, 按说明用三蒸水配制, 并添加100 mL/L(V/V)胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 kU/L链霉素, 0.22 U滤器除菌, 4 °C冰箱保存; 胎牛血清为浙江省金华市清湖犊牛应用研究站产品; MTT[3-(4, 5)-双甲基-乙-噻唑-(2, 5)-二甲基溴化四氮唑蓝]为美国Sigma公司产品, 以磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4, PBS)配成5 g/L的溶液, 过滤除菌, 4 °C冰箱保存; TUNEL原位末端标记试剂盒[terminaldeoxynucleotidyl transferase(TdT)]为美国Promega公司产品; DIG-dUTP为德国B.M.公司产品; Anti-DIG-Biotin为美国Sigma公司产品; SABC及DAB kit均为武汉博士德公司产品. CO₂恒温孵箱: 美国Forma Scientific公司; IMT-2型倒置生物显微镜: 日本Olympus公司; YJ-875型超净工作台: 苏州净化设备厂; 透射电子显微镜: 日本产JEM-2000EX型; 96孔及24孔细胞培养板: 丹麦Costar公司.

1.2 方法 人肝癌细胞株SMMC-7721常规培养于RPMI1640完全培养液内, 置37 °C, 50 mL/L CO₂孵箱, 2-3 d传代1次. 取指数生长期细胞供实验. 盖玻片泡酸处理, 高压灭菌后, 放入新24孔板内, 每孔1片; 取对数生长期SMMC-7721细胞, 常规消化, 调密度至10⁷/L, 加样, 1 mL/孔; 24 h后, 各孔加入10 mg/L SJ 1 mL, 设无药培养液组为对照; SJ与细胞分别作用4, 8, 12, 24, 32, 48, 60, 72 h后, 在倒置显微镜下观察记录后, 作HE染色: 培养终止, 取出盖玻片, PBS小心冲洗3遍, 放入预冷的950 mL/L酒精中, 4 °C固定, 用透明胶背面粘于载玻片上, 细胞面向上, 37 °C烘干, PBS冲洗, 置苏木精染液中5-10 min, 水浸洗, 置稀盐酸酒精中数秒分色, 水浸洗, 淡氨水中3-5 min, 水浸洗, 伊红染液中浸5-10 min, 水浸洗后, 500, 800, 900 mL/L酒精梯度脱水各1-2 min, 950 mL/L酒精2次各1-2 min, 1 L/L无水酒精3次各2 min, 透明, 二甲苯中3次各2 min, 树脂封片观察.

1.2.1 细胞超微结构改变 取对数生长期7721细胞分别接种于4个100 mL细胞培养瓶内, 24 h后前3瓶细胞分别加入10 mg/L SJ 10 mL, 第4瓶加入培养液10 mL. 分别作用24, 48, 72 h后收集细胞, 置离心管中, PBS洗2遍, 离心2 000 r/min × 20 min, 使细胞形成团块贴于管底, 加入25 mL/L戊二醛固定液(取250 mL/L戊二醛原液10 mL, 加pH7.2, 0.2 mol/L磷酸缓冲液50 mL, 再加蒸馏水40 mL混匀, 4 °C冰箱保存), 4 °C固定2 h, 0.1 mol/L PBS浸洗后, 10 g/L锇酸(OsO₄)固定10 min,

用Epon812常规方法包埋, 制成半薄切片, 甲苯胺兰染色, 光镜下定位, LKB-5型超薄切片, 铀-铅双染色, 透射电镜下观察照相.

1.2.2 原位末端标记法检测细胞凋亡 常规接种SMMC-7721细胞于24孔板中的载玻片上, 每孔1 × 10⁷/L(载玻片预先用多聚赖氨酸处理), 24 h后加入SJ药液(10 mg/L), 以不加药组为对照, 药物作用24 h或48 h; 将24孔板离心2 000 r/min × 5 min, 取出载玻片, 40 mL/L多聚甲醛室温固定30 min. 0.1 mol/L pH7.4 PBS洗2 min × 2次, 蒸馏水洗涤2 min × 2次, 新鲜配制30 mL/L H₂O₂, 室温处理10 min, 蒸馏水洗涤2 min × 3次, 标本片加0.01 mol/L pH7.5 TBS(1L双蒸馏水中加入氯化钠8.5 g, Tris 1.2 g和纯乙酸0.45-0.5 mL), 1:200新鲜稀释Proteinase K 37 °C消化5 min, 蒸馏水洗涤2 min × 3次, 甩去玻片上多余液体, 加标记缓冲液(labelling buffer) 20 μL/样本以保持玻片湿润, 甩片后, 加标记液(TdT 1 μL和DIG-d-UTP 18 μL混匀), 20 μL/样本, 样本置湿盒内, 4 °C标记过夜后, 37 °C标记2 h, TBS洗2 min × 3次, 加封闭液50 μL/样本, 室温30 min, 甩掉封闭液, 加封闭液1:100稀释生物素化抗地高辛抗体, 50 μL/样本, 置湿盒中, 37 °C 30 min, TBS洗2 min × 3次, 加TBS 1:100稀释SABC, 37 °C反应30 min, TBS洗5 min × 4次, DAB显色15 min, 水洗, 苏木素轻度复染, TBS洗, 蒸馏水洗, 脱水, 透明, 封片. 显微镜观察, 成像.

2 结果

2.1 肿瘤细胞形态学改变 细胞经SJ作用24 h后, 在倒置显微镜下可见细胞变圆、缩小, 折光性增强, 细胞破碎, 漂浮在培养液中. 经HE染色后, 细胞核呈兰黑色, 胞质呈淡红色, 部分细胞出现凋亡改变, 单个散在分布, 表现为核染色质致密浓缩, 核碎裂或核染色质断裂, 形成大小不等的凋亡小体. 48 h组凋亡细胞进一步增多, 形态学特征更加典型. 72 h组细胞则主要表现为均质红染的无结构物质, 核染色消失, 凋亡小体解体(图1、2).

2.2 细胞超微结构变化 透射电镜观察SJ作用的细胞超微结构变化, SJ作用24 h组部分细胞出现细胞凋亡现象, 48 h组凋亡改变典型: 细胞核缩小, 核膜皱缩, 染色体密集于核膜下, 形成新月体或聚集于核膜呈境界分明的块状边集现象, 细胞质浓缩或裂解成质膜包裹的碎片; 72 h组以细胞裂解表现居多, 同时又有大量凋亡小体并见. 凋亡小体为以核膜消失, 染色体断裂成碎片, 与细胞器等胞质成分聚集为特征, 而坏死细胞则出现染色质减少, 呈细颗粒状, 细胞器肿胀破裂, 染色质分布无规律, 边界不清等(图3-6).

2.3 细胞凋亡 阴性对照组细胞染色阴性, SJ作用48 h组可见许多SMMC-7721细胞核中出现棕黄色颗粒, 此即为凋亡细胞, 部分凋亡细胞也有因核DNA碎片的

逸出呈核外阳性着色. 少量阴性细胞可呈非特异性核外着色(图7、8).

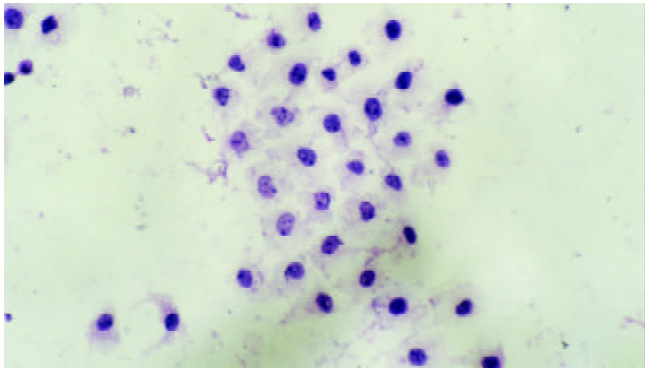


图1 对照组SMMC-7721细胞HE染色片.

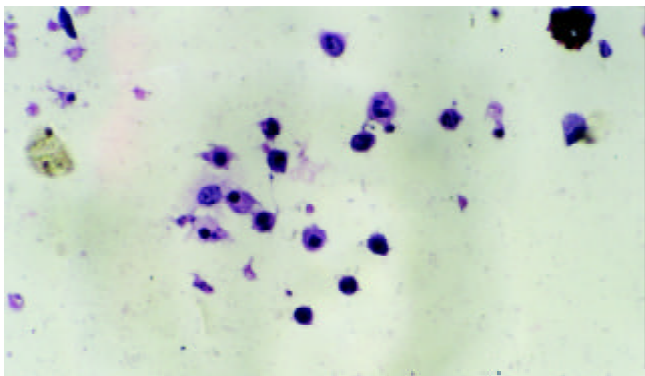


图2 实验组SMMC-7721HE染色出现的凋亡细胞.

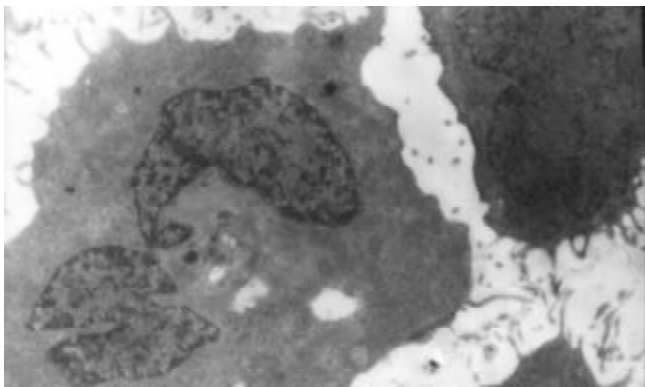


图3 对照组SMMC-7721细胞超微结构(× 5 000).

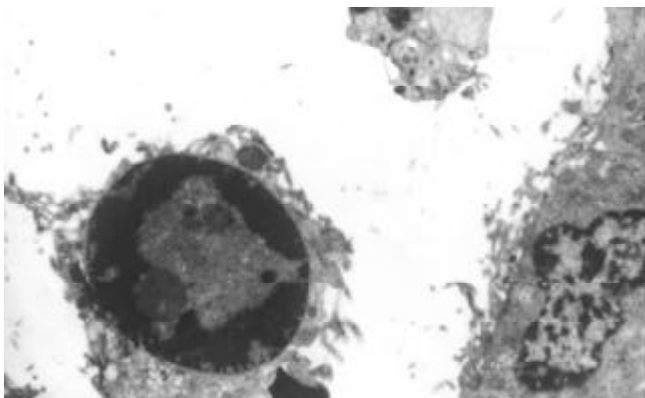


图4 48 h组凋亡SMMC-7721细胞超微结构(× 5 000).

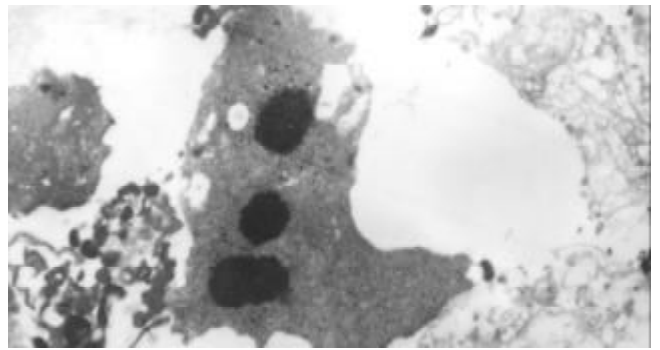


图5 72 h组出现的凋亡小体(× 5000).

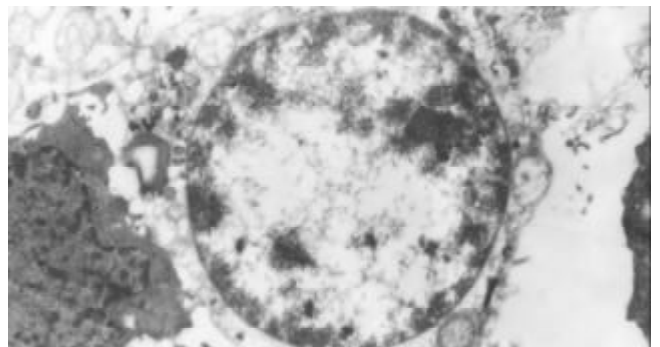


图6 坏死的SMMC-7721细胞(× 5000).

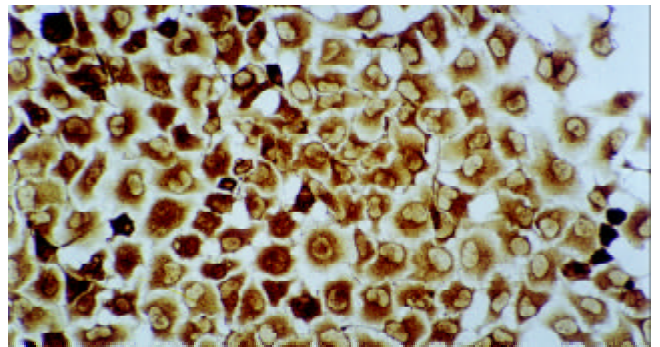


图7 对照组SMMC-7721细胞TVNET染色.

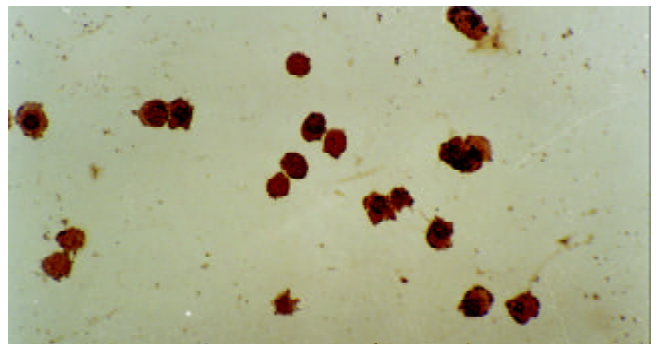


图8 SJ作用48h组凋亡细胞TVNET染色.

3 讨论

肿瘤细胞经SJ作用后, 出现典型的凋亡征象, 说明诱导肿瘤细胞凋亡可能是SJ抗肿瘤作用的重要机制. 过去认为, 化疗药物引起细胞坏死是其抗肿瘤的主要机制, 但多数情况下, 药物有效浓度对肿瘤细胞的杀灭效率不足以解释其实际治疗效应, 随着细胞凋亡机制

研究的深入, 发现许多抗肿瘤药物都具有诱导细胞凋亡的作用^[12,13]. 我们的观察证实 SJ 同样具此作用, 分析这可能与 SJ 的主药鬼臼中内含鬼臼毒素^[14-17], 可干扰细胞有丝分裂, 抑制 DNA 合成而诱发凋亡有关. 凋亡细胞由于内源性核酸内切酶被激活, 细胞自身的染色质或 DNA 被切割, 出现单链或双链缺口, 并产生与 DNA 断点数目相同的 3' -OH 末端. 末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase)可将地高辛标记的 dUTP(DIG-dUTP)标记至 3' -OH 末端, DIG-dUTP 结合在 DNA 断点部位, 加入生物素标记的抗地高辛抗体(anti-DIG-biotin), 再结合链酶亲和素-一过氧化物酶(SABC), 最后加入底物 DAB 显色. 原位末端标记技术(又称 TUNEL 法)即是依此原理建立起来的, 这是目前公认的且已被各实验室采用的用于检测细胞凋亡的一种较为敏感和特异的检测技术. 我们采用本法检测凋亡细胞. 取片固定前加作一步离心涂片, 再固定、染色, 结果于 SJ 作用 48 h 组, 镜下可见大量细胞核着棕黄色的凋亡细胞, 进一步证实了 SJ 可诱导 SMMC-7721 细胞凋亡的作用.

近年来, 关于中药抗癌作用及其机制的研究已成为抗肿瘤研究的新热点. 我们之所以研究复方中药 SJ 抗肿瘤作用及其机制, 主要是基于其长期可靠的临床疗效, 试图从复方整体角度出发, 在细胞和分子水平研究其抑癌作用及其机制, 虽有些以管窥豹之意, 但也可为 SJ 在临床治疗中的应用提供必要的理论依据, 并力图探索一条从相关性、整体性角度出发进行复方研究的新思路, 使富有哲理的中医理论具有现代科学内涵, 研制出疗效更为确切的抗癌新药.

4 参考文献

- 1 沈云芳, 庄蕙, 沈健伟, 陈士葆. 细胞凋亡与肿瘤. 世界华人消化杂志 1999;7:267-268
- 2 王炳元. 细胞凋亡与肝癌. 世界华人消化杂志 2002;10:425-427
- 3 刘丽娜. 细胞凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2002;10:422-423
- 4 梁卫江, 张万岱. 肿瘤坏死因子诱导细胞凋亡的信号传导机制. 世界华人消化杂志 2000;8:329-331
- 5 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
- 6 薛绪潮, 方国恩, 华积德. 胃癌与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:359-361
- 7 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
- 8 郭玉庆, 朱兆华, 黎锦芳. 流式细胞术分析胃癌及癌前病变中细胞凋亡与增生. 世界华人消化杂志 2000;8:983-987
- 9 王立生, 潘令嘉, 陈村龙, 李明松, 孙勇, 张亚历, 周殿元. 双歧杆菌对裸鼠移植大肠癌增生与凋亡的原位研究. 世界华人消化杂志 2000;8:429-431
- 10 王剑明, 邹倩, 邹声泉. Bcl-2 基因在阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡中作用的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:1035-1037
- 11 陈绪军, 艾中立, 刘志苏. 细胞凋亡 - 丝裂霉素致人肝细胞损伤机制的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:746-750
- 12 郭伟剑, 于尔辛, 郑颂国, 沈兆忠, 罗建明, 吴国华, 夏士安. 健脾理气药诱导人肝癌细胞 SMMC7721 凋亡的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:52-55
- 13 许岸高, 李韶光, 刘集鸿, 沈剑刚, 甘爱华. 黄参胶囊治疗胃癌的细胞凋亡及一氧化氮机制研究. 世界华人消化杂志 1999;7:364-365
- 14 杨璐璐, 秦兴卫, 杨倩. 桃耳七的研究现状及开发利用. 解放军药学报 2000;16:51-52
- 15 尚明英, 徐珞珊, 李萍, 徐国钧, 王侑先, 蔡少青. 鬼臼类中药及其木脂素类成分的药效学研究. 中草药 2002;33:722-723
- 16 齐社宁, 王镜. 4-[4''-(2'',2'',6'',6''-四甲基嘧啶氮氧自由基)氨基]-4'-去甲表鬼臼毒素诱导 Raji 肿瘤细胞凋亡的实验研究. 中国药理学通报 1999;15:187-188
- 17 陈再新, 马维勇, 王金娣, 陈秀华, 张椿年. 4-β-酯取代-4'-脱氧-4'-去甲表鬼臼毒素衍生物的合成及其抗肿瘤活性. 药学学报 2000;35:353-357

肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后PCNA和nm23-H1/NDPK的研究

冯 勇, 赵 玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉

冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 泰山医学院附属医院 山东省泰安市 271000

刘康达, 杨秉辉, 复旦大学中山医院 上海市 200032

冯勇, 男, 1962-10-16 生, 山东省新太市人, 汉族. 复旦大学医学院硕士研究生毕业, 副教授. 主要从事消化系统肿瘤研究.

项目负责人: 冯勇, 271000, 山东省泰安市泰山大街706号, 泰山医学院附属医院. yahwang@sina.com

电话: 0538-8415323

收稿日期: 2002-08-02 接受日期: 2002-08-16

Expression of PCNA and nm23-H1/NDPK in Hepatocellular Carcinoma following transcatheter arterial chemoembolization therapy

Yong Feng, Ling Zhao, Ai-Hua Zhang, Kang-Da Liu, Lai-Chun Liu, Yan-Hui Wang, Jin-Qiang Yin, Bing-Hui Yang

Yong Feng, Ling Zhao, Ai-Hua Zhang, Lai-Chun Liu, Yan-Hui Wang, Jin-Qiang Yin, Affiliated Hospital, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China

Kang-Da Liu, Bing-Hui Yang, Zhongshan Hospital, Fudan University, 200023 Shanghai City, China

Correspondence to: Dr. Yong Feng, Affiliated Hospital, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China. yahwang@sina.com

Received: 2002-08-02 Accepted: 2002-08-16

Abstract

AIM: To study the effect of transcatheter arterial Chemoembolization (TACE) on the proliferation and metastasis of the hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Seventy-two patients with inoperable huge HCC administered from 1992 to 2000 were treated with TACE initially, and then operated following the shrinkage of the tumor. During same periods of treatment, there were comparable 487 HCC patients who were not treated with TACE, of which 32 pairs of patients who met with the criteria were selected for this study based on the 10 items screening criteria including gender, age, history of the disease, BUS examination. Expression of proliferating of cell nuclear antigen (PCNA) and nm23-H1 were studied by immunohistochemistry.

RESULTS: PCNA label index (PCNA LI) of HCC following TACE was elevated. The distribution of PCNA LI in the range $\leq 25\%$, 26-50%, 51-75% and $> 75\%$ is 75%, 14.3%, 10.7% and 0% in control group, and 35.7%, 21.4%, 28.6% and 14.3%, in TACE group ($P < 0.01$, $n = 28$), respectively. The expression of nm23-H1 gene exists in both cytoplasm and nuclear with no significant difference between treatment and control group.

CONCLUSION: The proliferative activity of residual tumor

of HCC following TACE causes the elevation of PCNA LI implying the poor prognosis of long-term effect of TACE, and therefore, it is necessary to perform two stage-resection after TACE of HCC.

Feng Y, Zhao L, Zhang AH, Liu KD, Liu LC, Wang YH, Yin JQ, Yang BH. Expression of PCNA and nm23-H1/NDPK in Hepatocellular Carcinoma following transcatheter arterial chemoembolization therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):912-915

摘要

目的: 研究肝细胞癌肝动脉化疗栓塞(TACE)对肝肿瘤增生与转移的影响。

方法: 1992-07/2000-07不能手术切除的大肝癌经TACE治疗后, 肿瘤缩小, 而后二期手术切除, 本组共施使这类手术72例, 根据性别、年龄、既往史、肿瘤大小共计10项指标, 与同期未经TACE治疗, 直接手术切除的肝癌487例进行配对, 有32对进入本课题研究. 运用免疫组化技术, 对比研究了肝癌细胞中的细胞增生核抗原(PCNA), 和nm23-H1基因的表达。

结果: 肝癌经TACE治疗后PCNA的标记指数升高, PCNA标记指数 $\leq 25\%$ 、26-50%、51-75%、 $> 75\%$ 的对照组分别为75%、14.3%、10.7%、0%, TACE治疗组分别为35.7%、21.4%、28.6%、14.3%, ($P < 0.01$, $n = 28$). nm23-H1基因表达肝癌细胞与细胞核中均存在, 但治疗组与对照组无显著差异。

结论: 肝癌经TACE治疗后残留癌的反应性增生使PCNA标记指数升高, 导致TACE治疗肝癌远期疗效不理想, 所以肝癌TACE后二期手术很有必要。

冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉. 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后PCNA和nm23-H1/NDPK的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):912-915

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/912.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种严重威胁人类健康的消化系统常见恶性肿瘤^[1-10]. 恶性肿瘤的浸润和转移是区别于其他良性肿瘤的一个重要生物学特征, 同时也是一个与预后直接关系的因素, 是恶性肿瘤患者死亡的重要原因. 了解肿瘤浸润与转移的情况,

是临床医生对预后进行有效估计的关键. 因此, 本实验选择了 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 这两个与肿瘤浸润和转移有关的蛋白质为研究对象^[11-18]. 目的在于了解 HCC 经 TACE 治疗后, 对肿瘤生长和转移的影响, 为进一步治疗提供理论指导.

1 材料和方法

1.1 材料 1992-07/2000-07 不能手术切除的大肝癌 72 例, 经肝动脉化疗栓塞(TACE)治疗后肿瘤缩小, 得到了二次手术切除的机会, 与同期未经 TACE 治疗直接手术切除的 487 例进行配对. 配对原则: 性别相同; 年龄相差不超过 5 岁; 有无肝炎史一致, 肝炎病史相差不超过 5 a; 饮酒史分为: 无、偶饮、嗜酒三类, 分别对应一致. 持续时间相差不超过 5 a; 癌在左右肝叶的位置一致; 术前 B 超检查肿瘤的最大直径相差不超过 0.5 cm; TACE 前血清 HbsAg 与 AFP 的阳性结果一致; 有无肝硬化一致; 肝癌分化程度一致; 手术切除的方式一致. 共有 32 对患者符合上述要求. 根据上述配对的病理号, 调出相应的石蜡包埋的肿瘤组织蜡块. 制成 4 μm 的组织切片, 做为 PCNA 和 nm23/NDPK(H1)免疫组织化学的反应底物. PCNA 单抗为鼠抗人单克隆抗体 PC-10, Dako 公司产品. 兔抗人 nm23/NDPK(H1)为 Oncogene 公司产品, ABC Kit 为 Vector 公司产品.

1.2 方法 采用免疫组织化学染色, 细胞核呈棕色颗粒为阳性, 先在低倍镜下观察 PCNA 染色情况, 寻找染色较密者. 分布均匀区域, 随机取 5 个高倍镜视野(10 × 40), 计数 500 个细胞中 PCNA 阳性细胞核数, 平均每 100 个细胞中的阳性细胞核数为 PCNA 标记指数, 即: PCNA LI=[PCNA(+)细胞核/500 个细胞核] × 100%. 根据 PCNA 标记指数的大小, 将阳性患者分为 4 个等级: PCNA 标记指数 ≤ 25% 为(+), 26-50% 为(++), 51-75% 为(+++), > 75% 为(+++). nm23/NDPK 免疫组织化学 (1)按切片中细胞显色有无及深浅计分(A): 无显色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分. (2)按切片中显色细胞的比例评分(B): 1/3 以下癌细胞显色计 1 分, 1/3-2/3 的癌细胞显色计 2 分, 2/3 以上的癌细胞显色计 3 分. (3)每例肿瘤的积分=A × B, 依据积分的高低判断肿瘤的阳性结果: 积分为 0 阴性(-), 1-4 分为弱阳性(+), >4 分为强阳性(++). (4)细胞核阳性结果的判断依据下述标准: 连续 3 个高倍镜(10 × 40)视野中, 平均有 1-5 个细胞核显色阳性则为(+); 6-10 个为(++); 11-15 个为(+++); 超过 15 个为(+++), 少于一个为(-).

统计学处理 采用符号等级检验(Wilcoxon法).

2 结果

TACE 组 32 例肝癌患者中有 4 例由于肿瘤完全坏死, 病理切片中未找到癌细胞, 即将剩余的 28 例与相应的配对, 对比观察了其 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 免疫组化检测结果.

表 1 肝癌 PCNA、胞质 nm23-H1/NDPK、胞核 nm23-H1/NDPK 的检测结果 n(%)

组别	- (%)	+(%)	++ (%)	+++ (%)	++++ (%)	合计 (%)	
PCNA	TACE 组	10(35.7)	6(21.4)	8(28.6)	4(14.3)	28(100)	
	对照组	21(75)	4(14.3)	3(10.7)	0(0)	28(100)	
胞质	TACE 组	8(28.6)	14(50)	6(21.4)		28(100)	
	对照组	8(28.6)	13(46.4)	7(25)		28(100)	
胞核	TACE 组	9(32.1)	11(39.3)	6(21.4)	2(7.2)	0(0)	28(100)
	对照组	11(39.3)	6(21.4)	7(25)	3(10.7)	1(3.6)	28(100)

2.1 TACE 后肝癌 PCNA 的变化 治疗组与对照组肝癌 PCNA 的免疫组化检测结果存在有显著差异(表 1, P < 0.01), 两组患者肝癌的 PCNA 标记指数.

2.2 TACE 后肝癌胞质 nm23-H1/NDPK 的变化 治疗组与对照组肝癌胞质的 nm23-H1/NDPK 免疫组化阳性率都是 71.4%, (表 1), 经统计学处理 P > 0.05, 既肝癌经 TACE 治疗后细胞中 nm23-H1 的表达与对照组没有显著差异.

2.3 TACE 后肝癌细胞核 nm23-H1/NDPK 的变化 TACE 组肝癌细胞中有细胞核 nm23-H1/NDPK 免疫组化阳性者为 67.9%, 对照组为 60.7%, (表 1), 经统计学处理 P > 0.05, 两组肝癌 nm23-H1/NDPK 在细胞核中检测结果没有显著的差别.

3 讨论

细胞增生核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是聚积在 S 期在细胞核内复制的细胞周期依赖性蛋白, 是 DNA 多聚酶 δ 的辅助蛋白^[19]. 他的表达与合成和细胞增生有关, 参与了细胞增生过程中的 DNA 复制, 在细胞周期性控制中起着一定的作用^[20], 可反映细胞增生活性的高低. PCNA 在 G₁ 期开始增加, S 期达到高峰, G₂ 期下降, M 期降至最低, 并且与患者预后有关^[21-24]. 我们的结果显示, 肝癌经 TACE 治疗后残留癌的 PCNA 标记指数增高, 与对照组比较有显著差异, 我们认为可能与 TACE 治疗后残留癌中新生肿瘤细胞所占比例增大有关. 肝癌患者经 TACE 治疗后可发生程度不等的肿瘤坏死, 由于肝癌的血供至少 80% 来源于肝动脉^[25], 除了肝动脉外, 还有门静脉, 以及栓塞后新生血管的形成, 侧支循环的建立. 这主要是由于 TACE 治疗后使肿瘤缺氧、坏死, 缺氧与坏死组织又可刺激血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等的分泌, 促进了血管形成^[25]. 致使这种坏死不彻底, 在肿瘤边缘可或多或少地有残留癌存在, 他们仍能得到相应的血液供应, 而得以继续生存下去, 这个部位的肿瘤生长最活跃, 使 G₀ 期的细胞进入细胞分裂周期中, 处于 S 期的癌细胞增加, 即相应地 PCNA 表达量也增加. 所以, 肝癌患者经 TACE 治疗后肝癌缩小, 症状改善, 疗效是肯定的. 但如本研究所显示, 经 TACE 后肝癌细胞并不能被完全杀灭, 而残留癌细胞的增生与侵袭能力更强, 致使远期疗效并不理想, 这与其他文献报道是一致的^[26-28], 此点应引起临床医师的充分注意, 采取

积极的防治措施,不失时机地进行二步手术切除等。

nm23 基因是一种肿瘤抑制基因^[29-31],在肝癌的研究中也是如此^[32],他的表达主要存在于细胞质内,但在细胞核及细胞膜中也有表达,即分为胞型、核型与膜型,核型表达才是评价抑制肿瘤转移的有效指标.本实验既有胞型,又有核型,但没有明显的膜型表达发现,可能与抗体的来源不同有关.同时对比观察了 TACE 治疗组与对照组肿瘤的 nm23-H1 胞质型与核型的表达情况,发现这两型均没有差异($P > 0.05$),提示 TACE 治疗对肝癌组织中 nm23-H1 基因的表达基本上没有影响.这可能是由于肝癌 TACE 后到手术切除的时间较长,原来的 nm23-H1 产物 NDPK 已逐渐被代谢,同时也随着时间的推移 nm23-H1 基因的表达又恢复了原来的水平,所以就得到了上述结果.

目前 TACE 治疗肝癌远期疗效不够理想,主要原因在于残留癌存在导致的复发与转移. TACE 治疗后肝癌的转移主要见于肿瘤坏死不完全的患者,对于肿瘤完全坏死和并无坏死者则没有影响,原因是部分坏死的肿瘤中残留癌细胞附着力下降,易于脱落进入血液循环而发生转移.另外,没有经 TACE 治疗的肝癌患者,在肿瘤发生自发性不完全性坏死后,也同样发现发生转移的机会增加.还应注意, TACE 治疗不但促进了 VEGF 的分泌增加,使新生血管产生,侧支循环建立,同时 VEGF 还使小血管通透性增加,再加上肿瘤血管结构不完整,内皮细胞比较幼稚,细胞间常有裂隙,缺乏基底膜等,使肿瘤细胞易于进入血液循环发生转移^[33-35].因此,结合本研究结果可认为,肝癌经 TACE 治疗后发生转移的机会增加,这可能与肿瘤的不完全性坏死有关,还有 PCNA 含量的增加,而与 nm23-H1 基因的表达可能无关.因此,肝癌患者经 TACE 治疗后适时地进行二步手术切除是非常必要的,这与国内资料是完全一致的,不能手术切除的大肝癌经 TACE 治疗后,肿瘤缩小再二期切除,可明显改善患者的远期预后^[36,37].但是,对于可切除的肝癌术前进行 TACE 是不可取的^[38],因为 TACE 不但延误了手术时机,增加了手术难度,还可促进残留癌细胞的转移.

4 参考文献

- 1 Tang YW, Yao XX. Regulating effect of HCC cells on the activation of stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:202-204
- 2 Cui J, Yang DH, Qin HR. Mutation and clinical significance of c-fms oncogene in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:392-395
- 3 Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA, Zhang SZ. Construction and expression of anti-HCC immunotoxin of svf-TNF- α and GFP fusion proteins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:640-644
- 4 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression significance of HLA-DR antigen and heat shockprotein 70 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1139-1142
- 5 Su YH, Zhu SN, Lu SL, Gu YH. HCV genotypes expression in hepatocellular carcinoma by reverse transcription in situ polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:874-878

- 6 Zhai SH, Liu JB, Liu YM, Zhang LL, Du ZP. Expression of HBsAg, HCV-Ag and AFP in liver cirrhosis and hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:524-527
- 7 Fu JM, Yu XF, Shao YF. Telomerase and primary liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:461-463
- 8 Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- 9 Worman HJ, Lin F, Mamiya N, Mustacchia PJ. Molecular biology and the diagnosis and treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:185-191
- 10 He XX, Wang JL. The current status and prospect in the gene therapy of liver cancer. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:158-159
- 11 Liu HF, Liu WW, Fang DC. Study of the relationship between apoptosis and proliferation gastric carcinoma and its precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:649-651
- 12 Wynford-Thoms D. Cellular senescence and cancer. *J Pathol* 1999;187:100-111
- 13 Groeger AM, Caputi M, Esposito V, Baldi A, Rossiello R, Sanlini D, Mancini A, Kaiser HE, Baldi F. Expression of p21 in non small cell lung cancer relationship with PCNA. *Anticancer Res* 2000;20:3301-3305
- 14 Omar EA, Behloul H, Chevalier S, Aprikian AG. Relationship of p21(WAF-1) protein expression with prognosis in advanced prostate cancer treated by androgen ablation. *Prostate* 2001;49:191-199
- 15 Iizuka N, Tangoku A, Hayashi H, Yosino S, Abe T, Morioka T, Oka M. The association between nm23-H1 expression and survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 1999;138:139-144
- 16 Wang YK, Ma NX, Luo HL, Li Y, Wang L, Pan H, Zhang ZB. Relationship between p53, nm23 protein expression and lymphatic hyperlasia in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:34-36
- 17 Hennessy C, Henry JA, May FE, Westley BR, Angus B, Lennard TW. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: An association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:281-285
- 18 Zheng XY, Ling ZY, Tang ZY, Liu YK, Feng XL, Zhuang W. The abundance of NM23-H1 mRNA is related with in situ microenvironment and intrahepatic metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;3:17
- 19 Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA Polymerase-delta. *Nature* 1987;326:515-517
- 20 Gao MX, Zhang NZ, Ji CX. Estrogen receptor and PCNA in gastric carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1117-1120
- 21 叶晟,冯懿正,刘友富,袁政洪. P53, P21 及 nm23 和 PCNA 在原发肝癌中的表达与预后的关系. *世界华人消化杂志* 1999;7:160
- 22 申兴斌,赵晓明,胡建功,金小平,王军. 胃癌组织中细胞凋亡及 PCNA 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1050-1052
- 23 贾铃,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
- 24 胡沛臻,张传山,马福成,杨守京,王文亮. 肝细胞肝癌组织中 P21^{WAF1/CIP1} 与 PCNA 的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:145-148
- 25 戚跃勇,邹利光,卞修武. 肝癌的血管生成与肝动脉灌注化疗栓塞术. *世界华人消化杂志* 2002;10:960-965
- 26 Chan AO, Yuen MF, Hui CK, Tso WK, Lai CL. A prospective study regarding the complications of transcatheter intraarterial lipiodol chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:1747-1752
- 27 Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:1164-1171
- 28 Lee K, Chung YH, Song BC, Shin JW, Choi WB, Yang SH, Yoon HK, Sung KB, Lee YS, Suh DJ. Recurrences of hepatocellular carcinoma following initial remission by transcatheter arterial chemoembolization. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:52-58

- 29 谷化平,倪灿荣,瞻熔洲. 大肠癌 CD15,CD44V6 和 nm23-H1 的 mRNA 表达与转移及预后的相关性. *世界华人消化杂志* 2000;8:887-891
- 30 Hartsough MT, Clare SE, Mair M, Elahloun AG, Sgroi D, Osbone CK, Clark G, Steeg PS. Elevation of breast carcinoma Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression and reduced motility by DNA methylation inhibition. *Cancer Res* 2001;61:2320-2327
- 31 Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Wijffels K, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken JH. Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol* 2001;149:298-302
- 32 郑建勇,李开宗,窦科峰,李江. 肝细胞癌 P53 及 nm23 H1 mRNA 表达的意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:40-42
- 33 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 34 Song BC, Chung YH, Kim JA, Lee HC, Yoon HK, Sung KB, Yang SH, Yoo K, Lee YS, Suh DJ. Association between insulin-like growth factor-2 and metastases after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Cancer* 2001;91:2386-2391
- 35 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, ELson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000;60:4010-4015
- 36 汤钊猷. 中国肝癌临床研究进展. *世界华人消化杂志* 1998;6:1013-1016
- 37 吴孟超. 我国肝脏外科研究回顾. *世界华人消化杂志* 2000;8:1201-1204
- 38 罗运权,王义,陈汉,吴孟超. 术前肝动脉化疗栓塞对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

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杂志 43 种, 其中包括 WJG®. WJG®由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席.53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG®的合作伙伴.WJG®被美国《医学索引》(*Index Medicus* /MEDLINE)、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录.国内被中国科学引文索引,中国科技论文统计与分析,世界消化学网数据库,国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊.WJG®, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊.中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知.按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种,“双奖”期刊 58 种,“双百”期刊 122 种,“双效”期刊 496 种. WJG® 在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG®总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268.WJG®2003 年月刊, 大 16 开, 256 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261.E-mail: wjg@wjgnet.com <http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

TDI-FP法分析肝细胞癌组织中HBV核心启动子双突变

吕贵廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君

吕贵廷, 白玉杰, 张剑, 阎小君, 中国人民解放军第四军医大学全军基因诊断技术应用研究所 陕西省西安市 710032

卢冰, 九江市卫生防疫站 江西省九江市 332000

吕贵廷, 男, 1978-03-28, 河南省许昌人, 汉族, 2000年河南师范大学生命科学学院毕业, 现为第四军医大学全军基因诊断技术应用研究所生物化学与分子生物学专业硕士研究生。

项目负责人: 阎小君, 710032, 陕西省西安市长乐西路17号, 中国人民解放军第四军医大学全军基因诊断技术应用研究所。

电话: 029-3374771

收稿日期: 2002-08-17 接受日期: 2002-09-12

Paired mutation in core promoter region of HBV in hepatocellular carcinoma by TDI-FP assay

Guan-Ting Lü, Bing Lu, Yu-Jie Bai, Jian Zhang, Xiao-Jun Yan

Guan-Ting Lü, Yu-Jie Bai, Jian Zhang, Xiao-Jun Yan, The Institute of Genetic Diagnosis, PLA, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaan'xi Province, China

Bing Lu, Sanitation and Anti-epidemic Station, Jiu Jiang 332000, Jiang'xi Province, China

Correspondence to: Xiao-Jun Yan, the Institute of Genetic Diagnosis, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaan'xi Province, China. yanxj@37c.com.cn

Received: 2002-08-17 Accepted: 2002-09-12

Abstract

AIM: To detect the A₁₇₆₂T and G₁₇₆₄A paired mutations in the core promoter region of the HBV DNA in the hepatocellular carcinoma, to investigate the relationship between them, and to establish a new method for genotyping of mutation patterns.

METHODS: The target DNA fragment of the HBV core promoter region which contains the paired mutations was amplified by polymerase chain reaction and the FP value of the R110- or TAMRA-labeled ddNTP was detected by TDI-FP assay to determine the nt1762 and nt1764 genotype.

RESULTS: Of 20 cases of hepatocellular carcinoma, 18 (90%) was positive for HBV infection. Through TDI-FP assay, there were 13/20 for T₁₇₆₂ and A₁₇₆₄ paired mutations, 1/20 heterozygous for T₁₇₆₂-A₁₇₆₄/A₁₇₆₂-G₁₇₆₄, 4/20 negative for the TDI-FP assay. By sequencing, the positive and heterozygous mutations completely accorded with the TDI-FP assay. In the negative results, 2/4 had 8-nucleotide deletion mutation, thus the mutation detection primer could not complement with the template and gave rise to the "false" negative results. The rate of T₁₇₆₂-A₁₇₆₄ positive mutation rate of HBV DNA in hepatocellular carcinoma was 85%, heterozygous 5%, and wild-type 10%.

CONCLUSION: The HBV infection is very high in the hepatocellular carcinoma. The great frequency of the paired mutations in the core promoter indicates that the paired mutations may be significantly related to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. The established TDI-FP is

suitable for high throughput and automated genotyping assays due to its rapid and simple manipulation.

Lü GT, Lu B, Bai YJ, Zhang J, Yan XJ. Paired mutation in core promoter region of HBV in hepatocellular carcinoma by TDI-FP assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):916-919

摘要

目的: 通过TDI-FP法检测肝细胞癌组织中HBV DNA核心启动子区A₁₇₆₂T和G₁₇₆₄A双突变并分析二者之间的相关性, 同时建立一种新的突变检测方法。

方法: 以20例肝细胞癌组织为研究标本, 通过PCR扩增含有HBV DNA核心启动子区的DNA片段, 然后用TDI-FP法检测R110或TAMRA标记ddNTP的FP值, 鉴定nt1762和nt1764的基因型。

结果: 20例肝细胞癌组织中经HBV检测试剂盒鉴定后, 18例为HBV感染阳性, 阳性率为90%。经TDI-FP检测, 其中有13例为T₁₇₆₂和A₁₇₆₄双突变型, 1例为T₁₇₆₂-A₁₇₆₄/A₁₇₆₂-G₁₇₆₄突变杂合型, 4例检测结果为阴性。经测序, 阳性结果及突变杂合型与TDI-FP结果完全吻合, 阴性结果中2例在nt1762前有8个核苷酸缺失突变, 导致突变检测引物无法与模板结合, 故产生TDI-FP检测出现假阴性结果。在肝细胞癌组织HBV DNA中, T₁₇₆₂-A₁₇₆₄突变阳性率为75%, 突变杂合型为5%, 野生型为10%。

结论: 在肝细胞癌组织中, HBV感染率非常高, 而且其核心启动子区出现nt1762和nt1764双突变率较高, 提示双突变与肝细胞癌关系密切; 同时本实验所建立的TDI-FP法操作快速简便, 可以进行高通量自动化操作, 具有进一步推广应用的前景。

吕贵廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君. TDI-FP法分析肝细胞癌组织中HBV核心启动子双突变. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):916-919

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/916.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染已经成为影响人们健康的主要威胁^[1,2], 目前全世界大约有3亿5千万人为乙型肝炎病毒携带者^[1]。我国在世界上属于HBV感染的高发区, HBsAg阳性携带者约占总人口的10%^[3-5], HBV感染和许多肝脏疾病有关, 如急性肝炎、爆发性肝炎、无症状携带、慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等^[1,6,7], 而且越来越

多的证据表明, HBV 还能够感染外周血单个核细胞, 与淋巴系统疾病有关, 诸如非霍奇金淋巴瘤^[8]. 研究表明, 乙肝病毒感染是肝细胞癌的主要致病因素^[9]. 在 HBV 感染高发区, 二者的关系尤为显著^[10]. 乙肝病毒突变率很高, 大约每年在 2×10 个碱基中就有一个被置换^[11]. 其中最重要、最常见的是在核心启动子(core promoter, CP)第二个 AT 丰富区的 A₁₇₆₂ T 和 G₁₇₆₄ A 突变, 二者经常同时出现, 与肝脏疾病关系如肝细胞癌较为密切^[12-14]. 双突变可以减少 HBeAg 的分泌, 却又可以增加病毒前基因组的复制^[15,16]. HBV DNA 的双突变对其致癌机制的研究具有重要意义.

本研究采用 TDI-FP(template-directed dye-terminator incorporation with fluorescence polarization, TDI-FP)^[17] 的方法来分析肝细胞癌组织中 HBV 的双突变基因型, 他简便易行, 可以实现高通量和自动化操作, 为进一步研究 HBV DNA 的突变及基因型与临床意义建立方法学基础.

1 材料和方法

1.1 材料

由第四军医大学第一附属医院肝胆外科和第二附属医院传染科提供 20 例肝细胞癌组织(经第四军医大学病理科作病理切片鉴定), 其中男性 9 例, 女性 11 例. wallac VICTOR²_{TM} 1 420 multilabel counter, 480 nm/30、535 nm/40、544nm/15、595AF60 滤光片(PerkinElmer Life Sciences); MJ Research V2.0 384 微孔板(MJ Research); Techgene PCR Amplifier (Techne); Taq DNA 聚合酶(Takara); Wizard[®] Plus Minipreps DNA purification System, Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System pGEM[®] T-easy Vector (Promega); AcycloPrime[™]-FP SNP Detection Kit (PerkinElmer Life Sciences); HBV DNA Detection Kit (Takara); 所用引物由上海生工公司合成, 其序列见下表:

引物	序列(5'→3')	位置(bp)	长度
P1	5' -GGTCAACGACCTGGATTGAG-3'	1 681-1 700	
P2	5' -GGCAGAGGTGAAAAAGTTGC-3'	1 818-1 835	155 bp
P ₁₇₆₂	5' -GAGTCGGGGGAGGAGCTGAGGTTAA-3'	1 737-1 761	
P ₁₇₆₄	5' -GTCGGGGGAGGAGCTGAGGTTAAAG-3'	1 739-1 763	

HBV DNA PCR 扩增引物 P1、P2 和突变检测引物 P₁₇₆₂、P₁₇₆₄.

1.2 方法

1.2.1 肝细胞癌组织的处理及 HBV 鉴定

取 5 g 组织于 1 mL 生理盐水中, 反复冻融 5 次, 然后研磨成匀浆, 10 000 rpm 离心 10 min, 取上清, 加 EDTA(PH8.0)、蛋白酶 K 和 SDS 至终浓度分别为 0.1 mmol/L、1 % 和 150 μg/mL, 37 °C 孵育 20 h, 加入 RNase 至终浓度为 20 μg/mL, 37 °C 继续孵育 1 h. 加等体积酚 - 氯仿 - 异戊醇(25 : 24 : 1), 混匀, 14 000 rpm 离心 10 min; 重复抽提 1 次, 加入 1/3 体积的乙酸钠(3 mol/L)和 2 倍

体积的冷无水乙醇, 14 000 rpm 离心 5 min, 弃上清; 70 % 洗涤沉淀, 晾干后, 用 100 μL TE 溶解. 用 HBV 检测试剂盒对所提取的 HBV DNA S 基因进行巢式 PCR (nested PCR) 鉴定 HBV.

1.2.2 目的片断的 PCR 扩增

取 2 μL 做 PCR 模板, 反应体系为: MgCl₂、dNTPs (10 mM) 和 10×Buffer 各 2.5 μL, P1 和 P2 各 1 μL, Taq DNA 聚合酶 1 U, 加水补足 25 μL. 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 然后 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 min, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min. 取 5 μL PCR 扩增产物在 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色.

1.2.3 TDI-FP 检测 HBV A₁₇₆₂ → T 和 G₁₇₆₄ → A 突变

MJ Research V2.0 384 微孔板每孔加入 5 μL PCR 扩增产物 (50-500 fmol/5 μL), 然后加入 2 μL 1×PCR 消化酶(核酸外切酶 I 和虾碱性磷酸酶), 37 °C 反应 1 h, 清除游离的 PCR 引物 P1 和 P2 及 dNTPs; 80 °C 水浴 15 min, 失活 PCR 消化酶. 随后每孔加入 13 μL AcycloPrime-FP 混合物(AcycloPol 聚合酶 0.05 μL, 10× 反应缓冲液 2 μL, R110-ddATP 和 TAMRA-ddTTP 混合液 1 μL, P₁₇₆₂ 0.5 μL, 加水补足 13 μL). 在检测 G₁₇₆₄A 突变时, 操作步骤同前, 只是所加的荧光素标记的 ddNTP 及引物不同, 他们为 R110-ddGTP、TAMRA-ddATP 和 P₁₇₆₄. 然后把微孔板置于热循环仪, 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 15s, 63 °C 30 s, 共 25 个循环; 室温 15 min. 微孔板在 wallac 1 420 VICTOR²_{TM} 1 420 multilabel counter 上分别检测 R110 和 TAMRA 的 FP 值.

1.2.4 PCR 扩增产物的克隆及测序

取 3 μL 胶回收的 PCR 扩增产物与 pGEM[®] T-easy 载体连接, 4 °C 过夜; 按常规方法转化 E. Coli DH5 α 感受态细菌, 加入 20 mL LB 培养基 37 °C 快速振荡至 A=0.6. 提取质粒 DNA, 用 EcoR I 酶切及 PCR 扩增鉴定. 另取 20 μL 送上海基康公司进行测序鉴定.

2 结果

2.1 提取的基因组 DNA 经 HBV 鉴定试剂盒检测

20 例肝细胞癌患者中有 18 例为 HBV 感染阳性, 2 例为阴性; HBV 感染阳性率 90 %.

2.2 TDI-FP 检测

20 例肝细胞癌组织扩增的含核心启动子区的 PCR 产物经 TDI-FP 检测后发现, 有 13 例为 T₁₇₆₂ 突变型, 1 例为 T₁₇₆₂/A₁₇₆₂ 突变杂合型, 2 例为 A₁₇₆₂ 野生型, 4 例检测结果为阴性(包括 2 例 HBV 感染阴性组织); 13 例为 A₁₇₆₄ 突变型, 1 例为 A₁₇₆₄/G₁₇₆₄ 突变杂合型, 2 例 G₁₇₆₄ 野生型, 4 例检测结果为阴性(包括 2 例 HBV 感染阴性组织). 经分析, 有 13 例肝细胞癌组织 HBV 出现 T₁₇₆₂ 和 A₁₇₆₄ 双突变; 1 例出现 T₁₇₆₂-A₁₇₆₄/A₁₇₆₂-G₁₇₆₄ 杂合型; 2 例肝细胞癌组织中无 HBV 检测, 故双突变检测为阴性; 还有 2 例 HBV DNA 感染阳性组织检测结果也为阴性, 原因未明.

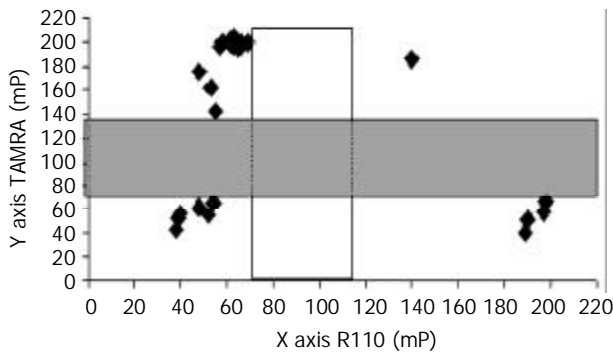


图1 A₁₇₆₂ → T突变的TDI-FP检测结果.所用ddNTP为R110-ddATP和TAMRA-ddTTP,左上角为T/T纯合子区,右上角为T/A杂合子区,左下角为阴性对照及PCR失败样本区,右下角为A/A纯合子区(阴性对照的mP值分别为R110 38.0、TAMRA 42.0和R11039.0、TAMRA 52.0;阳性对照的mP值分别为R110 197.0、TAMRA 57.0和R110 198.0、TAMRA 66.0).

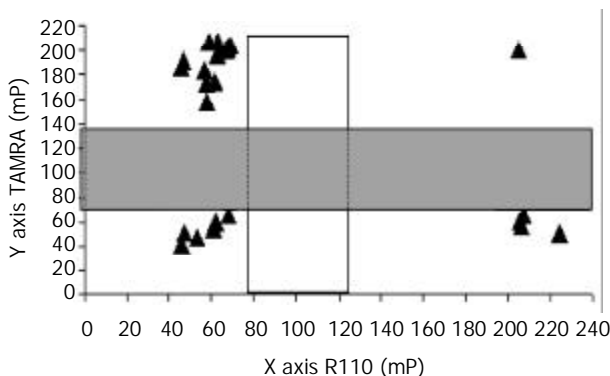


图2 G₁₇₆₄ → A突变的TDI-FP检测结果.所用ddNTP为R110-ddGTP和TAMRA-ddATP,左上角为A/A纯合子区,右上角为A/G杂合子区,左下角为阴性对照及PCR失败样本区,右下角为G/G纯合子区(阴性对照的mP值分别为R110 38.0、TAMRA 42.0和R11039.0、TAMRA 52.0;阳性对照的mP值分别为R110 197.0、TAMRA 57.0和R110 198.0、TAMRA 66.0).

2.3 测序分析 含核心启动子区的PCR产物与pGEM[®]T-easy载体重组克隆扩增后,送上海基康公司测序,测序结果显示,TDI-FP检测的13例T₁₇₆₂-A₁₇₆₄突变型及1例T₁₇₆₂-A₁₇₆₄/A₁₇₆₂-G₁₇₆₄杂合型与测序结果完全吻合.2例TDI-FP检测为阴性的HBV DNA阳性组织在双突变位点前有8个核苷酸缺失突变,突变检测引物无法与模板结合,荧光素标记ddNTP无法加入而出现“假”阴性结果.如果在突变位点设计正向和反向引物,就可以提高检测的敏感性,避免“假”阴性的产生.20例肝细胞癌组织中,T₁₇₆₂-A₁₇₆₄突变型共15例,其频率为75%;T₁₇₆₂-A₁₇₆₄/A₁₇₆₂-G₁₇₆₄杂合型为5%;野生型为10%.

3 讨论

乙肝病毒是目前已知的可感染人体的最小的双链DNA病毒,他以其前基因组RNA(pregenomic RNA)为模板进行逆转录反应而复制^[18].HBV因复制过程的特殊性,他的自发突变率超过其他DNA病毒约4个数量级,在过去的10多年中,有关HBV突变临床意义的研究一直是热点之一^[19].近10a来,一些国家男性人群中肝细胞癌的发生呈上升趋势,在中国,自1990年以来,肝细胞癌已经成为第二位致死性癌症^[20, 21].肝细胞癌发生

中,HBV的感染是一个非常重要的病因^[22-24],并在流行病学、免疫病理学和分子病理学等方面得到证实^[23,25].但其致癌机制却不太清楚.许多学者通过研究HBV DNA和宿主细胞染色体DNA的整合情况,希望能找到有价值的线索,目前他们已从人、土拨鼠、地松鼠和鸭的肝细胞癌组织染色体DNA中发现整合有HBV DNA,但是这种整合是多发的和非特异的,而且常常出现病毒和宿主染色体DNA的缺失和重排.乙肝病毒核心启动子调控Pre-C RNA和C RNA的转录,有研究表明,慢性乙肝感染患者HBV DNA的核心启动子区常常出现A₁₇₆₂ → T和G₁₇₆₄ → A双突变^[26,27].在HBV感染高发的国家里,绝大多数的肝细胞癌发生于HBV携带者中,并且在肝细胞癌HBV DNA中,核心启动子发生双突变的频率非常高^[28].Edward Tabor et al发现江苏省启东县原发性肝细胞癌组织中85%有HBV T₁₇₆₂和A₁₇₆₄双突变序列,同样的突变序列在慢性乙肝病毒感染者(非肝癌患者)中仅为11%.HBV DNA核心启动子区出现T₁₇₆₂和A₁₇₆₄双突变,使核受体结合位点转换为肝细胞核转录因子-1(hepatocyte nuclear factor-1, HNF-1)的结合位点,并且特异性地抑制了Pre-C RNA的转录.双突变还使得与其重叠的X蛋白编码区的两个密码子发生改变.有研究证明,突变的X蛋白X(mt)和野生型X蛋白都有增强基因活化和加强HNF-1的DNA结合活性.而少量的X(mt)是基因活化和HNF-1 DNA结合活性所需要的^[26].X蛋白可激活HNF-1,使其从胞质转位到胞核,与其结合位点结合^[29].由于HBV复制增强,HBeAg表达降低,宿主的免疫清除能力减弱,导致宿主体内的HBV DNA有更多的机会整合到细胞染色体DNA上,他们随染色体的复制而复制,是细胞染色体DNA发生突变的机率增大,当达到一定程度时,就会导致肝细胞癌的发生.

本研究所采用的TDI-FP是TDI法(微测序(minisequencing),单核苷酸掺入法(single base incorporation),引物延伸法(priming extension))的进一步发展和完善,他以FP为检测手段的.当荧光素分子被平面偏振光激发时,他就在固定的平面发射出与其分子量成正比的偏振荧光(polarized fluorescence)^[30,31],这种现象称为荧光偏振(fluorescence polarization, FP).如果荧光素分子量较小,在溶液中自由旋转的速度较快,他会向各个方向发出发射光,荧光偏振不能保持.可是当荧光素分子量较大,旋转速度就会减慢,于是在特定时间内向同一方向发出发射光,荧光偏振就保持下来.荧光偏振作为一种检测工具可以用来分析蛋白-蛋白、蛋白-多肽、蛋白质-DNA和其他种类的分子间相互作用^[32].在单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分型方面,FP已经得到广泛应用^[33],如TDI-FP、FP-Taqman[®]和FP-Invader等.其中FP-TDI是最具前景的分析方法,在DNA聚合酶催化下,3'端紧临突变位点的引物加入一个与模板互补的荧光素标记的

ddNTP, 使得荧光素的分子量增大许多倍, 通过检测荧光素分子的 FP(单位为 mP), 可以知道加入的 ddNTP 的种类, 根据互补原理推断出突变位点核苷酸的类型.

TDI-FP 法的所有反应可以在同一个反应体系(如 MJ Research V2.0 384 微孔板)内分 4 步完成: (1) PCR 扩增含有突变位点的目的 DNA 片断; (2) 消化酶清除多余的引物和游离 dNTPs, 避免其干扰随后的引物延伸反应; (3) 加热失活消化酶; (4) 加入 DNA 聚合酶、检测突变引物和荧光素标记的 ddNTPs, 在热循环仪上进行引物延伸反应. 反应结束后, 把微孔板置于 FP 阅读仪上检测荧光素分子的 FP^[30]. TID-FP 法具有以下优点: (1) 仅需要热循环仪和可以做 FP 检测的仪器, 这些都非常的便宜, 一般的实验室都可以承担; (2) 不需要特别修饰的引物和试剂, 花费较低^[34-36]; (3) 该法非常容易优化; (4) FP-TDI 分析以 FP 作为检测手段, 后者与荧光强度无关, 因此不需要把游离的荧光素标记双脱氧核苷酸从体系中分离^[30].

由于 TDI-FP 法具有非常高的特异性和敏感性, 而且操作简便, 可以实现自动化和高通量检测, 在研究病原微生物基因突变、单核苷酸多态性、药物基因组学等方面具有广阔的应用前景.

4 参考文献

- Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000; 33:998-1002
- Yan JC, Chen WB, Ma Y, Liu JH, Sun XH, Xu CJ. The study of the vascular diseases tissue and immunohistochemistry of HBV infected liver tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1205-1210
- Fang JN, Jin CJ, Cui LH, Quan ZY, Choi BY, Ki M, Park HB. A comparative study on serologic profiles of virus hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:107-110
- Yan JC, Ma JY, Pan BR, Ma LS. The study of viral hepatitis B in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:611-616
- 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
- Wu J, Cheng ML, Ding YS, Liu RC, Li J, Wang WL, Hu L. Five year following-up surver of risk factor of virus hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1365-1367
- Chen J. The molecular biochemistry study of pathogenesis of chronic viral hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:125-128
- Li RL, Xu DZ, Nie QH, Yan YP, Zhang JX. Role of hepatitis virus infection in pathogenesis of B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:406-410
- 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
- Huang YX, Wu GH. The relationship between hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:682-685
- Kreutz C. Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses. *J Cell Mol Med* 2002;6:113-143
- Yap SF, Wong PW, Chen YC, Rosmawati M. The frequency of pre-core gene mutations in chronic hepatitis B infection: a study of Malaysian subjects. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002;33:102-109
- Ogawa M, Hasegawa K, Naritomi T, Torii N, Hayashi N. Clinical features and viral sequences of various genotypes of hepatitis B virus compared among patients with acute hepatitis B. *Hepatol Res* 2002;23:167-177
- Hannoun C, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 1):75-83
- Ha-Lee YM, Lee J, Pyun H, Sohn J, Cho YJ, Kim Y. Sequence variations of hepatitis B virus promoter regions in persistently infected patients. *Arch Virol* 2001;146:279-292
- Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C, Maisonnas M, Treppe C, Zoulim F. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol* 2000;33:430-439
- Akula N, Chen YS, Hennessy K, Schulze TG, Singh G, McMahon FJ. Utility and accuracy of template-directed dye-terminator incorporation with fluorescence-polarization detection for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Biotechniques* 2002;32:1072-1076
- Bartholomeusz A, Locarnini S. Hepatitis B virus mutants and fulminant hepatitis B: fitness plus phenotype. *Hepatology* 2001; 34:432-435
- Lan L, Wang YM. The influence of the genetic heterogeneity of HBV on the Interferon responsibility. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:696-698
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- Shao XD, Wu KC, Guo XZ, Xu JH, Guo CC, Meng FP, Fan DM. Studies on expr ession of KAI1 gene in tissues of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1238-1241
- Chen WN, Oon CJ. Mutations and deletions in core promoter and precore stop codon in relation to viral replication and liver damage in Singaporean hepatitis B virus carriers. *Eur J Clin Invest* 2000;30:787-792
- Zhang WH, Zhu SN, Lu SL, Cong WM, Wu MC. HBV concomitant infection in HCV associated HCC. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:175-177
- Reid AE, Liang TJ. Association of hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in the United States. *Princess Takamatsu Symp* 1995;25:41-49
- 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
- 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
- Lin CL, Liao LY, Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Hepatitis B genotypes and precore/basal core promoter mutants in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2002;37:283-287
- Lin X, Qian GS, Lu PX, Wu L, Wen YM. Full-length genomic analysis of hepatitis B virus isolates in a patient progressing from hepatitis to hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2001; 64:299-304
- Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- Kwok PY. SNP genotyping with fluorescence polarization detection. *Hum Mutat* 2002;19:315-323
- Hsu TM, Chen X, Duan S, Miller RD, Kwok PY. Universal SNP genotyping assay with fluorescence polarization detection. *Biotechniques* 2001;31:560-568
- Tencza SB, Islam KR, Kalia V, Nasir MS, Jolley ME, Montelaro RC. Development of a fluorescence polarization-based diagnostic assay for equine infectious anemia virus. *J Clin Microbiol* 2000;38:1854-1859
- Kricka LJ. Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays. *Ann Clin Biochem* 2002;39(Pt 2):114-129
- Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:235-258
- Nielsen K, Gall D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *J Immunoassay Immunochem* 2001; 22:183-201
- Brennan MD. High throughput genotyping technologies for pharmacogenomics. *Am J Pharmacog* 2001;1:295-302

基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因

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
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学系, 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, 教授, 主任医师. 现任中华医学会传染病与寄生虫学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫学分会全国常委、全军医学科学技术委员会传染病与寄生虫学分会委员. 目前从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作, 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, 已出版专著 5 部, 发表论文及综述 300 篇.
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: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Screening and identification of genes transactivated by hepatitis B virus X protein by microarray assay

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

Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Jian-Jun Wang, Qian Yang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing, 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: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: Hepatitis B virus X protein (HBxAg) is a strong transactivator implicating in the transformation of normal hepatocyte and carcinogenesis. To understand the molecular mechanism of HBxAg in the up- and down-regulated genes of hepatocyte, we conducted microarray assay.

METHODS: The coding sequence of HBxAg was amplified by polymerase chain reaction (PCR) by using pCP10 containing the full length HBV genome DNA as the template. The expression of HBxAg in the transfected HepG2 cells was confirmed by Western blot methods. Total mRNA was isolated from the transfected HepG2 cells with pcDNA3.1 (-) and pcDNA3-HBxAg, respectively. cDNA was prepared by reverse transcription. Microarray was conducted for screening of up- and down-regulated genes of both HepG2 cells.

RESULTS: The expressive vector of pcDNA3-HBxAg has been constructed and confirmed by restriction enzyme digestion

and DNA sequencing. The expression of HBxAg has been confirmed by Western blot analysis. After screening with DNA microarray, we found 16 genes have been up-regulated, and 58 genes have been down-regulated.

CONCLUSION: The HBxAg is a very strong transactivator. Microarray is an important choice for the analysis of target genes of HBxAg transactivation.

Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang JJ, Yang Q. Screening and identification of genes transactivated by hepatitis B virus X protein by microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):920-924

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)基因组编码的HBxAg是一种很强的反式激活(transactivation)病毒蛋白, 在正常肝细胞的恶性转化(transformation)以及肝细胞癌(HCC)的形成过程中具有十分重要的作用. 为了阐明HBxAg的表达对于肝细胞基因表达谱的影响, 我们应用基因芯片技术, 对于转染和未转染的HepG2细胞进行了分析.

方法: 以含有全长乙型肝炎病毒基因的pCP10质粒作为模板, 应用聚合酶链反应技术(PCR)扩增的HBxAg基因片段, 常规分子生物学技术构建HBxAg的真核表达载体pcDNA3-HBxAg, 利用脂质体转染技术转染HepG2细胞, HBxAg蛋白的表达以Western blot杂交技术证实. 从转染和非转染细胞HepG2中提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 并进行基因芯片技术分析.

结果: 经过限制性内切酶分析和序列测定, 证实pcDNA3-HBxAg构建正确. HBxAg在HepG2细胞中的表达以Western blot杂交技术得到证实. 对于HBxAg重组表达载体和空白载体转染的HepG2细胞的基因表达谱, 利用基因芯片技术进行分析. 结果表明, 16种基因的表达水平上调, 58种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导等基因, 相信这些类型的基因在HBxAg的恶性转化中具有十分重要的作用.

结论: HBxAg是一种病毒反式激活蛋白, 对于肝细胞基因表达谱有显著影响; 基因芯片技术是分析病毒反式激活蛋白反式调节基因表达谱的重要技术途径.

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):920-924
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/920.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝 DNA 病毒, 长期的临床观察和广泛的流行病学调查结果表明, HBV 感染与肝细胞癌(HCC, hepatocellular carcinoma)的发生、发展密切相关, 但是关于 HBV 感染引起 HCC 的机制, 虽然已经积累了大量的资料, 但是目前还没有定论^[1-10]. HBV 感染引起 HCC 的机制, 部分通过 HBV DNA 与肝细胞基因组 DNA 之间的整合, 造成肝细胞染色体的不稳定性, 甚至是染色体的异常转位, 整合位点病毒的基因启动子强制性地激活肝细胞生长的相关基因, 造成 HBV 感染肝细胞的过度生长^[11-20]. HBV 感染的肝细胞成为机体免疫系统识别与攻击的对象, 肝脏炎症的长期存在, 造成肝细胞坏死与再生持续存在, HBV 的感染, 导致肝细胞对于环境中的致癌因素, 如黄曲霉毒素(aflatoxin)等作用的敏感性提高, 造成肝细胞的基因突变, 基因突变的不断积累, 在一定条件下发生 HCC, 这一过程十分漫长, 这也与临床上长期受到 HBV 感染的患者, 很多年之后才发生 HCC 的现象是一致的^[21-30]. 近年来, 随着分子生物学技术和理论的应用, 人们认识到 HBV 感染引起的 HCC, 与 HBV 基因组编码的具有反式激活作用的病毒蛋白的反式激活作用有关^[31-40]. 这种反式激活作用具有双重含义, 对于癌基因的激活, 以及对于抑癌基因的抑制. 近年来由于差异表达技术以及微矩阵(microarray)技术的应用, 对于各种肝炎病毒的结构和非结构蛋白反式激活的靶基因进行了筛选鉴定, 获得了大量有参考价值的资料, 但是还需要更为广泛深入的研究^[41-50]. 我们应用基因表达谱芯片技术, 对于 HBV 的 HBxAg 表达反式调节的靶基因进行筛选鉴定, 试图寻找 HBV 感染时, HBxAg 对于肝细胞基因表达谱的影响, 探索 HCC 发生的分子生物学机制.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 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).

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 HBV HBxAg 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-HBxAg 为本室构建^[25]. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-HBxAg 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 HBxAg 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

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

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

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

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

2 结果

2.1 HBV HBxAg 蛋白的表达载体构建 HBV HBxAg 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-HBxAg 由本室构建^[2].

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀>1.89, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 HBV HBxAg 蛋白上调基因类型 (表 1).

表 1 HBV HBxAg 蛋白上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	2.047	组氨 N- 甲基转移酶(HNMT)
2	2.052	RET 指状蛋白样蛋白 1
3	2.071	蛋白激酶 cAMP 依赖性调节 II 型 β(PRKAR2B)
3	2.079	钠通道 VI 型 α 多肽(SCN6A)
4	2.114	EGF 受体(EGFR)
5	2.136	钾离子内流通道亚家族 J 成员 3(KCNJ3)
6	2.141	IV 型胶原 α 5(COL4A5)
7	2.181	p53 结合蛋白 MDM4
8	2.218	果蝇花生样蛋白 2(PNUTL2)
9	2.232	细胞色素 C 氧化酶亚单位 VIII(COX8)
10	2.329	FKBP 相关蛋白(FAP48)
11	2.338	丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 3(MAP4K3)
12	2.471	鸟苷酸环化酶 1β 3(GUCY1B3)
13	2.591	促胸腺生成素(TMPO)
14	2.741	肌管蛋白相关蛋白 6
15	2.888	推定蛋白 FLJ11806
16	3.290	S100 钙结合蛋白 A11(S100A11)

2.4 HBV HBxAg 蛋白下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCV NS3 蛋白得下调基因. 在本研究中发现有 34 种基因的表达水平下调(表 2).

表 2 HBV HBxAg 蛋白下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.201	硫氧还蛋白还原酶(TXNRD1)
2	0.245	酵母 RAD23 基因同源基因 A(RAD23A)
3	0.250	酵母线粒体内膜转位酶 17 同源基因 B(TIM17B)
3	0.259	TNF 受体超家族成员 5(TNFRSF5)
4	0.262	蛋白磷酸酶 2A α 型(PPP2R1A)
5	0.273	prosaposin(PSAP)
6	0.286	S- 腺苷同型半胱氨酸羟化酶(AHCY)
7	0.288	脚手架黏附因子 B(SAFB)
8	0.297	细胞色素 P450 超家族 XXVIII(CYP27A1)
9	0.300	MGC15351
10	0.303	死亡相关蛋白 3(DAD3)
11	0.305	推定蛋白 FLJ20500
12	0.314	细胞膜糖蛋白(GP110)
13	0.319	热休克蛋白 70A1(HSP1A1)
14	0.323	金属蛋白酶 1(MP1)
15	0.327	组织蛋白酶 D(CTSD)
16	0.327	RNA 多聚酶 II 多肽 E(POLR2E)
17	0.341	4- 氨基丁酸氨基转移酶(ABAT)
18	0.350	推定肌管蛋白相关蛋白 8(MTMR8)
19	0.357	肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)
20	0.360	支链酮酸脱氢酶 E1(BCKDHA)
21	0.360	二肽酶 1(DPEP1)
22	0.368	肿瘤蛋白 D52 样蛋白 2(TPD52L2)
23	0.372	推定蛋白 KIAA0123
24	0.375	前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 7(PCSK7)
25	0.387	缬氨酰-tRNA 合成酶 2(VARS2)
26	0.395	未知基因 23856
27	0.396	酵母 hnRNP 甲基转移酶样蛋白 2(HRMT1L2)
28	0.401	胸腺嘧啶激酶 1(TK1)
29	0.414	谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)
30	0.414	肌型丙酮酸激酶(PKM2)
31	0.424	苯丙氨酸 t-RNA 合成酶样蛋白(FARSL)
32	0.426	Transgelin 2 蛋白(TAGLN2)
33	0.430	干扰素诱导蛋白 35
34	0.436	未知基因序列 zj99f11.r1
35	0.438	CGI-69 蛋白(LOC51629)
36	0.439	蛋白磷酸酶 1, α 型催化亚单位(PPP1CA)
37	0.447	肌醇 1, 3, 4 三磷酸 5/6 激酶(ITPK1)
38	0.447	组织特异性移植抗原 P35B(TSTA3)
39	0.447	热休克蛋白 75(TRAP1)
40	0.450	NADH 脱氢酶
41	0.450	ras 同源基因家族 C(ARHC)
42	0.452	核孔蛋白 153 kD(NUP153)
43	0.459	4 跨膜位点亚家族 A1(MS4A1)
44	0.461	真核翻译起始因子 3 亚单位 8(EIF3S8)
45	0.463	组织蛋白酶 E(CTSE)
46	0.465	磷酸甘露糖突变酶 1(PMM1)
47	0.465	微管蛋白 β 2(TUBB2)
48	0.467	黑色素瘤抗原家族 D1(MAGED1)
49	0.470	颗粒蛋白(GRN)
50	0.474	calpain 小亚单位 1(CAPNS1)
51	0.475	推定蛋白 FLJ21819
52	0.478	黑色素瘤抗原家族 D12(MAGED2)
53	0.483	氯离子通道蛋白 6(CLCN6)
54	0.484	类固醇生成的急性调节蛋白相关蛋白(MLN64)
55	0.485	烯醇化酶 3(ENO3)
56	0.496	真核翻译延伸因子 2(EEF2)
57	0.497	小细胞核核糖体蛋白多肽 A(SNRPA)
58	0.497	TGF β 受体 1(TGFB1)

3 讨论

早期研究发现, 整合的病毒 DNA 编码的 HBxAg 是一种重要的转录激活因子, 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. 研究 HBxAg 功能的方法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的方式来研究. HBxAg 的功能状态与其细胞定位有关, 核内 HBxAg 可通过与 DNA 结合蛋白作用, 激活转录因子或基本转录过程, 通过反式激活转录元件而促进病毒的复制^[51-60]. HBxAg 还能在 DNA 水平激活转录. 已有报道 HBxAg 可以与多种转录激活因子发生相互作用, 这些因子包括 Oct1、ATF、ATF2、CREB3、Egr1、p53、IL-6 及含有 bZip 区的一些因子. 而胞质中的 HBxAg 则主要通过刺激信号转导途径而引起一系列的反应, 激活 AP-1、NF- κ B 等一批转录因子, 干扰细胞内信号转导通路反式激活转录, 导致细胞的转录、增生^[61-70].

HBxAg 功能域的分析, 研究认为, N 末端和 C 末端对其反式激活都不重要, 转录活性区位于 32-148 aa 内: 其中 32-66 区可能为结合功能域, 而 105-148 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. Arii et al 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), 这三段序列在不同的嗜肝病毒中高度保守, 第一段序列形成组氨酸/天冬氨酸功能样特征, 第二与第三段序列与 Kunitz 样丝氨酸蛋白酶抑制剂的 Kunitz 功能区高度同源. N 末端 5-27 aa 或 C 末端 143-154 aa 缺失, 对 HBxAg 活性没有影响^[71-80]. HBxAg 基因序列是高度保守的, 我们在以 HBxAg 基因序列为靶区域, 研究 HBV 在慢性感染患者体内的存在状态时发现, HBxAg 基因具有准种特点, 在其羧基末端存在相对的高变区. 进一步研究发现 HBxAg 基因的异质性和准种特点对于其反式激活作用具有显著的影响^[81-84]. 这些研究结果的差异, 可能是 HBxAg 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.

研究发现 HBxAg 的反式激活作用呈现明显的广谱性, 能够反式激活多种同源或异源的病毒或细胞转录调节基因区, 包括 HBV 增强子/核心启动子、S 基因启动子, SV40 的增强子及早期启动子, 单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶启动子(HSV-TK), 人 T 淋巴细胞 I 型病毒(HTLV-1)的长末端重复序列(LTR)、人免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)、劳氏肉瘤病毒(RSV)及 β -干扰素等的启动子. HBxAg 也可反式激活聚合酶(pol)I、II、III 启动子, 并且对 c-myc、HLA-DR、MHC-I 及 IL-8 等都有反式激活作用.

我们以含有全长乙型肝炎病毒基因的 pCP10 质粒作为模板, 应用聚合酶链反应技术(PCR)扩增的 HBxAg 基因片段, 常规分子生物学技术构建 HBxAg 的真核表

达载体 pcDNA3-HBxAg, 利用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞, HBxAg 蛋白的表达以 Western blot 杂交技术证实. 从转染和非转染细胞 HepG2 种提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 并进行基因芯片技术分析. 结果表明, 16 种基因的表达水平上调, 58 种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导等基因, 相信这些类型的基因在 HBxAg 的恶性转化中具有十分重要的作用.

Wu et al^[85]应用 NCI 建立的含有 2 208 基因点的 Oncochip microarray 系统, 对于新鲜分离的人肝细胞与表达 HBxAg 的人 HCC 细胞系 SK-Hep-1 的基因表达谱进行了比较分析. 基因芯片的研究结果又通过 Northern blot 杂交分子进行证实. 发生变化的基因类型包括一些癌基因如 c-myc、c-myb, 肿瘤抑制基因如 APC、p53、WAF1、WT1 等. 进一步证实了 HBxAg 的恶性转化作用机制主要是通过对于癌基因和肿瘤抑制基因的异常调节而实现的.

Han et al^[86]对于稳定表达 HBxAg 的 HepG2(HepG2-HBx) 的基因表达谱进行分析, 在 588 个靶基因中, 2 种癌基因 IGFR-2、RhoA 和 1 种细胞周期调节基因 p55CDC, 以及 3 种信号转导基因如凝血酶受体(thrombin receptor)、MLK-3、MacMARCKS, 1 种应急应答基因 HSP27, 2 种细胞凋亡调节基因 FAST 激酶、Bak, 1 种转录因子 p21/WAF 基因的表达水平显著上调. 1 种转录因子即转录延长因子 SII (transcription elongation factor SII), 2 种生长因子如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1)、T 淋巴细胞分泌蛋白 I-309 (T-lymphocyte-secreted protein I-309) 显著下调. 这些研究结果表明, HBxAg 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 基因芯片技术是研究基因表达谱改变的有效分析技术^[87-96].

4 参考文献

- 1 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, 1997:42-46
- 2 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
- 3 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
- 4 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
- 5 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 诱导小鼠产生特异性免疫应答. 中华传染病杂志 2000;18:190-191
- 6 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
- 7 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
- 8 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
- 9 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
- 10 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
- 11 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. 中华肝胆病杂志 1995;3:67-70
- 12 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
- 13 成军. 决定乙型肝炎病毒嗜肝特性的分子机制. 国外医学病毒学分册 1995;2:78-81
- 14 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
- 15 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 S 基因单独和与白介素-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
- 16 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
- 17 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-262
- 18 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
- 19 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
- 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. 中华肝病杂志 2001;9:163-165
- 21 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
- 22 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
- 23 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
- 24 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
- 25 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
- 26 成军, 李莉. 胸腺素 α 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
- 27 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
- 28 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
- 29 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
- 30 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
- 31 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
- 32 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
- 33 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
- 34 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
- 35 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
- 36 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
- 37 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
- 38 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
- 39 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
- 40 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
- 41 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
- 42 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
- 43 Lee Y, Bong Y, Poo H, Lee Y, Park J, Oh S, Sohn M, Lee S, Park U, Kim N, Hyun S. Establishment and characterization of cell lines constitutively expressing hepatitis B virus X-protein. *Gene* 1998;207:111-118

- 44 Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication. *J Virol* 1998;72:1737-1743
- 45 Kuzhandaivelu N, Cong YS, Inouye C, Yang WM, Seto E. XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Res* 1996;24:4741-4750
- 46 Cheong JH, Yi M, Lin Y, Murakami S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J* 1995;14:143-150
- 47 Kim YH, Kang SK, Lee YI. Functional analysis of hepatitis B virus transactivator X: implication of the leucine zipper-like region and C-terminal seven conserved amino acids in functional regions. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:894-903
- 48 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
- 49 Wu JY, Zhou ZY, Judd A, Cartwright CA, Robinson WS. The hepatitis B virus-encoded transcriptional trans-activator hbx appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell* 1990;63:687-695
- 50 Jameel S, Siddiqui A, Maguire HF, Rao KV. Hepatitis B virus X protein produced in *Escherichia coli* is biologically functional. *J Virol* 1990;64:3963-3966
- 51 洪源, 成军. 肝炎病毒 DNA 疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10:221-222
- 52 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
- 53 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
- 54 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
- 55 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
- 56 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;10:209-221
- 57 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
- 58 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
- 59 成军, 李莉. 拉米夫定在肝脏移植患者乙型肝炎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
- 60 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 61 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
- 62 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竟坤, 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
- 63 成军, 李莉. 新型抗乙型肝炎病毒药物氟硫胞苷的作用及机制. 世界感染杂志 2002;2:1-4
- 64 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竟坤, 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
- 65 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 66 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
- 67 董菁, 施双双, 皇甫竟坤, 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
- 68 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
- 69 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
- 70 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
- 71 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
- 72 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竟坤, 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
- 73 董菁, 刘妍, 皇甫竟坤, 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
- 74 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
- 75 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
- 76 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙型肝炎病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙型肝炎病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 77 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
- 78 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. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396
- 79 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
- 80 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 郎振为, 皇甫竟坤, 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
- 81 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
- 82 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
- 83 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 张玲霞, 王业东, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙型肝炎病毒基因治疗研究. 军医进修学院学报 2003;24:49-51
- 84 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
- 85 Wu CG, Salvay DM, Fergues M, Valerie K, Farnsworth J, Markin RS, Wang XW. Distinctive gene expression profiles associated with hepatitis B virus x protein. *Oncogene* 2001;20:3674-3682
- 86 Han J, Yoo HY, Choi BH, Rho HM. Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:525-530
- 87 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
- 88 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
- 89 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
- 90 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竟坤, 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
- 91 刘妍, 董菁, 皇甫竟坤, 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;27:125-127
- 92 刘妍, 董菁, 皇甫竟坤, 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其对转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 93 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
- 94 董菁, 成军, 皇甫竟坤, 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
- 95 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
- 96 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
- 97 Twu JS, Wu JY, Robinson WS. Transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by hepatitis B virus X-protein requires de novo protein synthesis. *Virology* 1990;177:406-410
- 98 Sninsky JJ, Siddiqui A, Robinson WS, Cohen SN. Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B viral genome. *Nature* 1979;279:346-348

乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因10的克隆化研究

成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚

成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 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学系, 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, 教授, 主任医师. 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. 目前从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作, 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, 已出版专著5部, 发表论文及综述300篇.

国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

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

电话: 010-6693-3391 传真: 010-6380-1283

收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Identification and characterization of gene 10 transactivated by hepatitis B virus X protein with DNA microarray assay

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

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

Supported by the National Natural Science Foundation of China No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No.98H038

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

Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To study the target genes transactivated by HBxAg.

METHODS: Specific primers were designed and synthesized according to the HBV DNA sequence of subtype. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify HBxAg coding sequence by using pCP10 plasmid containing 2 copies of head to tail HBV DNA as the template. The expressive vector of pcDNA3-HBxAg was constructed for the transfection of hepatoblastoma cell line HepG2 by Lipofectamine PLUS reagent. Total RNA was prepared from HepG2 and HepG2 cells transfected by pcDNA-HBxAg vector. The RNA was reversely transcribed for further microarray assay.

RESULTS: From the microarray assay, 16 genes were found to be up-regulated, and 58 genes down-regulated. Among

them, one gene named XTP10 without known function with 1 206 nt in length, was up-regulated. The encoded protein consisted of 401 amino acid residues (aa).

CONCLUSION: HBxAg is a potential transactivator. DNA microarray is a liable and efficient method for analysis of differentially expressed genes. Molecular biological methods in combination with bioinformatics pave the way for the discovery of new genes transactivated by HBxAg with unknown functions.

Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang L, Zhong YW, Dong J, Wang G. Identification and characterization of gene 10 transactivated by hepatitis B virus X protein with DNA microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):925-929

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)X蛋白(HBxAg)是一种具有反式激活作用的病毒蛋白质. 为了探索HBxAg蛋白反式激活作用新的靶基因, 利用基因芯片技术(DNA chips)对于表达和不表达HBxAg的HepG2细胞的基因表达谱进行比较, 以期发现HBxAg蛋白反式激活作用的新靶点, 为阐明HBxAg的反式激活作用分子生物学机制, 以及HBV相关的肝细胞癌(HCC)形成的分子生物学机制开辟新的研究方向.

方法: 以含有2拷贝头尾连接的HBV DNA的质粒pCP10作为模板, 根据ayw亚型的HBV DNA序列设计、合成引物, PCR扩增产物克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取RNA并进行逆转录. 进行基因芯片技术分析. 以生物信息学技术, 克隆、鉴定新基因.

结果: 在16种HBxAg上调的靶基因中, 其中包括未知功能基因, 利用生物信息学技术, 获得HBxAg蛋白反式激活作用的新型靶基因, 开放读码框架(ORF)长度为1 206个核苷酸(nt), 编码产物由401个氨基酸残基(aa)组成, 命名为XTP10.

结论: HBxAg是一种具有反式激活作用的蛋白. 基因芯片技术是进行基因表达谱分析的可靠、有效技术. 分子克隆技术结合生物信息学技术, 是目前鉴定、克隆未知功能新基因的有效技术途径.

成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因10的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):925-929

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/925.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组中最小的开放读码框架

(ORF) 编码的 X 蛋白(HBxAg) 是一种具有反式激活(transactivation)作用的病毒蛋白, 在HBV感染肝细胞的恶性转化中具有十分重要的作用^[1-4]. 关于HBxAg反式激活作用的机制以及在肝细胞癌(HCC, hepatocellular carcinoma)发生发展中的作用, 已经十分明确, 但是, 还有许多方面没有阐明^[5-7]. 为了寻找HBxAg反式激活的新的靶基因, 我们应用基因芯片(DNA chips)技术, 对于HBxAg蛋白反式激活作用的靶基因进行筛选, 证实一种未知功能基因是HBxAg反式激活作用的靶基因, 对于其基因序列进行了分析.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(amersham pharmacia biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×CR 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).

1.2 方法

1.2.1 乙型肝炎病毒 X 蛋白真核表达载体的构建 以含有 2 拷贝头尾连接的 HBV DNA 的质粒 pCP10 作为模板, 根据 ayw 亚型的 HBV DNA 序列设计、合成引物, 进行 PCR 扩增. 扩增的 HBxAg 的编码基因首先克隆到 TA 载体中进行序列测定, 然后亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(-)中, 构建真核表达载体 pcDNA3.1(-)-HBxAg^[8].

1.2.2 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的转染 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 以 RPMI1640 完全培养基培养, 前 1 d 传代, 75% 融合度的细胞, 应用 Lipofectamine PLUS 转染试剂进行转染, 真核表达载体质粒 DNA 用量为 1 μg. 转染后 48 h 收获细胞^[9-13].

1.2.3 总 RNA 的提取和逆转录 应用 Trizol 试剂盒提取转染细胞的总 RNA, 并进行逆转录^[14].

1.2.4 基因芯片技术分析 按照联合基因公司的基因表达谱芯片产品说明, 进行基因表达谱分析.

2 结果

2.1 乙型肝炎病毒 X 蛋白真核表达载体的构建及细胞转染 经过限制性内切酶消化作图分析, 以及插入基因片段的核苷酸序列分析, 证实构建的真核表达载体正确^[8].

2.2 总 RNA 的提取和逆转录 获得 RNA 总量为 2.6 μg, 并进行逆转录^[8].

2.3 基因芯片技术分析 经过基因芯片技术分析, 证实转染真核表达载体 pcDNA3-HBxAg 的 HepG2 细胞与转染空白载体 pcDNA3.1(-)的 HepG2 细胞进行比较, 发现 HBxAg 蛋白上调的靶基因有 16 种, 下调的靶基因有 58 种.

2.4 新基因的序列分析 在 16 种 HBxAg 上调的靶基因中, 其中包括未知功能基因, 利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 获得 HBxAg 蛋白反式激活作用的新型靶基因(图 1), 命名为 XTP10. 新基因的开放读码框架(ORF)长度为 1206 个核苷酸(nt), 编码产物由 401 个氨基酸残基(aa)组成. 新基因的核苷酸序列在 GenBank 中登录, 登录号为 NM_024824.

```

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

```

```

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

```

图1 HBxAg反式激活靶基因XTP10核苷酸及其编码产物序列。

3 讨论

肝炎病毒的基因组编码一系列具有反式激活作用的病毒蛋白质, 例如HBV基因组编码的羧基末端截短型表面抗原中蛋白(MHBst)、HBxAg, 丙型肝炎病毒(HCV)基因组编码的核心(core)蛋白、非结构蛋白3(NS3)、非

结构蛋白5A(NS5A)等都已经证明是具有反式激活作用的病毒蛋白类型^[15-19]。研究反式激活作用蛋白靶基因的技术, 主要是基于差异显示技术原理建立的一些分子生物学技术。例如, 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)技术、代表性差异显示技术(RDA, representative differential display)、抑制性消减杂交技术(SSH, suppression subtractive hybridization)等。随着分子生物学技术、计算机分析技术、自动化技术的结合建立起来的微矩阵(microarray)技术, 对于差异表达基因进行高通量筛选成为可能^[20,21]。这些技术在分析反式激活靶基因的研究中各有利弊。微矩阵技术具有简便、高通量、可以同时处理大量标本的优点, 但是其筛选的范围主要决定于基因芯片上所点(印刷)核苷酸探针的种类和数量。人类基因组计划(HGP)的研究之初, 估计人染色体中的表达基因可能在10万个左右, 目前根据染色体的精确作图分析, 以及部分序列测定与分析的结果来看, 人染色体中编码基因的数量可能要少于10万个。目前对于人染色体中的编码基因还没有完全阐明, 所以目前的基因芯片受到基因类型选择和芯片容量的限制, 只能是对于人染色体编码基因的一小部分进行筛选研究, 而对于另一部分就有遗漏的缺陷。关于RDA、AP-DD-RT-PCR和SSH等技术, 虽然他们没有微矩阵技术高通量的特点, 但是这些技术对于筛选对象基因没有先决条件, 对于人染色体基因组表达的基因类型是随机性地筛选, 因此可以筛选得到微矩阵技术筛选不到、从来没有进行过研究的基因类型。因此, 从技术本身来看, 研究基因表达谱的差异, 这些技术都有用武之地, 相互补充^[22-29]。

关于HBxAg的反式激活作用, 特别是结构与功能之间相互关系既往已经进行了深入的研究和探索。HBxAg蛋白功能域的分析: Guo et al^[30]认为至少有一个位于103-117 aa的功能域对其作用非常重要。Madden et al^[31]结果显示, 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。Haviv et al^[32]认为C末端134-139 aa(LGGCRHK)较保守, 缺失后HBxAg的反式转录活性几乎完全丧失。Bouchard et al^[33]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), 这三段序列在不同的嗜肝病毒中高度保守, 第一段序列形成组氨酸/天冬氨酸功能样特征, 第二与第三段序列与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HBxAg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。

慢性 HBV 感染者, HBxAg 蛋白在 HCC 形成过程中具有十分重要的意义. Ogden et al^[34]发现 HBxAg 的反式激活功能, Vero 细胞中表达的 HBxAg 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 HBxAg 蛋白可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、白细胞抗原-DR(HLA-DR)、主要组织相容性抗原-I(MHC-I)及白介素-8(IL-8)等都有反式激活作用. 为了研究 HBV 感染者 HBxAg 蛋白在肝细胞恶性转化过程中的具体作用, Lee et al^[35]构建了受四环素严格调控的 HBxAg 蛋白表达载体, 建立表达 HBxAg 蛋白的分化细胞系 3pX-1 和去分化细胞系 4pX-1. 只有 3pX-1 细胞系有恶性转化的现象, 主要机制就是持续的 Ras-Raf-MAPK 系统的激活. 没有发生转化的 4pX-1 细胞系具有持续的 JNK 信号转导系统的激活. HBxAg 蛋白在 3pX-1 和 4pX-1 细胞系中参与的信号转导通路是有差别的. 对于这 2 个细胞系的细胞周期参数进行比较研究, 3pX-1 细胞系表现出 HBxAg 蛋白依赖性的 G1、S 和 G2/M 期的进展, 表现为细胞周期素 D1、A 和 B1 的表达水平升高, Cdc2 激酶的激活等. 在 4pX-1 细胞系中可以见到 HBxAg 蛋白依赖性的 G1 和 S 期的进入, 之后是 S 期的停止, 缺乏 Cdc2 激酶的激活. 4pX-1 细胞系表现出 HBxAg 蛋白诱导的细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p21(Cip1)、肿瘤抑制蛋白 p19(ARF)、细胞凋亡蛋白 bax 以及胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)的表达. 尽管出现了 HBxAg 蛋白诱导的生长停滞, 也没有 Cdc2 的激活, 但 4pX-1 细胞系并没有出现 HBxAg 蛋白依赖性 G2/M 阻滞或细胞凋亡. HBV 的 HBxAg 蛋白可以诱导 Fas 配体(FasL)的表达, 从而帮助肝细胞癌(HCC)细胞逃避宿主的免疫监视系统.

HBxAg 蛋白对于细胞基因表达的影响是十分广泛的, 这也是 HBV 相关的 HCC 发生发展的重要机制所在. 但是, 关于 HBxAg 蛋白的分子生物学作用机制, 大部分都是以肝癌细胞系作为细胞模型进行研究的, Nijhara et al^[36]构建了转导正常肝细胞的有效基因转移途径, 结果表明, 这种基因转移技术可以使 50% 以上的细胞表达 HBxAg 蛋白. Tarn et al^[37]的结果证实 HBxAg 引起的肝细胞的恶性转化过程与 RAS-RAF-MAPK 和 JNK 信号转导途径有关. Kang-Park et al^[38]证实 HBxAg 蛋白通过转录因子 Sp1 调节胰岛素样生长因子 II(IGF II)启动子 4 的活性. 在这一调节系统中, PKC 和 p44/p42MAPK 是必须的. 首先, PMA 对 PKC 的激活, 或者 PKC 的表达载体可以促进 Sp1 转录因子的磷酸化, 提高 P4 启动子得转录活性. PKC 的抑制剂 Go6976 可以降低 Sp1 的磷酸化, 同时降低 P4 启动子的活性以及 IGF-II mRNA 的转录表达水平. MEK 激活抑制剂 U0126 降低 Sp1 的磷酸化水平, P4 启动子活性和 IGF-II mRNA 转录表达水平下降. 这些结果说明 PKC、p44/p42 MAPK 信号转导通路是

HBxAg 通过 Sp1 介导的 IGF-II 基因激活的重要条件. Pflum et al^[39]证实, HBxAg 与 CREB 之间可以结合, 并且可以促进这种蛋白的 DNA 结合能力. HBxAg 在反式激活靶基因转录调节的机制中, 需要 Ser-133 位点没有发生磷酸化修饰的 CREB 的参与. HBxAg 可以上调 Camp 应答基因的表达, 说明在肝细胞的增生, 直至肝细胞的恶性转化过程中都有十分重要的作用. Park et al^[40]应用 p53 基因发生突变的 Hep3B 细胞系进行了研究, 以 HBxAg 表达载体进行稳定转化时, p21(waf1/cip1)mRNA 转录和蛋白表达水平显著升高, 与 CDK2 结合的水平显著升高, 显著抑制了细胞周期素 E 和 CDK2 复合物的形成以及组蛋白 H1 的磷酸化修饰, p21 启动子活性增强. 利用基因突变技术, 证实 p21 启动子在 -1 185 和 -1 482 nt 之间. 基因突变分析结果表明, HBxAg 应答位点与 ets 因子结合位点重叠. 说明在这一细胞系中, HBxAg 可以克服由于 p53 功能缺失造成的下游 p21(waf1/cip1)表达调节的障碍^[41-47].

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进行共转染实验. 分析其原因可能包括: 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; 其次, 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, 而病毒蛋白在患者体内水平通常很低; 第一, 不同的细胞类型将有不同的应答; 第二, 细胞培养环境不可能完全真实地反映活体内环境; 最后, 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^[48,49].

关于未知功能新基因的发现是近年来分子生物学领域中的热点问题. 早期的研究工作主要是通过所谓的反向遗传学(reverse genetics)技术, 即首先发现或针对一种生物学现象, 利用蛋白化学和分析化学技术, 将这种生物学现象相关的主要蛋白进行分离纯化, 然后对于纯化的蛋白进行末端部分序列测定, 再根据基因序列编码的简并原则, 设计引物或探针, 进行 PCR 扩增, 或者对于相应的 cDNA 文库进行筛选, 以获得相应的编码基因. 因为这一技术相对于遗传学中心法则来说, 不是遗传信息 DNA-RNA-蛋白的流向, 而正好与之相反, 因此称为反向遗传学技术. 这一技术的主要缺点就是技术要求高, 过程十分复杂. 以 DNA 操作技术与功能研究相结合的技术最为有效. 随着核苷酸序列数据库的建立和容量的不断扩大, 以及计算分析技术的不断进步, 随之而来的生物信息学技术在分子生物学研究中的地位越来越重要. 事实证明, 分子克隆技术与生物信息学技术的结合, 是目前克隆和鉴定未知功能基因最有效的研究技术.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:42-46

- 2 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 免疫小鼠产生的特异性免疫应答. 中华传染病杂志 2000;18:190-191
- 3 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抗可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130-1325
- 4 成军,斯崇文. HBV DNA 转染细胞系的建立及其应用研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:60-64
- 5 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
- 6 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-A262
- 7 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
- 8 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
- 9 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
- 10 成军,李莉. 胸腺素 α 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
- 11 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
- 12 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
- 13 洪源,成军. 乙型肝炎病毒 mRNA 转录后剪接加工的研究进展. 国外医学病毒学分册 2001;8:115-119
- 14 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
- 15 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
- 16 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
- 17 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
- 18 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
- 19 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
- 20 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
- 21 洪源,成军. 肝炎病毒 DNA 疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:221-222
- 22 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
- 23 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
- 24 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
- 25 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
- 26 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
- 27 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
- 28 成军,李莉. 拉米夫定在肝脏移植患者乙型肝炎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
- 29 董菁,施双双,王业东,皇甫竞坤,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
- 30 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 31 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin b1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus x protein. *J Virol* 2002;76:11770-11774
- 32 Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1562-1569
- 33 Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001;294:2376-2378
- 34 Ogden SK, Lee KC, Barton MC. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem* 2000;275:27806-27814
- 35 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
- 36 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 37 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
- 38 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
- 39 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
- 40 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
- 41 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
- 42 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
- 43 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
- 44 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
- 45 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
- 46 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
- 47 刘妍,成军,张跃新,段惠娟,牟劲松,韩萍,李克,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
- 48 陆荫英,王琳,刘妍,于敏,李克,王业东,张玲霞,成军. 乙型肝炎病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙型肝炎病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 49 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

基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因

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
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医学系, 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, 教授, 主任医师。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。目前从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作, 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, 已出版专著 5 部, 发表论文及综述 300 篇。

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: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Screening and identification of genes trans-regulated by hepatitis C virus NS3 protein with microarray assay

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

Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Jian-Jun Wang, Qian Yang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing, 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, Director, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To understand the target genes up-regulated or down-regulated by NS3 protein, we compared the differentially expressed genes between the hepatoblastoma cell line HepG2 transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-NS3, respectively by cDNA microarray technique.

METHODS: The NS3 coding DNA fragment was amplified with polymerase chain reaction (PCR) technique by using pBRTM3011 containing the full length of HCV-H cDNA as the template. The expressive vector of pcDNA3.1-NS3 was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-NS3, respectively using lipofectamine. The total RNA was isolated and reverse transcribed. The cDNAs were subjected for microarray screening with 1 152 cDNA probes.

RESULTS: The expressive vector has been constructed and

confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. The expression of NS3 protein has been confirmed by Western blot with single chain variable region (scFv) antibody. High quality mRNA and cDNA had been prepared and successful microarray screening had been conducted. From the scanning results, it was found 34 genes were up-regulated and 37 genes were down-regulated by NS3 protein of HCV.

CONCLUSION: NS3 protein is a transactivator. The expression of NS3 protein affected the expression spectrum of HCV infected hepatocyte. The microarray is an important technique for the study of transactivating effects for viral proteins.

Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang JJ, Yang Q. Screening and identification of genes trans-regulated by hepatitis C virus NS3 protein with microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):930-934

摘要

目的: 丙型肝炎病毒(HCV)的非结构蛋白 3(non-structural protein 3, NS3)是由 HCV 基因组编码的具有多种功能的蛋白质。NS3 蛋白的表达对于 HCV 感染肝细胞的基因表达谱具有显著影响。为了研究 NS3 蛋白反式调节的靶基因, 我们应用基因芯片技术对于 pcDNA3.1(-) 和 pcDNA3.1(-)-NS3 分别转染的 HepG2 细胞的基因表达谱进行分析。

方法: 以含有 HCV-H 全基因组 cDNA 的质粒 pBRTM3011 作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增 NS3 蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术构建表达载体 pcDNA3.1(-)-NS3。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 与转染空白表达载体 pcDNA3.1(-) 的 HepG2 细胞进行 DNA 芯片分析并比较。

结果: 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和 DNA 序列测定, 证实准确无误。以单链可变区抗体的 Western blot 杂交技术证实构建的表达载体转染 HepG2 细胞之后有 NS3 蛋白的表达, 提取高质量的总 mRNA 并进行逆转录成为 cDNA, 进行 DNA 芯片技术分析。在 1 152 个基因表达谱的筛选中, 发现有 34 个基因表达水平显著上调, 37 个基因表达水平显著下调。

结论: HCV 的 NS3 蛋白是一种反式激活因子。NS3 基因的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。DNA 芯片技术是分析反式激活靶基因的有效技术途径。

成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):930-934

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/930.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 基因组是一种 RNA. HCV 感染的慢性化比率很高, 甚至可以达到 50-80 %, 全国血清流行病学调查的结果显示, 普通人群的抗-HCV 阳性率为 3.2 %^[1-3]. HCV 感染除引起急、慢性病毒性肝炎(CHC, chronic hepatitis C)、肝硬化(liver cirrhosis)、肝细胞癌(HCC, hepatocellular carcinoma)之外, 而且与肝脏脂肪变(steatohepatitis)、糖代谢紊乱有关^[4,5]. 因此, HCV 感染与乙型肝炎病毒(HBV)感染的致病机制是不同的. HCV 基因组中含有唯一一个开放读码框架(ORF, open reading frame), 编码由 3 000 个左右的氨基酸残基(aa)组成的多肽, 然后在病毒的蛋白酶和肝细胞信号肽酶的作用下, 裂解生成 10 种不同的结构和非结构蛋白^[6,7]. 因为 HCV 的基因复制形式没有经过 DNA 阶段, 因此就不存在 HCV 基因组与肝细胞基因组 DNA 的整合, 所以, HCV 感染之后的致病机制, 主要是通过 HCV 基因组编码的蛋白-肝细胞蛋白之间的相互作用与作用, 肝细胞蛋白与 HCV 调节基因的结合与作用, 以及 HCV 基因组编码蛋白对于肝细胞基因表达谱的影响^[8-12].

HCV 基因组编码的蛋白分子中, 核心(core)蛋白、非结构蛋白 3(NS3)和非结构蛋白 5A(NS5A)是相当明确的具有反式激活(transactivation)作用的病毒蛋白^[13-15]. 关于这些反式激活作用的蛋白所作用的靶基因类型, 利用基因的差异表达技术、微矩阵(microarray)技术等进行了筛选, 获得了大量有价值的结果, 是研究 HCV 感染对于肝细胞基因表达谱影响的有效技术手段, 我们应用微矩阵技术, 对于 HCV NS3 蛋白基因转染和空白表达载体转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2 进行筛选, 试图从 HCV NS3 蛋白的表达对于肝细胞基因表达谱的影响, 探索 HCV 感染的发病机制, 包括 HCV 相关的 HCC 发生发展的分子生物学机制.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(amersham pharmacia biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×CR 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).

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 HCV NS3 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS3 由本室构建. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-NS3 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 NS3 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.3 探针标记 参照 Schena et al 的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5 × SSC+2g/L SDS 杂交液中.

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

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

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

2 结果

2.1 HCV NS3 蛋白的表达载体构建 HCV NS3 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS3 由本室构建.

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀>1.89, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 HCV NS3 蛋白上调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上, 就判断为 HCV NS3 蛋白得上调基因. 在本研究中发现有 34 种基因的表达水平上调(表 1).

2.4 HCV NS3 蛋白下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCV NS3 蛋白的下调基因. 在本研究中发现有 37 种基因的表达水平下调(表 2).

表 1 HCV NS3 蛋白上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	2.010	FLJ21930
2	2.026	水通道蛋白 4(AGP4)
3	2.042	果蝇 MAD 同源基因 2(MADH2)
3	2.044	组氨 N- 甲基转移酶(HNMT)
4	2.054	S- 腺苷同型半胱氨酸羟化酶(AHCY)
5	2.069	FYN- 结合蛋白(FYB-120/130)(FYB)
6	2.087	p53 结合蛋白 MDM4
7	2.113	全长插入 cDNA 克隆, EUROIMAGE 233360
8	2.113	谷胱甘肽过氧化物酶 2(GPX3)
9	2.135	丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 5(MAP3K5)
10	2.141	黑色素瘤抗原家族 A10(MAGEA10)
11	2.154	钾离子内流通道 J3(KCNJ3)
12	2.166	成纤维细胞生长因子受体 2(FGFR2)
13	2.188	FK506 结合蛋白相关蛋白(FAP48)
14	2.202	硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)
15	2.222	组织相容性 13 同源基因
16	2.250	谷氨酸受体 M3(GRM3)
17	2.274	酪蛋白激酶 1 α (CSNK1A1)
18	2.286	BCL-10
19	2.292	肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM-1)
20	2.300	脆性 X 精神迟滞蛋白 1(FMR1)
21	2.332	XI 型胶原 α 链(COL11A1)
22	2.394	LR 蛋白 8(LR8)
23	2.411	类固醇 C5 去饱和酶(SC5DL)
24	2.420	淘汰素 2(CUL2)
25	2.514	脚手架黏附因子 B(SAFB)
26	2.519	半乳糖苷转移酶相关蛋白激酶(p58/GTA)
27	2.528	转化生长因子 β II 受体 α
28	2.566	接头蛋白相关蛋白复合物 1(AP1M2)
29	2.596	推定蛋白 KIAA0942
30	2.706	推定蛋白 KIAA1641
31	2.728	推定蛋白 FLJ21819
32	2.776	溶酶体相关膜蛋白 2(LAMP2B)
33	2.832	酵母有丝分裂阻滞缺陷同源基因样基因1(MAD1L1)
34	3.147	真核细胞翻译延长因子 2(EEF2)

表 2 HCV NS3 蛋白下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.296	HIV-1 Tat 作用蛋白 2(HTATIP2)
2	0.313	单链 DNA 结合蛋白 1(SSBP1)
3	0.329	果蝇增生相关同源基因(MAGOH)
3	0.364	鸟苷酸环化酶 1 α 3(GUCY1A3)
4	0.372	CGI-99 蛋白(LOC51637)
5	0.375	热休克蛋白 105 kD(HSP105B)
6	0.377	四三肽重复位点 2(TTC2)
7	0.379	酵母 RAD23 同源基因 B(RAD23B)

8	0.391	核糖核酸酶 H1(Rnase H1)
9	0.391	推定蛋白 HSPC111
10	0.400	硫基转移酶(GLRX)
11	0.402	死亡相关蛋白 6(DAXX)
12	0.425	肿瘤蛋白 p53 结合蛋白(TP53BPL)
13	0.429	ATP 合成酶(ATP5G1)
14	0.433	伴侣蛋白 10(HSPE1)
15	0.434	核孔蛋白 153(NUP153)
16	0.436	前折叠蛋白 5(PFDN5)
17	0.438	蛋白体亚单位 α 2(PSMA2)
18	0.443	核糖体蛋白 S5(RPS5)
19	0.446	热休克蛋白 8(HSPA8)
20	0.452	推定蛋白 MGC2668
21	0.453	小核蛋白多肽 G(SNRPG)
22	0.465	蛋白体亚单位 α 3(PSMA3)
23	0.466	焦磷酸酶(PP)
24	0.468	微粒体谷胱甘肽 S- 转移酶 3(MGST3)
25	0.469	CD14
26	0.477	核糖体蛋白 S14(RPS14)
27	0.477	核糖体蛋白 L10a(RPL10A)
28	0.482	颅面发育蛋白 1(CFDP1)
29	0.483	TNF 受体相关因子 2(TRAF2)
30	0.485	可溶性载体家族 25 相似蛋白
31	0.487	ralA 结合蛋白(RALBP1)
32	0.488	染色体 20 开放读框 1(C20orf1)
33	0.492	金属硫蛋白 1G(MT1G)
34	0.497	高移动性家族蛋白 17(HMG17)
35	0.499	ATP 合酶(ATP5G2)
36	0.499	未成熟结肠癌转录子 1(ICT1)
37	0.500	细胞死亡防卫蛋白 1(DAD1)

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)基因组编码的非结构蛋白 3(NS3)是一种具有多种生物学功能的蛋白质.除了具有丝氨酸蛋白酶、RNA 解旋酶等之外,对于 HCV 基因组表达的结构和非结构蛋白的结构与功能具有重要的调节作用^[16-22]. Koch et al^[23]研究了 NS3 蛋白对于 NS5A 蛋白磷酸化修饰的影响. NS5A 是一种高度磷酸化的蛋白,与干扰素抗性、HCV RNA 的复制过程有关. NS5A 蛋白的磷酸化是由细胞的蛋白激酶结合成蛋白复合物形式进行的.对于 1b 型 HCV-J,除了存在基本形式的磷酸化 NS5A 蛋白(pp56)之外,如果与 NS4A 蛋白一起进行表达时,还存在着一种超磷酸化形式的 NS5A(pp58).对于 NS5A 高度磷酸化修饰及缺陷的 2 株 1b 型 HCV 全基因组序列进行比较分析,发现只有当 NS3-5A 连续表达时才会发生,但是分别表达,再反式提供时就不能发生 NS5A 蛋白的高度磷酸化. NS3 基因区发生点突变,不影响多蛋白的裂解过程,但是对于 NS5A 蛋白的高度磷酸化过程产生影响.在 NS4A 蛋白的中部或羧基末端发生小范围

的缺失突变, 对于多蛋白的裂解过程没有影响, 但是可以显著降低或阻断NS5A蛋白的磷酸化过程. 这些结果提示 NS3-5A 多蛋白亚单位之间的正确折叠对于 NS5A 蛋白的磷酸化过程非常重要.

基因芯片分析技术在 HCV 感染及其发病机制的研究中具有重要的应用前景. 包括肝炎病毒蛋白的表达对肝细胞基因表达谱的影响、HCV RNA 基因分型等. Aizaki et al^[24] 应用基因芯片技术结合半定量 PCR 技术, 对于表达 HCV 全基因或部分基因的细胞系的基因表达谱进行分析. 发现 HCV 基因的表达可以上调 12 种基因, 下调 4 种基因. 表达水平发生改变的基因类型包括细胞生长的调节基因, 如叉头转录因子 -1 (forkhead transcription factor, FREAC-1)、多聚腺苷酸结合蛋白 2 (poly A binding protein, PABP2), Ras 抑制子 -1 (ras suppressor, Rsu-1), 以及在 T 细胞应答过程中具有重要作用的主要组织相容性 (MHC) 抗原等. 功能基因组学是研究 HCV 致病机制的重要的工具和方法^[25-29]. Iizuka et al^[30] 对于 HBV 和 HCV 相关的 HCC 组之中的基因表达谱进行了比较分析. 在 6 000 以上靶点分析中, 发现有 83 个基因的表达水平有显著差别. 其中 31 个基因在 HBV 相关的 HCC 中表达水平升高, 52 个基因在 HCV 相关的 HCC 中升高. 在 31 个基因中包括 H19 和 IGF2, 以及与信号转导、转录和转移相关的基因. 52 个基因中, 包括一些解毒基因和免疫调节基因. 这些结果表明, HBV 和 HCV 感染引起的 HCC, 分子生物学机制不完全相同. 对于 HCC 发生的分子生物学机制的研究具有十分重要的意义. HCV NS5A 蛋白对于 HCV 感染后抑制干扰素系统的抗病毒作用具有重要意义. 但是对于 NS5A 抵抗干扰素的抗病毒作用的分子生物学机制目前我们还知之甚少^[31-37]. Girard et al^[38] 应用基因芯片技术, 对于 NS5A 蛋白表达影响肝癌细胞系 (Huh7) 基因表达谱的结果进行研究. 受到干扰素的刺激之后, 50 种基因的表达水平变化在 2 倍以上, 41 种上调, 9 种下调. NS5A 表达影响最大的一种基因就是 OAS-p69. 表达 NS5A 的肝癌细胞系 Huh7 中白介素 -8 (IL-8) 的表达水平显著上调. 向 Huh7 培养系统中加入 IL-8, 就象转染 NS5A 基因一样, 抑制干扰素诱导的抗病毒活性, 包括下调 OAS-p69 基因的表达.

HCV 感染之后的慢性化以及疾病的进程机制目前还不清楚. 基因芯片技术的出现为阐明 HCV 感染之后的肝脏基因表达谱的改变提供了最有力的研究工具. Bigger et al^[39] 应用基因芯片技术, 对于急性感染 HCV 后清除病毒的黑猩猩进行研究. 在实验感染 HCV 之后 6-8 wk 就发生了病毒血症的清除, 但是 HCV 阳性的肝细胞的清除在 HCV 感染之后的 14 wk 才完成. HCV 病毒的清除, 主要与干扰素诱导的基因类型的表达有关, 包括所有 3 种经典的干扰素抗病毒的分子机制途径. 有些基因的表达在 HCV 感染之后的 2 d 就已经启动. 基因芯片分析的结果表明, 这种病毒的清除过程具有明显的双阶段机制 (biphasic mechanism). Lanford et al^[40] 应用 HCV 实验感染的黑猩猩,

对于 HCV 感染后肝脏基因表达谱的改变进行了研究. 因此, 黑猩猩作为 HCV 感染的唯一合适的动物模型, 除了在早期阶段研究 HCV, 甚至是在克隆 HCV 基因组时作为重要的模型和材料来源之外, 还是研究 HCV 感染后致病机制, 探索新型治疗技术和方法的重要的资料来源.

为了阐明肝细胞癌发生的分子生物学机制, 比较肝细胞癌组织与癌周组织之间基因表达谱的差别, Okabe et al^[41] 对于 20 份肝细胞癌及其癌周组织, 进行 23 040 靶点的基因芯片技术分析, 在上调的基因中, 主要是促进有丝分裂的基因. HBV 阳性和 HCV 阳性的 HCC 组之间的基因表达谱有显著差别, 主要是一些酶类、致癌物或抗癌药物代谢相关酶类. 此外还筛选到一些与肿瘤的组织学表型、侵袭性表型有关的基因类型. 这些研究结果对于判断肿瘤的性质、寻找抗肿瘤治疗的新型靶位、肿瘤患者的个体化治疗等都具有十分重要的意义. Huang et al^[42] 建立了四环素诱导表达非结构蛋白的人肝癌细胞系, 利用 6 416 靶点的基因芯片技术, 对于 HCV 非结构蛋白表达时反式激活靶基因进行筛选, 获得了满意的结果.

基因芯片技术在 HCV 感染的基因诊断中具有重要应用前景. Zhao et al^[43] 应用基因芯片技术对于 HCV RNA 的基因分型进行了研究. 根据 HCV 的 5' - 非翻译区基因序列设计合成探针, 制成玻璃芯片, 对于 60 份 HCV RNA 阳性的血清标本进行检测, 同时以 60 份 HCV RNA 阴性的血清标本作为对照. 以荧光定量 PCR 技术对于 HCV RNA 进行定量. 然后对于 HCV RNA 基因分型进行基因芯片分析. 60 份阳性标本基因芯片检测的 HCV RNA 都是阳性, 其中 46 份为 1b, 3 份为 3a, 3 份为 3b, 2 份为 2a, 2 份为 2b, 2 份为 1b、2a 混合型, 2 份为 3a 型. 基因序列测定结果表明, 50 份为 1b 性, 3 份为 3a 性, 3 份为 3b 性, 2 份为 2a 性, 2 份为 2b 性. 2 种方法的检测结果一致率为 93.3%. 认为基因芯片技术是 HCV RNA 基因分型的重要技术途径^[44-46].

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:42-46
- 2 Laviada MD, Roy P, Sanchez-Vizcaino JM, Casal JI. The use of African horse sickness virus NS3 protein, expressed in bacteria, as a marker to differentiate infected from vaccinated horses. *Virus Res* 1995;38:205-218
- 3 Livache T, Fouque B, Roget A, Marchand J, Bidan G, Teoule R, Mathis G. Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping. *Anal Biochem* 1998;255:188-194
- 4 Thung SN, Shim KS, Shieh YS, Schwartz M, Theise N, Borcich A, Katz E, Miller C, Gerber MA. Hepatitis C in liver allografts. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:145-149
- 5 Rehermann B, Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, Chisari FV. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 1996;70:7092-7102
- 6 成军, 施双双, 钟彦伟, 夏小兵, 王刚, 王琳, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌的表达. *中国病毒学* 2001;16:220-223
- 7 Woitas RP, Sippel M, Althausen EM, Brackmann HH, Kochan B, Matz B, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U. Differen-

- tial expansion of T-cell receptor variable beta subsets after antigenic stimulation in patients with different outcomes of hepatitis C infection. *Immunology* 2002;106:419-427
- 8 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,李莉,刘妍,段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 9 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 10 成军,李克,陆荫英,董菁,李莉,王琳,钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 11 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
- 12 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 13 D' Souza ED, Grace K, Sangar DV, Rowlands DJ, Clarke BE. In vitro cleavage of hepatitis C virus polyprotein substrates by purified recombinant NS3 protease. *J Gen Virol* 1995;76:1729-1736
- 14 Droll DA, Krishna Murthy HM, Chambers TJ. Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: charged-to-alanine mutagenesis and deletion analysis define regions important for protease complex formation and function. *Virology* 2000;275:335-347
- 15 钟彦伟,成军,蔡炯,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源化单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 16 李莉,成军,李梵,王建军,张健,吴勤,韩萍,陈国凤,纪冬,李克. 慢性丙型肝炎病毒核心蛋白的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 17 张健,成军,李莉,刘爱兵,吴勤,李克,董菁,王琳,陆荫英. 丙型肝炎病毒感染患者血清载脂蛋白 AI 和 AII 水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 18 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟,段惠娟,芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 AI 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 19 成军,任进余,李莉,陆志檬,李克,洪源,陆荫英,王刚,刘妍,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 20 陆荫英,成军,李克,刘妍,王琳,张玲霞. 丙型肝炎病毒进入肝细胞机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1028-1029
- 21 Yoshida CF, Rouzere CD, Nogueira RM, Lampe E, Travassos-da-Rosa MA, Vanderborcht BO, Schatzmayr HG. Human antibodies to dengue and yellow fever do not react in diagnostic assays for hepatitis C virus. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:1131-1135
- 22 洪源,成军,李莉. 丙型肝炎病毒转基因小鼠模型的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1032-1034
- 23 Koch JO, Bartenschlager R. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* 1999;73:7138-7146
- 24 Aizaki H, Harada T, Otsuka M, Seki N, Matsuda M, Li YW, Kawakami H, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology* 2002;36:1431-1438
- 25 Zhong YW, Cheng J, Wang G, Shi SS, Li L, Zhang LX, Chen JM. Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its identification in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 26 Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sang* 2001;80:1-11
- 27 Orru S, Dal Piaz F, Casbarra A, Biasiol G, De Francesco R, Steinkuhler C, Pucci P. Conformational changes in the NS3 protease from hepatitis C virus strain Bk monitored by limited proteolysis and mass spectrometry. *Protein Sci* 1999;8:1445-1454
- 28 Lohr HF, Gerken G, Roth M, Weyer S, Schlaak JF, Meyer zum Buschenfelde KH. The cellular immune responses induced in the follow-up of interferon-alpha treated patients with chronic hepatitis C may determine the therapy outcome. *J Hepatol* 1998;29:524-532
- 29 Heringlake S, Tillmann HL, Cordes-Temme P, Trautwein C, Hunsmann G, Manns MP. GBV-C/HGV is not the major cause of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1996;25:980-984
- 30 Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* 2002;62:3939-3944
- 31 Hwang LH, Yang PM, Lai MY, Chiang BL, Kao JH, Wang JT, Lee SY, Chian HM, Chi WK, Chu YD, Chen PJ, Chen DS. Identification of humoral antigenic determinants in the hepatitis C virus NS3 protein. *J Infect Dis* 1996;174:173-176
- 32 O' Meara D, Nilsson P, Nygren PA, Uhlen M, Lundberg J. Capture of single-stranded DNA assisted by oligonucleotide modules. *Anal Biochem* 1998;255:195-203
- 33 Rosen HR, Marousek G, Chou S. A longitudinal analysis of T-cell epitope-coding regions of hepatitis C virus after liver transplantation. *Transplantation* 2002;74:209-216
- 34 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,洪源,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 35 Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):225-237
- 36 成军. 慢性丙型肝炎病毒肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 37 王琳,李克,成军,陆荫英,张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 38 Girard S, Shalhoub P, Lescure P, Sabile A, Misk DE, Hanash S, Brecht C, Beretta L. An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis. *Virology* 2002;295:272-283
- 39 Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066
- 40 Lanford RE, Bigger C, Bassett S, Klimpel G. The chimpanzee model of hepatitis C virus infections. *ILAR J* 2001;42:117-126
- 41 Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001;61:2129-2137
- 42 Huang Y, Uchiyama Y, Fujimura T, Kanamori H, Doi T, Takamizawa A, Hamakubo T, Kodama T. A human hepatoma cell line expressing hepatitis c virus nonstructural proteins tightly regulated by tetracycline. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:732-740
- 43 Zhao W, Liu W, Liu Q, Zhang L, Zhou Z, Liu X, Zhang H. Genotyping of hepatitis C virus by hepatitis gene diagnosis microarray. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1249-1253
- 44 Murphy DG, Willems B, Vincelette J, Bernier L, Cote J, Delage G. Biological and clinicopathological features associated with hepatitis C virus type 5 infections. *J Hepatol* 1996;24:109-113
- 45 Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* 1995;270:19100-19106
- 46 Chu PW, Westaway EG. Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with the replication of Kunjin virus RNA. *Arch Virol* 1992;125:177-191

丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因10的克隆化研究

成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚

成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 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学系, 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, 教授, 主任医师. 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. 目前从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究, 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, 已出版专著5部, 发表论文及综述300篇.

国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Identification and characterization of gene 10 transactivated by hepatitis C virus non-structural protein 5A with DNA microarray assay

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

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

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689

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

Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To explore the new target genes transactivated by HCV NS5A, we conducted microarray assay on the hepatoblastoma HepG2 and HepG2 transfected by NS5A expressive vector.

METHODS: Sequence specific primers were designed and synthesized according to the HCV-H strain of virus sequence. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify the NS5A coding gene for the construction of expressive vector pcDNA3.1(-)-NS5A. Hepatoblastoma cell line HepG2 was transfected with plasmid DNA of pcDNA3.1(-)-NS5A, and total RNA was purified from it. Reverse transcribed cDNA were subjected to microarray assay. The coding gene transactivated by HCV NS5A was cloned by bioinformatics methods.

RESULTS: The expressive vector had been constructed and approved correct. The RNA had been purified from HepG2

and HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-NS5A, respectively. The cDNA derived had been subjected to microarray assay. New gene named NS5ATP10 had been cloned in combination of molecular biological and bioinformatics methods.

CONCLUSION: HCV NS5A is a potential transactivator. Microarray is an efficient and convenient method for analysis of differentially expressed genes. A new gene has been recognized as the new target transactivated by HCV NS5A protein. These results pave the way for study on the transactivation of HCV NS5A protein.

Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang L, Zhong YW, Dong J, Wang G. Identification and characterization of gene 10 transactivated by hepatitis C virus non-structural protein 5A with DNA microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):935-938

摘要

目的: 丙型肝炎病毒(HCV)的非结构蛋白5A(NS5A)是一种具有显著反式激活作用的病毒蛋白质. 为了探索HCV NS5A病毒蛋白反式激活作用的新的靶基因, 我们应用微矩阵(microarray)技术对于转染和未转染的肝母细胞瘤细胞系HepG2进行分析. 研究结果将有助于阐明HCV感染相关疾病的发病机制.

方法: 根据HCV-H病毒株序列设计、合成序列特异性的引物. 以含有全长HCV-H株cDNA的pBRTM-3011质粒DNA作为模板, 进行多聚酶链反应(PCR)扩增, 将获得的HCV NS5A 编码基因片段克隆到 TA 载体中进行核苷酸序列测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS5A. 以pcDNA3.1(-)-NS5A 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 提取总 RNA, 逆转录为cDNA后进行表达谱基因芯片分析. 应用分子生物学技术, 结合生物信息学技术(bioinformatics), 克隆HCV NS5A反式激活作用的新的靶基因.

结果: 构建了真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A, 经过限制性内切酶作图分析和核苷酸序列分析证实正确无误. 以pcDNA3.1(-)-NS5A 转染 HepG2 后提取总 RNA, 逆转录后进行表达谱基因芯片技术分析. 应用分子克隆技术结合生物信息学技术克隆NS5A反式激活的新型靶基因, 命名为NS5ATP10, 新基因的编码基因序列全长为717个核苷酸(nt), 编码产物由238个氨基酸残基(aa)组成.

结论: HCV NS5A是一种典型的病毒基因组编码的具有反式激活作用的蛋白. 微矩阵技术是分析基因表达谱变化的有效和高通量技术. 发现了HCV NS5A反式激活作用的新的靶基因, 这一发现, 为阐明HCV NS5A蛋白的反式激活作

用及其机制, 开辟了新的研究方向.

成军,刘妍,洪源,王琳,钟彦伟,董菁,王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):935-938
http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/935.asp

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种 RNA 病毒, 属于黄病毒属, 基因组含有唯一的开放读框(ORF), 可以分成结构基因区和非结构基因区^[1-4]. 在生活周期中, 首先翻译成 3 010 左右个氨基酸残基(aa)组成的多肽, 然后在自身蛋白酶和宿主细胞信号肽酶的共同作用下裂解成不同的结构和非结构蛋白. HCV非结构蛋白5A(NS5A)即为非结构蛋白的一种^[5-8]. 几年来的研究表明, HCV NS5A 蛋白具有多种生物学功能. 在某些地区, 特别是在日本等地区, 发现 NS5A 序列的异质性(heterogeneity)是影响干扰素 α (IFN α) 治疗敏感性的决定因素, 即HCV NS5A 区存在着一段特殊的核苷酸序列, 称为干扰素敏感决定区(ISDR, interferon sensitivity determinant region). 近年来的研究结果还证实, NS5A 蛋白还具有结合载脂蛋白 AI、AII 的功能, 在肝脏脂肪滴中也见到了 NS5A 的存在, 因此, 认为 NS5A 蛋白在慢性丙型肝炎肝脏脂肪变(steatohepatitis)的发病中也有重要地位^[9-16]. 不同磷酸化形式的 NS5A 蛋白具有反式激活作用也是目前关于 NS5A 生物学功能研究的热点, 推测 NS5A 蛋白的这种反式激活作用, 可能是 HCV 感染与肝细胞癌(HCC, hepatocellular carcinoma)发生发展密切相关的重要的分子生物学机制^[17-19]. 我们应用微矩阵技术, 对于 NS5A 表达载体转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究, 发现了 NS5A 蛋白的反式激活靶基因. 其中包括未知功能基因, 命名为 NS5ATP10.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; Lipofectamine PLUS 转染试剂购自 Gibco 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 \times PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A 由本室构建. DNA 序列测定由上海博亚公司完成.

1.2 方法

1.2.1 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白基因表达载体的构建 根据 HCV-H 病毒株的基因序列设计、合成序列特异性引物, 以含有全长 HCV-H 株的 cDNA 质粒(Rice CM, Rockefeller University, USA)作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增 NS5A 的全长编码基因. 先克隆到 TA

载体中进行序列测定, 然后再亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(-)中, 构建真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A.

1.2.2 细胞培养和转染 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 以完全 DMEM 培养基培养. 转染时, 前 1 d 传代的细胞, 控制在 75 % 的融合度, 以 Lipofectamine PLUS 试剂进行转染, 表达质粒载体 DNA 的用量为 2 μ g. 转染 48 h 之后收获细胞.

1.2.3 总 RNA 的提取和逆转录 从转染和未转染的 HepG2 细胞系提取总 RNA, 并进行逆转录.

1.2.4 微矩阵分析 利用联合基因公司开发的基因芯片技术系统进行分析.

1.2.5 未知功能基因序列的确定 从基因芯片技术分析的结果中发现一未知功能基因, 在转染 pcDNA3.1(-)-NS5A 的表达载体质粒后显著上调, 以生物信息学技术对于其编码基因序列进行确定.

2 结果

2.1 真核表达载体的鉴定 真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 经过限制性内切酶作图分析和核苷酸序列的测定, 证实正确无误.

2.2 细胞转染和 RNA 的提取、逆转录 应用上述技术流程, 获得总 RNA 3.2 μ g, 并进行标准程序的逆转录.

2.3 基因芯片技术分析 应用联合基因公司开发的基因表达谱技术分析, 证实 HCV NS5A 蛋白的表达, 对于一系列的已知功能基因和未知功能基因具有反式调节作用, 其中对一些基因的表达具有显著的上调作用, 对另一些基因的表达具有显著的下调作用. 在显著上调的基因序列中包括未知功能基因, 我们将其命名为 NS5ATP10.

2.4 HCV NS5A 反式激活靶基因的基因序列和编码产物序列 HCV NS5A 反式激活靶基因的基因序列和编码产物序列如图 1. 编码基因序列全长为 717 个核苷酸(nt), 编码产物由 238 个氨基酸残基(aa)组成.

```
ATG TAC GCC CCC GGA GGC GCA GGG CTG CCC
M Y A P G G A G L P
GGC GGG CGC CGG CGG AGG AGC CCG GGA GGC
G G R R R R S P G G
AGC GCT CTG CCC AAG CAG CCG GAG CGT AGC
S A L P K Q P E R S
CTG GCC TCG GCC CTG CCT GGC GCC CTG TCT
L A S A L P G A L S
ATC ACG GCG CTG TGC ACT GCC CTC GCC GAG
I T A L C T A L A E
CCC GCC TGG TTG CAC ATC CAC GGA GGC ACC
P A W L H I H G G T
TGT TCG CGC CAG GAG CTG GGG GTC TCC GAC
C S R Q E L G V S D
GTG TTG GGC TAT GTG CAC CCG GAC CTG CTG
V L G Y V H P D L L
AAA GAT TTC TGC ATG AAT CCC CAG ACA GTG
K D F C M N P Q T V
```

```

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

```

图 1 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 蛋白反式激活靶基因 10 基因序列及编码产物一级结构序列。

3 讨论

病毒基因组的复制和表达调节与真核细胞类似, 主要是转录水平的调节. 在许多情况下, 病毒这种简单的生物类型, 还必须借助感染的宿主细胞的一些复制和表达的辅助元件完成其生活周期及致病过程. 因此, 病毒的基因表达调节与真核细胞一样, 主要是转录水平为主的多水平的调节机制. HCV 的表达调节也不例外. 转录水平的调节根据调节的机制和参与的因素不同, 可以分成顺式(cis)调节和反式(trans)调节 2 种. 所谓的顺式调节就是分子结构内部的调节, 例如基因启动子序列对于转录基因的转录活动的调节, 增强子基因序列对于启动子转录活性的调节都属于此类. 所谓的反式调节就是分子之间表达调控的调节方式, 例如, 具有 DNA 结合功能的转录因子核蛋白对于启动子转录活性的调节等就属于此类. 反式调节的结果, 从调节靶点的效果来看可以分成 2 类: 上调(up-regulation)和下调(down-

regulation). HCV 感染肝细胞之后, 也存在复杂的反式调节作用^[20-26]. 从参与的反式调节的因素来看, 可以分成病毒对病毒的反式调节、病毒对于肝细胞蛋白编码基因的反式调节、肝细胞蛋白对于病毒基因表达的反式调节等几种不同的情况. 我们经常看到不同病毒之间存在的反式调节的研究报道. 肝细胞核因子(HNF, hepatocyte nuclear factor)系列是肝细胞中特有的转录因子蛋白, 与肝炎病毒基因启动子 DNA 之间的结合和对病毒基因的转录调控是肝炎病毒相对嗜肝特点的主要决定因素之一. 肝炎病毒蛋白作为一类反式激活因子, 常常改变肝细胞中细胞周期(cell cycle)、细胞凋亡(apoptosis)、细胞分化(differentiation)、信号转导(signal transduction)等的相关基因的表达, 在肝炎病毒的致病性和肝细胞癌的发生发展中具有十分重要的作用和意义^[27-36].

丙型肝炎病毒的 NS5A 蛋白是一种具有广泛反式激活作用的蛋白质分子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征. 一般来说, 转录的反式激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 主要定位于细胞内质网(ER), 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号转导途径. 尽管已有明确证据显示 NS5A 蛋白全长定位于细胞质内, 在细胞核内仍可以检测到 NS5A 的 N-末段的定位信号^[37-40], 这就提示这部分结构可进入细胞核内并成为转录激活因子的一部分. 最近的研究表明缺失 N-末段 146 aa 和 DNA 结合区域在 GAL4(一种酵母细胞转录激活因子)的 HCV NS5A 蛋白可强烈的激活酵母和哺乳动物细胞的转录活性. 结合到 GAL4 DNA 结合区域的全长的 HCV NS5A 蛋白并没有激活转录的作用, NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 aa 之间. NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区(2 143-2 184 aa, 2 220-2 273 aa)和一个脯氨酸富集区(2 282-2 327 aa). 酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与 NS5A 的反式激活活性相关, 2 个酸性氨基酸区是 NS5A 的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区 2 的一些氨基酸的突变可明显影响 NS5A 的转录激活作用, 但是这些突变更多的是引起蛋白的二级结构的改变. 脯氨酸富集区被认为对 NS5A 的转录激活作用只有一定的加强作用, 相对而言并不特别重要.

Gong et al 研究发现, NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用. NS5A 在细胞质内通过氧化应激作用激活 NF- κ B 和 STAT-3 转录因子. NS5A 引起细胞内钙离子的紊乱. Ca^{2+} 作为第二信使激发线粒体内的活性氧簇的水平, 使 NF- κ B 和 STAT-3 易位至细胞核内. 有证据表明 STAT-3 的激活部分有 NS5A 的作用. 在抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)或者 Ca^{2+} 拮抗剂(EGTA-AM, TMB-8)作用下, NS5A 诱导的 NF- κ B 和 STAT-3 的反式激活作用消失了. 这些结果说明了 NS5A 可引起细胞内与病毒感染相关的病理改变的发病机制.

Ghosh et al 研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1 的表达, HCV NS5A 对于 p21WAF1 表达的抑制, 实际上就是对于细胞周期的促进作用. HCV NS5A 对于细胞周期的调节作用还表现在激活人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. 研究证实, 将 HCV NS5A 导入到小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 中, 可以导致其贴壁非依赖性生长以及获得在裸小鼠体内形成肿瘤病灶的能力. 这些都是 HCV NS5A 通过反式激活作用对于靶细胞中细胞周期调节机制干扰的结果, 可能是 HCV 感染致肝细胞恶性转化的重要机制之一.

本项研究中发现了 HCV NS5A 蛋白反式激活的新的靶基因, 为研究 HCV NS5A 蛋白的反式激活作用及其后果提供了新的研究方向和研究思路. 由于目前对于新克隆的 NS5A 蛋白反式激活的靶基因的结构与功能、表达与调控, 以及新基因的生物学作用和在丙型肝炎致病机制中的作用和地位不明, 需要进一步研究, 以阐明新基因的研究意义.

4 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 3 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:123-127
- 4 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 5 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 6 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 8 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 9 Lahm A, Yagnik A, Tramontano A, Koch U. Hepatitis C virus proteins as targets for drug development: the role of bioinformatics and modelling. *Curr Drug Targets* 2002;3:281-296
- 10 Walewski JL, Gutierrez JA, Branch-Elliman W, Stump DD, Keller TR, Rodriguez A, Benson G, Branch AD. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA* 2002;8:557-571
- 11 Husmeier D, Wright F. A Bayesian approach to discriminate between alternative DNA sequence segmentations. *Bioinformatics* 2002;18:226-234
- 12 Kernebeck T, Lohse AW, Grotzinger J. A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas. *Hepatology* 2001;34:230-233
- 13 Husmeier D, Wright F. Probabilistic divergence measures for detecting interspecies recombination. *Bioinformatics* 2001;17 (Suppl 1):S123-S131
- 14 Klinck R, Westhof E, Walker S, Afshar M, Collier A, Aboul-El F. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* 2000;6:1423-1431
- 15 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 16 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 3' - 非翻译区 RNA 结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:17-21
- 17 成军, 钟彦伟, 施双双, 王刚, 董菁, 夏小兵, 杨继珍, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. 中华微生物和免疫学杂志 2000;20:567
- 18 钟彦伟, 成军, 施双双, 王刚, 夏小兵, 田小军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 人源抗丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 单链抗体的研究. 中华肝病杂志 2002;10:109-112
- 19 成军, 施双双, 钟彦伟, 夏小兵, 王刚, 王琳, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达. 中国病毒学 2001;16:220-223
- 20 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 人源单链抗体的筛选与鉴定. 中华传染病杂志 2000;18:84-87
- 21 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 杨守纯. 丙型肝炎病毒非结构区 NS3 蛋白基因在大肠埃希菌中的可诱导性表达. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:85-87
- 22 钟彦伟, 成军, 王刚, 陈新华, 李莉, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 23 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 刘妍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS₅ 抗原模拟表位的筛选和鉴定. 中华肝病杂志 2002;10:266-268
- 24 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
- 25 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 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
- 26 成军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58
- 27 李克, 成军, 张玲霞. 丙型肝炎病毒与脂质系统代谢关系的研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:1-3
- 28 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 29 Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, 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
- 30 Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells* 1997;7:661-667
- 31 Tanimoto A, Ide Y, Arima N, Sasaguri Y, Padmanabhan R. The amino terminal deletion mutants of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:360-364
- 32 Pawlowsky JM, Germanidis G. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 1999;6:343-356
- 33 Fukuma T, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Mutations in the interferon-sensitivity determining region of hepatitis C virus and transcriptional activity of the nonstructural region 5A protein. *Hepatology* 1998;28:1147-1153
- 34 Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 1996;182:203-211
- 35 Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270:476-487
- 36 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 张忠东, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白模拟表位. 解放军医学杂志 2003;28:34-36
- 37 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS4A 蛋白抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:37-40
- 38 Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21:4801-4811
- 39 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
- 40 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001;284:1-12

应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
洪源, 男, 1974-12, 福建省莆田市人, 汉族. 1998年毕业于第四军医大学军医系, 获医学学士学位, 目前在解放军军医进修学院攻读内科学硕士学位, 主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制.
国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室.
cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus with microarray assay

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

Yuan Hong, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhonglu, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To study genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus by microarray assay.

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

RESULTS: After transfecting HepG2 cells, we found 28 genes have been up-regulated, and 26 genes down-regulated. Their encoding proteins were involved in cell signal transduction, cell proliferation and differentiation.

CONCLUSION: Microarray technology is successfully used to screen the genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, which brings some new clues for studying the trans-regulated and immune regulation mechanism of NS5A.

Hong Y, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Wang JJ. Genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus with microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):939-942

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白5A(NS5A)的反式调节基因。

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

结果: HepG2 细胞经转染 NS5A 后, 有 54 条差异基因表达, 其中 28 条基因表达增强, 26 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 的反式调节基因, 为进一步阐明丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):939-942
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/939.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒。在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10]。其基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区。因为 HCV 的基因复制形式没有经过 DNA 阶段, 不存在 HCV 基因组与肝细胞基因组 DNA 的整合, 所以, HCV 主要是通过基因组编码蛋白和肝细胞蛋白之间的相互作用及肝细胞蛋白与 HCV 调节基因的相互作用造成对肝细胞的损伤。其多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白 NS5A 基因(位于 6 258-7 601 nt 之间)编码的 58 kD 的 NS5A 蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14]。研究表明, NS5A 上存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR), 与干扰素治疗的敏感性相关^[15,16]; 此外, NS5A 还是一种作用很强转录激活因子^[17-21], 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 的细胞发生恶性转化过程有关。对于 NS5A 蛋白的反式调节功能, 我实验室已证明他可以反

式激活SV40早期启动子/增强子^[21]. 并应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对NS5A的反式调节基因进行了初步的研究^[22]. 为了从不同的角度对NS5A的反式调节基因进行验证及研究, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[23-26]对于HCV的NS5A反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究NS5A的反式调节基因打下了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂Trizol购自Gibco公司, FuGENE购自Roche公司, 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A真核表达质粒由本室构建^[21]. 表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和取材 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时, 以脂质体转染试剂FuGENE分别将2 μgpcDNA3.1(-)-NS5A和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞, 48 h后收获细胞, 每5×10⁶个细胞加入1 mL Trizol试剂, 立即于液氮中保存.

1.2.2 总RNA提取 使用Trizol试剂一步法提取丙型肝炎病毒非结构蛋白5A表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5A和空载体pcDNA3.1(-)转染的HepG2细胞总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行热稳定实验, 于-20℃和70℃保温1 h后, 经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化.

1.2.3 探针标记 参照Schen et al^[27]方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在20 μL×5 SSC+2 g/L SDS杂交液中.

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

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

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于95℃水浴中变性2 min; 芯片置于95℃水浴中变性30 s, 芯片取出浸于无水乙醇30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用Parafilm密封, 放入42℃杂交箱内杂交过夜(16-18 h). 依次以2×SSC+2 g/L

SDS、1:1 000 SSC+2 g/L SDS、1:1 000 SSC洗涤10 min, 室温晾干.

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

2 结果

2.1 总RNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度A₂₆₀/A₂₈₀>1.92, 热稳定实验70℃保温1 h与-20℃1 h的电泳条带比较, 显示28 S条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1 152个cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因, 共8个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从1 000个基因中筛选出差异表达基因共54条, 占5.4%, 其中28条基因表达增强, 26条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 表达增强的基因有28条(表1). 表达降低的基因有26条(表2).

表1 表达显著增加的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	晶状体上皮衍生生长因子	2.023
2	RET指蛋白	2.035
3	神经紧张素(NTS)	2.042
4	γ氨基丁酸A受体α5(GABRA5)	2.096
5	未知克隆KAlA04052	2.149
6	DNA介导的RNA聚合酶2, 多肽B(POLR2B)	2.167
7	淋巴细胞性白血病缺失因子2(DLEU2)	2.169
8	Cullin蛋白2(CUL2)	2.179
9	造血细胞特异性Lyn底物1(HCLS1)	2.225
10	冯希林综合征特异蛋白(VHL)	2.238
11	半乳糖基转移酶相关蛋白激酶	2.239
12	未知克隆MGC: 9535	2.266
13	溶酶体相关膜蛋白2(LAMP2)	2.324
14	甾醇C5脱氢酶(SC5DL)	2.330
15	未知蛋白KIAA0824	2.341
16	TGF-β II R-α	2.369
17	斯库瓦诺明相互作用蛋白1(SCHIP1)	2.373
18	谷氨酸受体3(GRM3)	2.375
19	类DnaJ的热休克蛋白40(HLJ1)	2.380
20	蛋白酪氨酸磷酸酶IV A型, 1号(PTP4A1)	2.391
21	B细胞CLL/淋巴瘤10因子(BCL10)	2.408
22	XI型胶原蛋白α1(COL11A1)	2.425
23	cAMP依赖调控的蛋白激酶II型β PRKAR2B)	2.462
24	Ran结合蛋白2(RanBP2alpha)	2.471
25	未知蛋白KIAA0035	2.574
26	未知克隆HEPO1185	2.586
27	推定蛋白FLJ20507	2.702
28	未知蛋白KIAA1641	3.401

表2 表达显著降低的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	热休克蛋白 1A(HSPA1A)	0.217
2	肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)	0.328
3	核受体亚家族 3, C 族 1 号(NR3C1)	0.338
4	基质金属蛋白酶 1(MMP1)	0.352
5	多囊肾病相关蛋白 1(PKD1)	0.365
6	含 TCP1 的伴侣蛋白,亚单位 6A(CCT6A)	0.403
7	组织蛋白酶 D(CTSD)	0.418
8	MMSET 型 1(WHSC1)	0.420
9	缬氨酰 tRNA 合成酶 2(VARS2)	0.426
10	钙激活蛋白酶小亚单位 1(CAPNS1)	0.428
11	甲状球蛋白(TG)	0.430
12	白介素 7 受体(IL7R)	0.433
13	孕激素诱导蛋白(DD5)	0.438
14	与 κ B 结合蛋白相关的核因子(NFR κ B)	0.444
15	推定蛋白 FLJ20432	0.448
16	肌管球蛋白相关蛋白 8(MTMR8)	0.458
17	激酶锚定蛋白 12(AKAP12)	0.458
18	结肠癌抗原 3(SDCCAG3)	0.458
19	视网膜母细胞瘤 1(RB1)	0.459
20	肾上腺素氧化酶 A(MAOA)	0.467
21	未知蛋白 KIAA1723	0.472
22	蛋白激酶抑制物 α (PKIA)	0.479
23	白介素 3 受体 α (IL3RA)	0.483
24	细胞色素 P450, 亚家族 XI A(CYP11A)	0.485
25	细胞周期蛋白激酶(CDKL2)	0.487
26	S100 钙结合蛋白 A11(S100A11)	0.495

3 讨论

研究显示丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝纤维化及肝细胞癌(HCC)的发生密切相关, 其中病毒编码的 NS5A 蛋白起着重要的作用. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. 由于 NS5A 表现出对抗干扰素 α (IFN α) 的治疗效应而引起人们广泛的关注, NS5A 能够与肝细胞中的 IFN 刺激蛋白 - 双链 RNA 依赖的激酶(PKR)相互作用, 抑制 PKR 的功能, 从而下调 IFN 刺激的抗病毒效应^[15,16]. Kato et al^[19,20]研究发现, NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征, 但是其参与细胞转录调节的机制仍不十分清楚. 一般来说, 转录的反式激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 定位于细胞内质网, 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号传导途径. NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用^[28]. Ghosh et al^[29]研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21^{WAF1}, 激活

人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能.

因基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到两组组织或细胞基因表达谱的差异, 故在 HCV 感染及其致癌机制的研究中具有重要的应用价值. Girard et al^[30]应用基因芯片技术, 对于转染了 NS5A 蛋白的肝癌细胞系在受干扰素刺激后的基因表达谱变化进行了研究. 他们发现 50 种基因的表达水平变化在 2 倍以上, 41 种表达上调, 9 种表达下降. 其中表达影响最大的基因是 OAS-p69. 表达 NS5A 的肝癌细胞系 Huh7 中 IL-8 的表达水平显著上调. 向 Huh7 培养系统中加入白介素 8(IL-8), 就象转染 NS5A 基因一样, 抑制干扰素诱导的抗病毒活性, 包括下调 OAS-p69 基因的表达. 本实验我们用分子生物学技术构建了 NS5A 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A, 并用空载体作为阴性对照, 利用脂质体转染 HepG2 细胞, 之后从中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 进行基因芯片技术分析. 结果表明, 28 种基因的表达水平上调, 26 种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号传导、免疫调节、肿瘤发生等基因, 其中在上调基因中, 有多条基因与免疫调节相关, 如淋巴细胞性白血病缺失因子 2、B 细胞 CLL/淋巴瘤 10 因子及斯库瓦诺明相互作用蛋白 1, 斯库瓦诺明是负性生长调节因子, 可以与肝细胞生长因子调节的酪氨酸激酶作用底物(HRS)相互作用, 发挥其生物功能^[31], 而 cAMP 依赖调控的蛋白激酶的表达增强则提示 NS5A 在细胞信号转导的重要步骤中可能起着一定作用. 在下调基因中, 钙激活蛋白酶、白介素 7 受体、白介素 3 受体、细胞周期蛋白激酶、S100 钙结合蛋白、蛋白激酶抑制物及 κ B 结合蛋白相关的核因子的差异表达表明 NS5A 与细胞信号传导, 细胞周期调节及免疫调节有关. 将这一结果与应用 SSH 技术对 NS5A 反式调节基因的结果比较, 发现都有未知蛋白 KIAA1641 的上调表达, 我们下一步将对这一未知蛋白进行更深入的研究.

总之, 本研究的结果表明, NS5A 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 基因芯片技术是研究反式调节基因的有效技术. 他为我们进一步深入研究 NS5A 的反式调节基因及其抗干扰素治疗的机制打下了重要基础.

4 参考文献

- Zandman-Goddard G, Levy Y, Weiss P, Shoenfeld Y, Langevitz P. Transverse myelitis associated with chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21:111-113
- Moriguchi H, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection. *Gastroenterology* 2003;124:1166-1167
- Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, Dhali GK, Chaudhuri S, Maity SG, Naik TN, Bhattacharya SK, Mazumder DN. Hepatitis C virus infection in the general population: A com-

- munity-based study in west bengal, India. *Hepatology* 2003; 37:802-809
- 4 Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. Racial differences in the relationship between hepatitis C infection and iron stores. *Hepatology* 2003;37:795-801
 - 5 Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
 - 6 Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
 - 7 Chen S, Wang Y. Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002; 16:219-222
 - 8 Hui CK, Belaye T, Montegrando K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
 - 9 Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
 - 10 Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
 - 11 Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013
 - 12 Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T, Daub H. Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003;84:555-560
 - 13 Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 2003; 148:237-251
 - 14 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592:193-204
 - 15 Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002; 76:11079-11090
 - 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
 - 17 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
 - 18 成军. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:999-1003
 - 19 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997; 71:8856-8859
 - 20 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
 - 21 刘妍,段惠娟,成军,王建军,陆荫英,牟劲松,王琳,张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活 SV40 病毒启动子的研究. *军医进修学院学报* 2003;28:40
 - 22 刘妍,陆荫英,成军,王建军,李莉,张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2003;28:40-43
 - 23 Jain KK. Current trends in molecular diagnostics. *Med Device Technol* 2002;13:14-18
 - 24 Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Walmsley A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarray platform. *Biosens Bioelectron* 2003;18:175-184
 - 25 Barsky V, Perov A, Tokalov S, Chudinov A, Kreindlin E, Sharonov A, Kotova E, Mirzabekov A. Fluorescence data analysis on gel-based biochips. *J Biomol Screen* 2002;7:247-257
 - 26 Chan K, Baker S, Kim CC, Detweiler CS, Dougan G, Falkow S. Genomic comparison of salmonella enterica serovars and salmonella bongori by use of an S. enterica serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 2003;185: 553-563
 - 27 Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
 - 28 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddigui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
 - 29 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
 - 30 Girard S, Shalhoub P, Lescure P, Sabile A, Misek DE, Hanash S, Brechot C, Beretta L. An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis. *Virology* 2002;295:272-283
 - 31 Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G. Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 Proteins. *Mol Cell Biol* 2000;20:1699-1712

应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室 北京市 100039
洪源, 男, 1974-12, 福建省莆田市人, 汉族. 1998年毕业于第四军医大学军医系, 获医学学士学位, 目前在解放军军医进修学院攻读内科学硕士学位, 主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制.
国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Genes trans-regulated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus with microarray assay

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

Yuan Hong, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhonglu, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To study of genes trans-regulated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus by microarray.

METHODS: The recombinant expression plasmid pcDNA3.1(-)-MHBst was constructed, and HepG2 cells were transfected. Total mRNA was isolated from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3-MHBst, respectively. Microarray was employed for detecting and analyzing of both mRNA from the HepG2 cells.

RESULTS: After transfecting HepG2 cells, it was found 14 genes had been up-regulated, and 23 genes down-regulated. Their encoding proteins were involved in cell signal transduction, cell proliferation and differentiation.

CONCLUSION: Microarray technology is successfully used to screen the genes trans-regulated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus, which brings some new clues for studying the trans-regulated and immune regulation mechanism of MHBst.

Hong Y, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Wang JJ. Genes trans-regulated by C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus with microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):943-946

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原截短型中蛋白(MHBst)的反式调节基因。

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

结果: HepG2细胞经转染MHBst后, 有37条差异基因表达, 其中14条基因表达增强, 23条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白的反式调节基因, 为进一步阐明乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):943-946
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/943.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是慢性肝病的重要病原体, 且是引发肝细胞癌(HCC)的重要因素^[1-10], 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间的相互作用, 可能是病毒致癌的重要分子机制^[11-20]. 近年研究发现, 在肝癌细胞系或肝癌组织, 甚至是慢性乙型肝炎患者外周血中存在一种变异的病毒表面中蛋白, 与野生型病毒比较, 蛋白的羧基末端存在不同程度的缺失, 即截短型表面抗原中蛋白(MHBst). 研究证明, MHBst能影响多种细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 具有广泛的反式激活作用^[23-25]. 我实验室成功地证明了MHBst¹⁶⁷具有反式激活SV40病毒早期启动子/增强子的作用^[26,27], 并应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对MHBst的反式调节基因进行了初步的研究^[28].

基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)是由大量目的基因片段有序、密集地固定于玻片或尼龙膜上而制成芯片, 将两组组织或细胞的mRNA逆转录成cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一

位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因^[29]. 为从不同角度对MHBst的反式调节基因进行验证及了解MHBst对于肝细胞基因表达谱的影响, 探索肝细胞癌发生的分子生物学机制, 我们决定应用基因表达谱芯片技术检测肝癌细胞系在MHBst基因转染后差异表达的基因谱的变化.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂Trizol购自Gibco公司, FuGENE购自Roche公司, 乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白真核表达质粒由本室构建^[26]. 表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和取材 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时, 以脂质体转染试剂FuGENE分别将2 μ g pcDNA3.1(-)-MHBst和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞, 48 h后收获细胞, 每 5×10^6 个细胞加入1 mL Trizol试剂, 立即于液氮中保存.

1.2.2 总RNA提取 使用Trizol试剂一步法提取乙型肝炎病毒表面抗原截短型中蛋白表达质粒pcDNA3.1(-)-MHBst和空载体pcDNA3.1(-)转染的HepG2细胞总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行热稳定实验, 于-20 $^{\circ}$ C和70 $^{\circ}$ C保温1 h后, 经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化.

1.2.3 探针标记 参照Schena et al^[29]方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μ g), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在20 μ L 5 \times SC+2 g/L SDS杂交液中.

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

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

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性2 min; 芯片置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性30 s, 芯片取出浸于无水乙醇30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用Parafilm密封, 放入42 $^{\circ}$ C杂交箱内杂交过夜(16-18 h). 依次以2 \times SC+2 g/L

SDS、1:1 000 SSC +2 g/L SDS、1:1 000 SSC洗涤10 min, 室温晾干.

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

2 结果

2.1 总RNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度A260/A280>1.92, 热稳定实验70 $^{\circ}$ C保温1 h与-20 $^{\circ}$ C 1 h的电泳条带比较, 显示28 S条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1 152个cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因, 共8个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从1 152个基因中筛选出差异表达基因共37条, 占3.7%, 其中14条基因表达增强, 23条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 表达增强的基因有14条(表1), 表达降低的基因有23条(表2).

表1 部分表达显著增加的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	肽基脯氨酸异构酶 D(peptidylprolyl isomerase D)	2.023
2	泛素特异性蛋白酶 5(ubiquitin specific protease 5)	2.035
3	半胱氨酸内肽酶(cysteine endopeptidase)	2.051
4	核仁 GTP 水解酶(nucleolar GTPase)	2.066
5	可溶性鸟氨酸环化酶 1- β 3(guanylate cyclase 1, soluble, beta 3)	2.070
6	CD33 抗原 L1(CD33 antigen L1)	2.083
7	FK506 结合蛋白相关蛋白(FKBP-associated protein)	2.139
8	人 T 细胞淋巴瘤病毒(I 型)结合蛋白 1(human T-cell leukemia virus type I binding protein 1)	2.144
9	未知蛋白 KIAA0583	2.174
10	成纤维细胞生长因子受体 2(fibroblast growth factor receptor 2)	2.248
11	P53 结合蛋白(p53-binding protein)	2.362
12	RET 指蛋白(RET finger protein)	2.386
13	TNF 受体相关因子 3(TNF-receptor associated factor-3)	2.437

表2 部分表达显著降低的基因

编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	蛋白酶体激活亚单位 1(proteasome activator subunit 1)	0.228
2	巨噬细胞幼红细胞黏附蛋白(macrophage erythroblast attacher)	0.310
3	谷氧还蛋白(glutaredoxin)	0.326
4	高速泳动族蛋白 17(high-mobility group protein 17)	0.356
5	死亡相关蛋白 6(death-associated protein 6)	0.394
6	70 kD 热休克蛋白 1A(heat shock 70 kD protein 1A)	0.405
7	CD14 抗原(CD14 antigen)	0.419
8	质膜钙迁移 ATP 酶(ATPase, Ca ²⁺ transporting, plasma membrane 1)	0.430
9	G 蛋白结合蛋白(G protein-binding protein)	0.431
10	核糖体蛋白 L34(ribosomal protein L34)	0.433
11	雌激素调控的 LIV-1 蛋白(LIV-1 protein, estrogen regulated)	0.434
12	钙激活蛋白酶小亚单位 1(calpain, small subunit 1)	0.448
13	153 kD 核孔蛋白(nucleoporin 153 kD)	0.470
14	可溶性鸟苷酸环化酶 1- α 3(guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3)	0.473
15	v-raf 鼠肉瘤 3611 病毒致癌基因同系物 1(v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1)	0.474
16	105 kD 热休克蛋白(heat shock 105 kD protein)	0.478
17	与增生相关的 mago-nashi 同系物(mago-nashi homolog, proliferation-associated)	0.488
18	磷酸甘油酸脱氢酶(phosphoglycerate dehydrogenase)	0.488
19	热休克蛋白 75(heat shock protein 75)	0.496
20	核糖体蛋白 S5(ribosomal protein S5)	0.499

3 讨论

乙型肝炎病毒感染后致癌的分子生物学机制还不十分清楚, 其中病毒编码的蛋白能够影响肝细胞基因表达谱从而影响细胞生长调节可能是主要因素. 近年来的研究^[23,24]发现截短型前 S2/S 基因的表达产物羧基末端截短型分子 -MHBst 具有反式调节作用. MHBst 于全长病毒中蛋白(MHBs)的羧基末端缺失一定数量的氨基酸残基, 由于结构的改变, MHBst 具备内质网定位功能, 能在内质网中滞留, 而不象 MHBs 那样进入高尔基复合体而分泌. 可能正是这一原因, 使 MHBst 能够发挥广泛的反式调节效应. Natoli et al^[24] 研究证实 MHBst 可发生蛋白激酶 C(PKC)依赖的磷酸化反应, 其前 -S2 区与 PKC 结合, 触发 PKC 依赖的 c-Raf-1/MAP2- 激酶信号传导链式反应, 激活了 AP-1、NF- κ B、AP-2、SRE、Sp1 等转录因子和 c-myc、c-fos 启动子, 从而诱发炎症反应及肝细胞癌. 因此研究 MHBst 的反式激活功能及其反式调节基因, 有利于阐明 HBV 感染的慢性化和肝细胞癌形成的机制, 同时也可探索更为有效的治疗方法. 本实验选择的的目的基因是编码缺失羧基末端 167 个氨

基酸残基的 MHBst(MHBst¹⁶⁷)序列, 该序列已由我室证明具有反式激活 SV40 早期启动子/增强子的作用^[26,27], 并已应用抑制性消减杂交技术对 MHBst 的反式调节基因进行了初步的研究^[28].

基因表达谱芯片技术^[30,31]是将大量的基因或 cDNA 片段固定在一块玻片上, 利用核酸杂交这一特性, 对不同组织或细胞的 mRNA 或 cDNA 进行荧光检测, 从而对这些基因表达个体的特异性进行综合分析和判断. 本实验我们用分子生物学技术构建了 MHBst 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-MHBst, 并用空载体作为阴性对照, 利用脂质体转染 HepG2 细胞, 之后从中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 进行基因芯片技术分析. 结果表明, 14 种基因的表达水平上调, 23 种基因的表达水平下调. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等基因, 其中在上调基因中, 有多条基因与免疫调节相关, 如肿瘤坏死因子(TNF)受体相关因子 3、FK506 结合蛋白; 而 p53 结合蛋白基因和人 T 细胞淋巴瘤病毒结合蛋白 1 基因的表达增强则提示 MHBst 在细胞凋亡及肿瘤发生中可能起着一定的作用. 在下调基因中, G 蛋白结合蛋白、核糖体蛋白、鸟苷酸环化酶、钙激活蛋白酶、高速泳动族蛋白、磷酸甘油酸脱氢酶等的差异表达表明 MHBst 与细胞信号传导, 细胞生长调节有关. 将这一结果与早期应用 SSH 对 MHBst 反式调节基因的研究结果相比较, 发现都有核糖体蛋白及高泳动类蛋白的差异表达. 对这些研究结果的分析表明, MHBst 对于肝细胞的基因表达谱有显著的影响, 基因芯片技术是研究基因表达谱改变的有效分析技术. 他为我们进一步深入研究 MHBst 的反式调节基因及其致癌机制打下了重要基础.

4 参考文献

- 1 Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DK, Hui CK, Wong BC, Chan AO, Lai CL. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37:562-567
- 2 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124: 327-334
- 3 Hino O, Kajino K, Umeda T, Arakawa Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002; 37:883-887
- 4 Ni YH, Chang MH, Hsu HY, Tsuei DJ. Different hepatitis B virus core gene mutations in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003;52:122-125
- 5 ElSaadany S, Tepper M, Mao Y, Semenciw R, Giulivi A. An epidemiologic study of hepatocellular carcinoma in Canada. *Can J Public Health* 2002;93:443-446
- 6 Kobayashi S, Saigoh K, Urashima T, Endoh M, Matsusita K, Katoh M, Asano T, Isono K. Frequent PCR detection of HBV x gene in excised hepatocellular carcinoma tissues as compared with HCV-RNA identification. *Nippon Rinsho* 1995;53 (Suppl 2):730-734
- 7 Matsushima S, Hayashi N. Mutation of the hepatitis B virus pre C region in hepatocellular carcinoma and nontumoral liver tissues. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl 2):723-729

- 8 Takeuchi M, Okamoto E, Fujimoto J. Detection of HBV-DNA from hepatocellular carcinoma by polymerase chain reaction. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl 2):718-722
- 9 Zanella I, Rossini A, Domenighini D, Albertini A, Cariani E. Real-time quantitation of hepatitis B virus (HBV) DNA in tumorous and surrounding tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2002;68:494-499
- 10 Cheng J. Molecular mechanisms of hepatitis virus-hepatocyte interactions. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S342-S343
- 11 Jayshree RS, Sridhar H, Devi GM. Surface, core, and X genes of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma: an in situ hybridization study. *Cancer* 2003;25:63-67
- 12 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. *中华肝病杂志* 2001;9:163-165
- 13 Weis NM, Krogsaard K. Hepatitis B-a viral oncogene? *Ugeskr Laeger* 2002;164:5940-5944
- 14 Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002;182:43-47
- 15 Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:443-447
- 16 Trere D, Borzio M, Morabito A, Borzio F, Roncalli M, Derenzini M. Nucleolar hypertrophy correlates with hepatocellular carcinoma development in cirrhosis due to HBV infection. *Hepatology* 2003;37:72-78
- 17 Lara-Pezzi E, Gomez-Gavira MV, Galvez BG, Mira E, Iniguez MA, Fresno M, Martinez-AC, Arroyo AG, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110:1831-1838
- 18 Chung TW, Moon SK, Lee YC, Kim JG, Ko JH, Kim CH. Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 by hepatitis B virus infection in liver cells. *Arch Biochem Biophys* 2002;408:147-154
- 19 Urashima T, Saigo K, Kobayashi S, Matsubara H, Koide Y, Asano T, Isono K, Kondo F, Kondo Y. Integration of hepatitis B virus and its significance in hepatocarcinogenesis. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl 2):735-739
- 20 Shen LJ, Zhang ZJ, Zhang HX, Yang WB, Huang R. Expression of GST-pi and HBV infection in hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2002;21:29-32
- 21 Baba M, Nagai H. Molecular biological characteristics of model cells of hepatitis B virus (HBV)-induced direct hepatocellular carcinogenesis. *Nippon Rinsho* 1995;53(Suppl 2):97-103
- 22 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
- 23 Caselmann WH, Renner M, Schluter V, Hofschneider PH, Koshy R, Meyer M. The hepatitis B virus MHBst167 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 6):1487-1495
- 24 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
- 25 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
- 26 刘妍,成军,董菁,李克,夏小兵,王刚,杨继珍,王琳. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 27 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
- 28 刘妍,成军,张跃新,段惠娟,牟劲松,李克,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
- 29 Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- 30 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 31 Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066

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

• 消息 •

世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册

本刊讯 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品 (第 16 类), 获得商标注册。

世界华人消化杂志®注册有效期限自公元 2002-11-14 至 2012-11-13 止.商标注册证第 2001071 号。

World Journal of Gastroenterology®注册有效期限自 2002-11-14 至 2012-11-13 止.商标注册证第 2001158 号。

(世界胃肠病学杂志社 2002-12-18)

丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白Wee1基因表达研究

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 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 100039
王建军, 男, 汉族, 1975-06生, 吉林省通化市人, 1999年毕业于第一军医大学, 现为军医进修学院2001级内科传染病学专业硕士研究生, 主要从事肝炎病毒蛋白的反式调节作用研究。
国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, No. C03011402
归国留学人员科研启动基金资助项目, No. 98H038
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: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Up-regulating effect of hepatitis C virus core protein on expression of cell cycle gene Wee1

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Yan-Jie Yang

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Yan-Jie Yang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C39970674, No. C03011402, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038.
Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhonglu, Beijing 100039, China. cj@GeneTherapy.com.cn
Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To investigate the transactivating effect of HCV core protein on Wee1 gene and the molecular biological mechanisms of HCV core protein in HCV pathogenicity.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify the sequence of Wee1 promoter from HepG2 genomic DNA, and the product was cloned into pGEM-T vector. The Weep gene was cut from T-Weep by KpnI and XhoI, and then cloned into pCAT3 basic, named pCAT3-Weep. pCAT3-Weep was transfected into the hepatoblastoma cell line HepG2 and cotransfected HepG2 cells with pcDNA3.1(-)-core by FuGENE 6 transfection reagents. The HepG2 cells transfected with pCAT3-basic was used as negative control. The activity of CAT in HepG2 cells transfected was detected by an ELISA kit after 48 hours, which reflected the transactivating function of HCV core protein to Wee1 gene promoter.

RESULTS: The expressive vector pcDNA3.1(-)-core and report vector pCAT3-Weep have been constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The expression of CAT in Hep G2 cells transfected with pCAT3-Weep and pcDNA3.1(-)-core was 3.4 times as higher as that of pCAT3-basic, and 2.3 times as higher as that of pCAT3-Weep.

CONCLUSION: It is suggested that HCV core protein can transactivate cell cycle gene Wee1 promoter, and then upregulate the expression of the gene.

Wang JJ, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Yang YJ. Up-regulating effect of hepatitis C virus core protein on expression of cell cycle gene Wee1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):947-950

摘要

目的: 了解丙型肝炎病毒核心蛋白和细胞周期调节蛋白Wee1基因表达的关系, 研究HCV核心蛋白在HCV致病的分子生物学机制中的作用。

方法: 应用聚合酶链反应(PCR)扩增Wee1基因启动子, 命名为Weep。以T-A克隆法, 将Weep基因片段连入载体pGEM-T。将获得的质粒pT-Weep, 与报告质粒pCAT3-basic分别用KpnI和XhoI双酶切后构建Wee1启动子报告载体pCAT3-Weep, 分别以重组报告载体pCAT3-Weep和pcDNA3.1(-)-core瞬时转染HepG2细胞, 以转染pCAT3 basic的HepG2细胞为阴性对照, 48 h后收获细胞。应用酶联免疫黏附方法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性, 以了解HCV核心蛋白对Wee1基因启动子的反式激活作用。

结果: 构建的表达载体pcDNA3.1(-)-core和报告载体pCAT3-Weep经过序列分析和酶切鉴定正确。pCAT3-Weep和pcDNA3.1(-)-core瞬时转染的HepG2细胞的CAT表达活性是CAT3空载体的3.4倍, pCAT3-Weep的2.3倍。

结论: 丙型肝炎病毒核心蛋白可反式激活Wee1基因启动子, 进而上调细胞周期调节基因Wee1的表达。

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白Wee1基因表达研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):947-950
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/947.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组含有单一的开放读码框架, 编码3 010-3 033个氨基酸残基的多肽前体, 两侧是5'-非翻译区及3'-非翻译区。多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt)编码的21 kD HCV核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 在HCV致病过程中可能起着重要的作用^[1-5], 最近研究其与HCV感染后脂肪肝的形成也有一定关系^[6-8]。

本研究采用基因重组技术构建 pCAT3-Weep、pcDNA3.1(-)-core 报告基因载体,应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统,测得下游 CAT 基因的表达增强.证明 HCV 核心蛋白可上调 Wee1 启动子活性,进而上调 Wee1 基因的表达,从而为研究 HCV 致病的分子生物学机制提供了证据.

1 材料和方法

1.1 材料 菌种及细胞株:重组表达载体 pcDNA3.1(-)-core 为本室构建,人肝母细胞瘤细胞系 Hep G2 细胞及大肠杆菌 JM109 菌株为本室保存.工具酶:Tag DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均购自 Takara 公司.试剂盒:质粒 DNA 提取试剂盒,中间载体 pGEM-T 及报告质粒 pCAT3-basic 均购自 Promega 公司;CAT-ELISA 检测试剂盒及质粒 DNA 转染试剂盒购自 Roche 公司.其他生化试剂购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增与纯化以 Hep G2 细胞基因组 DNA 为模板,设计引物.在上下游引物的 5' 端分别引入 KpnI 和 XhoI 单一酶切位点,上游引物 P1: 5' -GGT ACC TGA GAC CAG CCT GCC AAC AT - 3'.下游引物 P2: 5' -GAA TTC ATG TGC TTA GGC TGG ACA CTG - 3', PCR 扩增包含 Wee1 基因启动子全序列的 DNA 片段,PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,切胶,回收纯化,命名为 Weep.

1.2.2 CAT3 报告载体的构建、纯化和 DNA 测序以 T-A 克隆法,用 T4 DNA 连接酶将 Weep 基因片段连入载体 pGEM-T.将获得的质粒 pT-Weep 和报告质粒 pCAT3-basic 分别用 KpnI 和 XhoI 双酶切后用 T4 DNA 连接酶进行定向连接,产物转化 JM109 宿主菌,筛选抗氨苄青霉素阳性菌落;提取质粒,再次双酶切及 PCR 鉴定正向插入克隆,命名为 pCAT3-Weep.

1.2.3 真核表达载体的鉴定将 pcDNA3.1(-)-core 质粒分别进行 EcoRI/BamHI 双酶切和 HindIII 单酶切及 PCR 鉴定.PCR 鉴定核心基因的上下游引物分别为:5' -C GCA GAA TTC ATG AGC ACG AAT CCT AA-3', 5' -AT ATG GAT CCA GGC TGA AGC GGG CAC A-3'.DNA 测序由上海博亚公司完成.

1.2.4 细胞转染及 Weep 活性检测磁珠法提取质粒 pCAT3-Weep 以备转染,以标准方案培养 Hep G2 细胞.具体转染方法参照转染说明书进行.转染 48 h 后收集细胞,收集细胞裂解液,用于 CAT 活性检测.

1.2.5 pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-Weep 共转染实验pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-Weep 共转染 Hep G2 细胞,同时以转染 pCAT3-Weep 的 Hep G2 细胞作阴性对照.转染 48 h 后,收集细胞裂解液,用于 CAT 活性检测.所有实验严格平行操作.

1.2.6 CAT 含量检测按照试剂盒说明书进行.取 1.0 ng/mL 的 CAT 标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液 200 μ L 加入

已包被抗体的 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 温育 2 h,再依次加入第一抗体(地高辛标记的抗 -CAT)、第二抗体(耦联有过氧化物酶的地高辛抗体抗 -DIG-POD)200 μ L 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后,加入过氧化物酶的底物室温显色 10-30 min.用酶标仪检测标本在 415 nm 波长的吸光度,其数值反映细胞提取物中的 CAT 表达水平.以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照.

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 pCAT3-Weep 鉴定电泳图谱如图 1 所示,构建的中间载体 pT-Weep 以 XhoI/KpnI 双酶切电泳图谱为两条带:988 bp(Weep 基因片段)、3 015 bp(pGEM-T 空载体);DNA 测序证实重组质粒含有 988 bp 的目的基因,读码框架正确.重组质粒 pCAT3-Weep 分别以 XhoI/KpnI 双酶切及 PCR 鉴定均显示 988 bp 正向插入条带.说明重组质粒 pCAT3-Weep 构建正确.

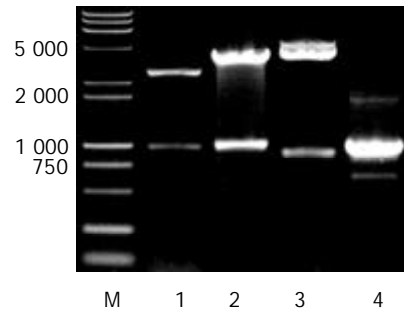


图1 pCAT3-Weep 鉴定电泳图谱.1 pT-Weep XhoI/KpnI 双酶切;2 pCAT3-Weep XhoI/KpnI 双酶切;3 pCAT3-Weep Pst I 单酶切;4 质粒 PCR 产物;M DNA Marker(15 000 bp+2 000 bp).

2.2 表达质粒的鉴定 pcDNA3.1(-)-core 鉴定电泳图谱如图 2 所示,双酶切显示两条带(4 900 bp 空载体和 573 bp HCV core 基因片段),单酶切为约 5 500 bp 一条带(4 900 bp+573 bp).以 pcDNA3.1(-)-core 质粒作模板,PCR 可见 573 bp 的产物.测序证实该重组质粒读码框架正确.

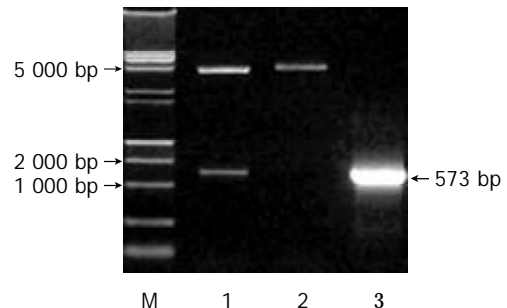


图2 pcDNA3.1(-)-core 鉴定电泳图谱.1 EcoRI/BamHI 双酶切;2 HindIII 单酶切;3 质粒 PCR 产物;M DNA Marker(15 000 bp+2 000 bp).

2.3 重组质粒 pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-Weep 共转染实验结果空载体对照组 pCAT3 basic 的 CAT 的吸光度值为 0.047, pCAT3-Weep 的 CAT 的吸光度值为 0.069,共转染 pcDNA3.1(-)-core / pCAT3-Weep 的 Hep G2 细胞 CAT 的吸光度值为 0.160,共转染 pcDNA3.1(-)-core /

pCAT3-Weep CAT 的表达明显增强, 是 CAT3 空载体的 3.4 倍, 是 pCAT3-Weep 的 2.3 倍, 说明 HCV 核心蛋白对 Wee1 基因启动子有反式激活作用, 转录激活 Wee1 基因启动子的活性, 使其下游 CAT 基因的表达增强(图 3).

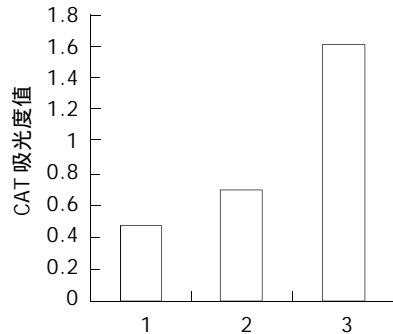


图3 CAT酶表达结果. 1 pCAT3 basic; 2 pCAT3-Weep; 3 pcDNA3.1(-)-core + pCAT3-Weep(纵轴为 CAT 吸光度值).

3 讨论

丙肝病毒核心蛋白除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能. 临床和实验研究显示HCV感染与 HCC 发生发展过程密切相关^[1-5], 其中病毒核心蛋白起到重要的作用. 早期研究认为, HCV 属于非整合性 RNA 病毒, 与产生两种确定作用的反式激活子(X 和截短的 preS/S)的 HBV 不同^[9], 并不存在直接致癌的病毒蛋白. 后来研究证实核心蛋白也是一种反式激活蛋白, 甚至其作用还要超过 X 蛋白^[10-13]. 核心蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是 NF- κ B、AP-1 和 SRE 相关途径具有明显的增强作用^[10]; 在 HepG2 细胞中, 核心蛋白激活人类 c-myc 基因、RSV LTR 和 SV40 早期启动子^[14]; 核心蛋白还能抑制或增强 p53 基因启动子功能^[15,16], 这些证据表明核心蛋白具有潜在的致癌作用. 核心蛋白转基因小鼠发生 HCC 病理学特征直接证明了核心蛋白的这种作用^[17]. 近来研究还发现HCV核心蛋白可与细胞内的一些细胞凋亡因子作用, 促进细胞凋亡^[18-23].

Wee1 蛋白为一种细胞周期调节蛋白. Wee1 激酶主要通过阻断M期启动因子(MPF), 包括cdc2 激酶和细胞周期蛋白 B, 特异性的调控细胞 G2/M 的转换, 抑制细胞的有丝分裂^[24]. 既往研究发现, Wee1 激酶的活性和水平在S期均升高, 在细胞进入M期时则很快下降^[25,26]. 关于Wee1激酶细胞周期内水平变化的机制, 有人认为: 在M期 nim1/cdr1 引起 Wee1 激酶催化区域磷酸化使其活性下降^[27-29]. 也有人认为是Wee1激酶合成的减少和降解增加导致 Wee1 激酶水平下降, 降解增加是由 cdc34 介导的, 并且 Wee1 激酶的降解对于细胞有丝分裂的起始十分必要^[30]. 在 S 期 Wee1 激酶合成增加, 但具体机制不明. 由于当 DNA 的复制被阻断时, Wee1 激酶的降解就被抑制, 在进入 DNA 复制期间有一种因子可以使 Wee1 激酶保持持续的高水平直至进入 M 期, 推测这

种因子即 c-Fos/AP-1^[30].

本研究采用基因重组技术, 自 Wee1 基因上游自碱基 ATG 上推 976 个碱基, 以 Hep G2 细胞基因组 DNA 为模板, 设计引物. 在上下游引物的 5' 端分别引入 KpnI 和 XhoI 单一酶切位点, 上游引物 P1: 5' -GGT ACC TGA GAC CAG CCT GCC AAC AT - 3'. 下游引物 P2: 5' -GAA TTC ATG TGC TTA GGC TGG ACA CTG - 3', PCR 扩增包含 Wee1 基因启动子全序列的 DNA 片段, 命名为 Weep. 构建 pCAT3-Weep 报告基因载体, 应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统, 与 pcDNA3.1(-)-core 共转染 Hep G2 细胞, 测得共转染 pcDNA3.1(-)-core / pCAT3-Weep CAT 的表达明显增强, 是 CAT3 空载体的 3.4 倍, 是 pCAT3-Weep 的 2.3 倍, 说明 HCV 核心蛋白对 Wee1 基因启动子有反式激活作用, 转录激活 Wee1 基因启动子的活性. 证明 HCV 核心蛋白可上调 Wee1 启动子活性, 进而上调 Wee1 基因的表达, 从而为研究HCV致病的分子生物学机制提供了证据.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-42
- 2 姚杰, 贾战生. 丙型肝炎病毒 E2 包膜糖蛋白的研究近况. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:339-342
- 3 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 4 焦成松, 周永兴. 丙型肝炎病毒细胞模型研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:105-109
- 5 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
- 6 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 A1 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 7 成军, 任进余, 李莉, 陆志耀, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 8 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 9 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
- 10 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;11:5-10
- 11 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 12 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 13 Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 14 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 15 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- 16 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141

- 17 Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med* 1998;4:1065-1067
- 18 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
- 19 Honda A, Hatano M, Kohara M, Arai Y, Hartatik T, Moriyama T, Imawari M, Koike K, Yokosuka O, Shimotohno K, Tokuhisa T. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol* 2000;33:440-447
- 20 Rubbia-Brandt L, Taylor S, Gindre P, Quadri R, Abid K, Spahr L, Negro F. Lack of in vivo blockade of Fas-and TNFR1-mediated hepatocyte apoptosis by the hepatitis C virus. *J Pathol* 2002;197:617-623
- 21 Farooq M, Kim Y, Im S, Chung E, Hwang S, Sohn M, Kim M, Kim J. Cloning of BNIP3h, a member of proapoptotic BNIP3 family genes. *Exp Mol Med* 2001;33:169-173
- 22 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911
- 23 Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenberg A. Nix and Nip3 form a subfamily of proapoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 1999;274:7-10
- 24 Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990;344:503-508
- 25 Watanabe N, Broome M, Hunter T. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J* 1995;14:1878-1891
- 26 Michael WM, Newport J. Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science* 1998;282:1886-1889
- 27 Coleman TR, Tang Z, Dunphy WG. Negative regulation of the Wee1 protein kinase by direct action of the nim1/cdr1 mitotic inducer. *Cell* 1993;72:919-929
- 28 Parker LL, Walter SA, Young PG, Piwnicka-Worms H. Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. *Nature* 1993;363:736-738
- 29 Wu L, Russell P. Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature* 1993;363:738-741
- 30 Kawasaki H, Komai K, Ouyang Z, Murata M, Hikasa M, Ohgiri M, Shiozawa S. c-Fos/activator protein-1 transactivates Wee1 kinase at G(1)/S to inhibit premature mitosis in antigen-specific Th1 cells. *EMBO J* 2001;20:4618-4627

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

• 消息 •

中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(2002-11-08)

丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 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 100039
王建军, 男, 汉族, 1975-06 生, 吉林省通化市人, 1999 年毕业于第一军医大学, 现为军医进修学院 2001 级内科学专业硕士研究生, 主要从事肝炎病毒蛋白的反式调节作用研究。

国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, No. C03011402
归国留学人员科研启动基金资助项目, No. 98H038

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: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Upregulating effect of hepatitis C virus core protein on NIP3 gene

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Yan-Jie Yang

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

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C39970674, No. C03011402, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038.

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

Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: To investigate the transactivating effect of HCV core protein on NIP3 gene and the molecular biological mechanisms of HCV core protein in HCV pathogenicity.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify the sequence of NIP3 promoter from HepG2 genomic DNA, and the product was cloned into pGEM-T vector. The NIPP gene was cut from T-NIPP by SacI and Bgl, and then was cloned into pCAT3 basic, named pCAT3-NIPP. pCAT3-NIPP was transfected into the NIH3T3 cell line and cotransfected NIH3T3 cells with pcDNA3.1(-)-core by FuGENE 6 transfection reagents. The NIH3T3 cells transfected with pCAT3-basic as negative control. The activity of CAT in NIH3T3 cells transfected was detected by an ELISA kit after 48 hours, which reflect the transactivating function of HCV core protein to NIP3 gene promoter.

RESULTS: The expressive vector pcDNA3.1(-)-core and report vector pCAT3-NIPP have been constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The expression of CAT in NIH3T3 cells transfected with pCAT3-NIPP and pcDNA3.1(-)-core was 3.6 times as higher as that of pCAT3-basic, and 1.9 times as higher as that of pCAT3-NIPP.

CONCLUSION: It is suggested that HCV core protein can transactivate NIP3 gene promoter and upregulate the expression of NIP3 gene.

Wang JJ, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Yang YJ. Upregulating effect of hepatitis C virus core protein on NIP3 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):951-954

摘要

目的: 了解丙型肝炎病毒核心蛋白和NIP3基因的表达的关系, 研究HCV核心蛋白在HCV致病的分子生物学机制中的作用。

方法: 聚合酶链反应(PCR)扩增NIP3基因启动子, 以T-A克隆法, 将NIPP基因片段连入载体pGEM-T. 获得的质粒pT-NIPP, 和报告质粒pCAT3-basic 分别用 SacI 和 Bgl II 双酶切后构建报告载体pCAT3-NIPP, 分别以重组报告载体pCAT3-NIPP和pcDNA3.1(-)-core应用FuGENE 6 转染试剂瞬时转染 NIH3T3 细胞, 以转染 pCAT3 basic 的 HepG2 细胞为阴性对照, 48 h 后收获细胞. 应用酶联免疫黏附方法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性, 以了解 HCV 核心蛋白对 NIP3 基因启动子的反式激活作用。

结果: 构建的表达载体 pcDNA3.1(-)-core 和报告载体 pCAT3-NIPP 经过序列分析和酶切鉴定正确. pCAT3-NIPP 和 pcDNA3.1(-)-core 瞬时转染的 NIH3T3 细胞中的 CAT 表达活性为 pCAT3-NIPP 的 1.9 倍, 是 pCAT3 basic 的 3.6 倍, 明显升高。

结论: 丙型肝炎病毒核心蛋白可反式激活 NIP3 基因启动子, 进而上调 NIP3 基因的表达。

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):951-954

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/951.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区. 多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt) 编码的 21 kDa HCV 核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 在 HCV 致病过程中可能起着重要的作用^[1-5], 最近研究其与 HCV 感染后脂肪肝的形成也有一定关系^[6-8]. 本研究采用基因重组技术构建 pCAT3-NIPP、pcDNA3.1(-)-core 报告基因载体, 应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统, 测得下游 CAT 基因的表达增强. 证明 HCV 核心蛋白可上调 NIP3 启动子活性, 进而上调 NIP3 基因的表达, 从而为研究 HCV 致病的分子生物学机制提供了证据。

1 材料和方法

1.1 实验材料及主要试剂 (1)菌种及细胞株: 重组表达载体 pcDNA3.1(-)-core 为本室构建, 人肝母细胞瘤细胞系 Hep G2 细胞及大肠杆菌 JM109 菌株为本室保存. (2)工具酶: Tag DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均购自 Takara 公司. (3)试剂盒: 质粒 DNA 提取试剂盒, 中间载体 pGEM-T 及报告质粒 pCAT3-basic 均购自 Promega 公司; CAT-ELISA 检测试剂盒及质粒 DNA 转染试剂盒购自 Roche 公司. 其他生化试剂购自 Sigma 公司.

1.2 目的基因的扩增与纯化 以 Hep G2 细胞基因组 DNA 为模板, 设计引物. 在上下游引物的 5' 端分别引入 XhoI 和 Bgl II 单一酶切位点, PCR 扩增包含 NIPP 基因启动子全序列的 DNA 片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 回收纯化.

1.3 CAT3 报告载体的构建、纯化和 DNA 测序 以 T-A 克隆法, 用 T4 DNA 连接酶将 NIPP 基因片段连入载体 pGEM-T. 将获得的质粒 pT-NIPP, 和报告质粒 pCAT3-basic 分别用 SacI 和 Bgl II 双酶切后用 T4 DNA 连接酶进行定向连接, 产物转化 JM109 宿主菌, 筛选抗氨苄青霉素阳性菌落; 提取质粒, 再次双酶切及单酶切鉴定正向插入克隆, 命名为 pCAT3-NIPP.

1.4 真核表达载体的鉴定 将 pcDNA3.1(-)-core 质粒分别进行 EcoRI/BamHI 双酶切和 HindIII 单酶切及 PCR 鉴定. PCR 鉴定核心基因的上下游引物分别为: 5' - C G C A G A A T T C A T G A G C A C G A A T C C T A A - 3', 5' - A T A T G G A T C C A G G C T G A A G C G G G C A C A - 3'. 最后测序鉴定. DNA 测序由上海博亚公司完成.

1.5 细胞转染及 Weep 活性检测 磁珠法提取质粒 pCAT3-NIPP 以备转染, 以标准方案培养 NIH3T3 细胞. 具体转染方法参照转染说明书进行. 转染 48 h 后收集细胞, 收集细胞裂解液, 用于 CAT 活性检测.

1.6 pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-NIPP 共转染实验 pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-NIPP 共转染 Hep G2 细胞, 同时以转染 pCAT3-NIPP p 的 NIH3T3 细胞作阴性对照. 转染 48 h 后, 收集细胞裂解液, 用于 CAT 活性检测. 所有实验严格平行操作.

1.7 CAT 含量检测 按照试剂盒说明书进行. 取 1.0 ng/ml 的 CAT 标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液 200 μl 加入已包被抗体的 96 孔板中, 37 °C 温育 2 h, 再依次加入第一抗体(地高辛标记的抗 -CAT)、第二抗体(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体抗 -DIG-POD) 200 μl 37 °C 温育 1 h 后, 加入过氧化物酶的底物室温显色 10-30 min. 用酶标仪检测标本在 415 nm 波长的吸光度, 其数值反映细胞提取物中的 CAT 表达水平. 以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照.

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 pCAT3-NIPP 鉴定电泳图谱如图 1 所示, 构建的中间载体 pT-NIPP 以 XhoI/ Bgl II 双

酶切电泳图谱为两条带: 1 851 bp (NIPP 基因片段)、3 015 bp (pGEM-T 空载体); DNA 测序证实重组质粒含有 1 851 bp 核苷酸的目的基因, 读码框架正确. 中间载体 pT-NIPP 以 SacI/ Bgl II 双酶切为两条带: 730 bp (NIPP 基因片段)、4 055 bp (pGEM-T 空载体 + 一部分 NIPP 基因片段) 重组质粒 pCAT3-NIPP 分别以 SacI/ Bgl II 双酶切鉴定均显示 730 bp 正向插入条带. 以 Pvu II 单酶切可见 419 bp 和 4 313 bp 两条带, 说明重组质粒 pCAT3-NIPP 构建正确.

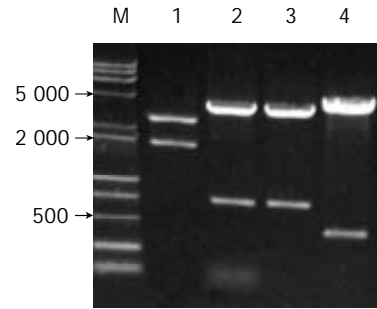


图 1 pCAT3-NIPP 鉴定电泳图谱. 1 pT-NIPP XhoI/ Bgl II 双酶切; 2 pT-NIPP SacI/ Bgl II 双酶切; 3 pCAT3-NIPP SacI/ Bgl II 双酶切 4 Pvu II 单酶切 M.DNA Marker (15 000 bp+2 000 bp).

2.2 表达质粒的鉴定 pcDNA3.1(-)-core 鉴定电泳图谱如图 2 所示, 双酶切显示两条带(4 900 bp 空载体和 573 bp HCV core 基因片段), 单酶切为约 5 500 bp 一条带(4 900 bp+573 bp). 以 pcDNA3.1(-)-core 质粒作模板, PCR 可见 573 bp 的产物. 测序证实该重组质粒读码框架正确.

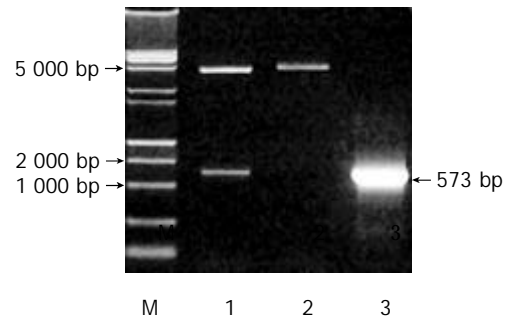


图 2 pcDNA3.1(-)-core 鉴定电泳图谱. 1 EcoRI/BamHI 双酶切; 2 HindIII 单酶切; 3 质粒 PCR 产物; M DNA Marker(15 000 bp+2 000 bp).

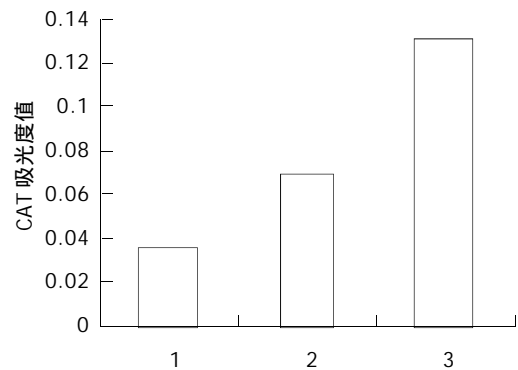


图 3 CAT 酶表达结果. 1 pCAT3 basic; 2 pCAT3-Weep; 3 pcDNA3.1(-)-core + pCAT3-Weep.

2.3 重组质粒 pcDNA3.1(-)-core 与 pCAT3-NIPP 共转

染实验结果 空载体对照组 pCAT3 basic 的 CAT 的吸光度值为 0.036, pCAT3-NIPP 的 CAT 的吸光度值为 0.069, 共转染 pcDNA3.1(-)-core/pCAT3-NIPP 的 NIH3T3 细胞 CAT 的吸光度值为 0.131, 共转染 pcDNA3.1(-)-core/pCAT3-NIPP CAT 的表达明显增强, 是 CAT3 空载体的 3.6 倍, 是 pCAT3-Weep 的 1.8 倍, 说明 HCV 核心蛋白对 NIP3 基因启动子有反式激活作用, 转录激活 NIP3 基因启动子的活性, 使其下游 CAT 基因的表达增强(图 3).

3 讨论

尽管 HCV 发展为慢性感染的机制还是不很清楚, 感染 HCV 后较高比例的慢性化提示 HCV 可能有特定的机制可以绕开宿主的免疫反应. 细胞凋亡被认为是由宿主的 CTL 和 NK 细胞清除病毒的通常方式. 许多病毒基因组编码的蛋白可抑制细胞凋亡, 进而使病毒逃避宿主免疫系统的攻击^[9], HCV 核心蛋白除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能, 在 HCV 的致病过程中起重要作用. 关于他在细胞凋亡中的作用, 目前还有争议. 有研究显示 HCV 核心蛋白既可以抑制 Fas-和 TNF 诱导的细胞凋亡作用, 又可以加强这种作用^[10-13]. Gross et al^[14]应用转基因小鼠研究发现 HCV 核心蛋白通过 Fas 介导的细胞凋亡和外周血 T 细胞的肝浸润引起肝损伤. Chen et al^[15]认为 HCV 核心蛋白可以抑制 Fas 介导的 p38 信号途径, 结果是加强了 Fas 介导的细胞死亡作用. 当然, 也有人认为在体内正常的内源性的 TNF 应答情况下, HCV 核心蛋白既不能加强也不能抑制细胞凋亡作用^[16].

细胞凋亡被抗细胞凋亡的 Bcl-2 家族蛋白和各种前凋亡蛋白的相互作用来调控, 这些前凋亡蛋白中也包括一些 Bcl-2 家族蛋白^[17]. 有证据显示 Bcl-2 因子中前凋亡因子和抗凋亡因子的比例可以调节细胞在响应凋亡信号时线粒体的完整性的敏感性^[18]. Nip3 是一种线粒体蛋白, 在细胞内瞬时表达时可以诱导细胞凋亡, 并且可加强其他细胞死亡信号诱导的细胞凋亡^[19]. Bcl-2 可抑制 Nip3 的作用, 但作用时间短暂^[20-22]. 亦有报道认为 Nip3 引起细胞坏死的作用较细胞凋亡作用更强^[23]. Soguero et al^[24]研究发现低氧可激活 Nip3 编码基因的表达, 进而导致在持续缺氧情况下细胞的程序性死亡. 腺病毒属的 E1B19K 结合蛋白 B5 可抑制 Nip3 基因诱导的细胞凋亡^[25]. 近来研究发现 HCV 核心蛋白在通过加强 Bcl-x 的表达线粒体水平抑制细胞凋亡作用, 进而抑制胱冬肽酶 3 激酶活性^[26-28]. 也有人认为 HCV 核心蛋白是加强还是抑制细胞凋亡取决于凋亡诱导因子的刺激和细胞的环境^[29].

本研究采用基因重组技术, 自 NIP3 基因上游自碱基 ATG 上推 1 851 个碱基, 以 Hep G2 细胞基因组 DNA 为模板, 设计引物. 在上下游引物的 5' 端分别引入

XhoI 和 Bgl II 单一酶切位点 PCR 扩增 DNA 片段, 与 pGEM-T 载体连接命名为 T-NIPP. 以 SacI 和 Bgl II 酶切可能包含 NIP3 基因启动子全序列的 731bp 的 DNA 片段构建 pCAT3-NIPP 报告基因载体. 应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统, 与 pcDNA3.1(-)-core 共转染 NIH3T3 细胞, 测得共转染 pcDNA3.1(-)-core / pCAT3-NIPP CAT 的表达明显增强, 是 CAT3 空载体的 3.6 倍, 是 pCAT3-Weep 的 1.8 倍, 说明 HCV 核心蛋白对 NIP3 基因启动子有反式激活作用, 转录激活 Wee1 基因启动子的活性. 证明 HCV 核心蛋白可上调 NIP3 启动子活性, 进而上调 NIP3 基因的表达, 提示 HCV 核心蛋白可能有加强细胞凋亡的作用, 从而为研究 HCV 致病的分子生物学机制提供了证据.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-42
- 2 姚杰, 贾战生. 丙型肝炎病毒 E2 包膜糖蛋白的研究近况. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:339-342
- 3 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 4 焦成松, 周永兴. 丙型肝炎病毒细胞模型研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:105-109
- 5 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
- 6 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 A1 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 7 成军, 任进余, 李莉, 陆志檬, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 8 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 9 Moretta A. Molecular mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1997;90:13-18
- 10 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
- 11 Honda A, Hatano M, Kohara M, Arai Y, Hartatik T, Moriyama T, Imawari M, Koike K, Yokosuka O, Shimotohno K, Tokuhisa T. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice. *J Hepatol* 2000;33:440-447
- 12 Rubbia-Brandt L, Taylor S, Gindre P, Quadri R, Abid K, Spahr L, Negro F. J Pathol Lack of in vivo blockade of Fas- and TNFR1-mediated hepatocyte apoptosis by the hepatitis C virus. *J Pathol* 2002;197:617-623
- 13 Farooq M, Kim Y, Im S, Chung E, Hwang S, Sohn M, Kim M, Kim J. Cloning of BNIP3h, a member of proapoptotic BNIP3 family genes. *Exp Mol Med* 2001;33:169-173
- 14 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911
- 15 Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenberg A. Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 1999;274:7-10
- 16 Chen G, Ray R, Dubik D, Shi L, Cizeau J, Bleackley RC, Saxena S, Gietz RD, Greenberg AH. The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med* 1997;186:1975-1983
- 17 Yasuda M, Theodorakis P, Subramanian T, Chinnadurai G. Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence.

- J Biol Chem* 1998;273:12415-12421
- 18 Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001; 61:6669-6673
 - 19 Matsushima M, Fujiwara T, Takahashi E, Minaguchi T, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Suzumori K, Nakamura Y. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chro Cancer* 1998;21:230-235
 - 20 Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9082-9087
 - 21 Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002;296:84-93
 - 22 Takamatsu M, Fujita T, Hotta H. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Kobe J Med Sci* 2001;47:97-112
 - 23 Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998;72:3691-3697
 - 24 Soguero C, Joo M, Chianese-Bullock KA, Nguyen DT, Tung K, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein leads to immune suppression and liver damage in a transgenic murine model. *J Virol* 2002;76:9345-9354
 - 25 Ohi N, Tokunaga A, Tsunoda H, Nakano K, Haraguchi K, Oda K, Motoyama N, Nakajima T. A novel adenovirus E1B19K-binding protein B5 inhibits apoptosis induced by Nip3 by forming a heterodimer through the C-terminal hydrophobic region. *Cell Death Differ* 1999;6:314-325
 - 26 Yang SH, Lee CG, Lee CW, Choi EJ, Yoon SK, Ahn KS, Sung YC. Hepatitis C virus core inhibits the Fas-mediated p38 mitogen activated kinase signaling pathway in hepatocytes. *Mol Cells* 2002;13:452-462
 - 27 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
 - 28 Honda M, Kaneko S, Shimazaki T, Matsushita E, Kobayashi K, Ping LH, Zhang HC, Lemon SM. Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology* 2000;31:1351-1359
 - 29 Sun J, Bodola F, Fan X, Irshad H, Soong L, Lemon SM, Chan TS. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 2001;75:11992-11998

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

• 消息 •

世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次

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

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

(世界胃肠病学杂志社 2003-01-15)

丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白B1链基因启动子表达活性的研究

杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林

杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗中心 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
杨倩, 女, 32岁, 广西桂平人, 博士研究生, 主要从事传染病临床与基础研究。国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Up-regulating effect of hepatitis C virus core protein on laminin B1 chain gene promoter

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

Qian Yang, Yan Liu, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan-Jie Yang, Shu-Lin Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038
Correspondence to: Jun Cheng, MD, PhD, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: HCV core protein is a potential transactivator for a broad spectrum of hepatocellular genes. To investigate activity of HCV core protein on laminin B1 chain promoter, we use co-transfection methods and reporter gene expression in hepatoblastoma cell.

METHODS: LAMB-p sequence was identified in GenBank by bioinformatics and amplified from HepG2 genome by polymerase chain reaction (PCR). The amplified product was cloned into pCAT3 vector. The NIH 3T3 and COS-7 cell line were transfected by pCAT3-LAMB-p, the NIH 3T3 cell line was co-transfected by pCAT3-LAMB-p and pcDNA3.1 (-)-core. The choloraphenical acetyltransferase (CAT) activity was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

RESULTS: In all cell lines, we found pCAT3-LAMB-p had higher activity of CAT than pCAT3-basic by ELISA kit. The expression of CAT in co-transfection was 3.3 times as higher as that of pCAT3-LAMB-p plasmid.

CONCLUSION: HCV-core protein has transactivity on LAMB

promoter, and this result is implicating in the pathogenesis of fibrosis related to HCV infection

Yang Q, Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang YJ, Zhang SL. Up-regulating effect of hepatitis C virus core protein on laminin B1 chain gene promoter. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):955-958

摘要

目的: 探讨丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白对层粘蛋白B1链(LAMB)启动子转录的激活作用。

方法: 以我室构建的HCV核心蛋白反式调节基因的cDNA文库抑制性消减杂交(SSH)筛选结果为基础, 利用生物信息技术确定LAMB的启动子区域(LAMB-p), 聚合酶链反应(PCR)扩增LAMB-p, 克隆至真核表达载体pCAT3中, 构建pCAT3-LAMB-p表达载体; 以该质粒转染COS-7、NIH 3T3细胞系, 用酶联免疫黏附方法(ELISA)法检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性; 与pcDNA3.1(-)-core共转染NIH 3T3细胞系, 用ELISA法检测CAT的表达活性。

结果: 质粒pCAT3-LAMB-p在NIH 3T3、COS-7细胞中能够激活CAT的表达; 共转染实验中pCAT3-LAMB-p+pcDNA3.1(-)-core组CAT的表达活性是pCAT3-LAMB-p的3.3倍。

结论: 构建的pCAT3-LAMB-p具有启动子活性; HCV核心蛋白对LAMB-p有激活作用。本研究为利用SSH技术研究HCV核心蛋白致肝细胞癌机制提供新的实验及理论基础。

杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白B1链基因启动子表达活性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):955-958
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/955.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组是一种单股正链RNA, 全长约9 500个核苷酸(nt), 含有一个大的开放读码框架(ORF), 编码3 010-3 033个氨基酸残基(aa)的多肽前体, 多肽前体至少被加工为10种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt)编码的21 kDa HCV核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质^[1], 近年来研究发现, 核心蛋白可以定位于细胞核内, 并对多种病毒和细胞基因起调节作用^[2-4]. 我室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选出HCV核心蛋白上调表达的一些已知和未知的基因, 其中包

括层粘连蛋白 B1 链(LAMB, laminin B1 chain)基因. 本研究利用生物信息学手段对 LAMB 基因 5' 上游调控序列进行分析、克隆, 并与报告基因氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 构建表达质粒, 与核心蛋白表达载体共转染, 证明核心蛋白对 LAMB 启动子具有激活作用, 使下游 CAT 基因的表达增强.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 JM109, 细胞株 COS-7、NIH 3T3、pcDNA3.1(-)-core 为本室保存. pGEM-T、pCAT3 载体购自 Promega 公司, 脂质体 FuGENE6 购自 Roche 公司, Taq DNA 聚合酶购自鼎国生物公司, 限制性内切酶 Kpn I、Xho I 购自 Takara 公司. 质粒 DNA 提取试剂盒 (Promega 公司), 玻璃奶 DNA 回收试剂盒 (博大公司), CAT ELISA 试剂盒 (Roche 公司). 引物合成、核苷酸序列测序由上海博亚公司完成.

1.2 方法

1.2.1 LAMB 启动子结构分析 根据 GenBank 中 LAMB 基因组序列, 确定 LAMB 的翻译起始点, 截取其上游 798 bp, 设计并合成引物, 在上下游引物的 5' 端分别加上 Kpn I 和 Xho I. 上游引物: 5' -GGT ACC GTC GCG CCCATC CCA AGC TC-3' 下游引物: 5' -CTC GAG ATG CCG GTC CCC TGC AGC CA-3'.

1.2.2 质粒构建 PCR 扩增 LAMB 启动子序列, 玻璃奶纯化回收 DNA 片段, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109, 挑取在选择平板(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色菌落提取质粒, 经酶切(Kpn I/Xho I)及测序鉴定. Kpn I/Xho I 双酶切重组质粒 pGEM-T-LAMBp, 玻璃奶纯化回收酶切产物, 定向克隆至 pCAT3 载体, 构建成重组质粒 pCAT3-LAMBp. 经双酶切及菌落 PCR 鉴定连接产物. 试剂盒方法提取质粒以备转染.

1.2.3 细胞培养及转染 COS-7、NIH 3T3 细胞系在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中生长. 细胞生长至 50-80% 时采用脂质体转染法, 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行. 质粒 pCAT3-p 转染 30 h 后收获细胞.

1.2.4 共转染实验 NIH 3T3 细胞生长至 50-80% 时, 质粒 pCAT3-p 与 pcDNA3.1(-)-core、质粒 pCAT3-p 与 pcDNA3.1(-) 空载体共转染. 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行. 转染 30 h 后收获细胞.

1.2.5 CAT 表达量的检测 将收获的细胞进行裂解, 提取上清液, 取 200 μ l 用于检测 CAT 的表达量. 具体方法严格按照 CAT ELISA 试剂盒说明书进行. 在 415 nm 光波下测吸光度 A 值.

2 结果

2.1 LAMB 启动子结构 根据 GenBank 中 LAMB 基因组序列, 确定 LAMB 的翻译起始点, 选取其上游 798 bp, 其核苷酸序列见图 1. 对此序列进行分析发现有多个

TATA 盒存在, G+C 含量为 65%, 同时含有多个 CCGCCC 序列.

```

CGCGCC CATCCCAAGC TCTTGATAC
TAGGGGCGGA GAGGAAGTGT CACTTTCTAA AGAACAAACA CGACAGGTCG
ACCCTGTTTC TAAAGGGTTA ACCCGCCTTC CCCGAGCGCA CCGCACGAGA
GTTTTAGCCG TGGGCACGTT TGGTGATTCA CTCTTGCGA ACGTAAATGC
GCGAGTCCGC GGTAGGTCCC GCCGGCCCC TGGCTGGCA ACCTGAAAAAC
CCACCTCGGA GACGCCCCCA CGCATCCGCC CCCCTCGCTG GACGGCCCCG
CCGCGCGCCG TTCTGGGACG CGCACCCCGG GCGGACCCG CCCTGGGACC
TGGAAGCGCC CCAGCCCGCG AGCGATCGCA GATTCTGGCT TCAAACAAAA
GAGGCGCCCC GGGGGGTGGG ACCGGGACCT CACCCGCTCC TCGCAGAGTT
GCGGCCGCC GCCCTTCAG CCCCGCTCT CCGTATGCGC ATGAGCAGAG
GCGCCTCCCT CTGTTCTCC CAAGGCTAAA CTTTCTAATT CCCTTCTTTG
GGCTCGGGG CTCCCAGGAG AGGGCGAGAG CTCGCGTCCG CGGGTGAGGA
GAACAAAGTG GCTGCACGAT TTTCCCACT TTCCAGCCCA CCCCCGCTT
CCGTGGGAGC GACAGGAAAT GGAAGGGCGC CTCTTCTCT TTTGAACATT
TGCCTTTTTT CCCCTCCTTT CCACCTCTCC AGAAAGGAAG ACGGGAAGAA
AGGGCAGGCG GCTCGGCGGG CGTCTTCTCC ACTCTCTGC CGCGTCCCCG
TGGCTGCAGG GAGCCGGCAT

```

图 1 LAMB 翻译起始位点上游核苷酸序列.

2.2 重组质粒的构建 以来源于 HepG2 细胞的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 LAMB 启动子 DNA 序列, 结果如图 2 所示, 于 790 bp 处出现理想条带. 将扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 双酶切鉴定, 结果如图 3 所示, 显示两条带(3 000 bp 的 pGEM-T 载体和 790 bp 的 LAMB-p DNA 片段), 并送测序鉴定正确. 双酶切产物与 pCAT3 载体连接, 双酶切鉴定如图 4 所示(4 000 bp 的 pCAT3-basic 空载体和 790 bp 的 LAMB-p DNA 片段), 连接转化生长的菌落进行 PCR 鉴定, 如图 5 所示, 于 790 bp 处可见理想条带.

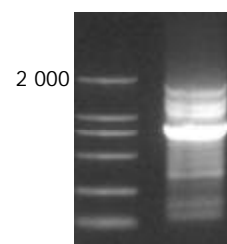


图 2 以 HepG2 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 LAMB 启动子序列.

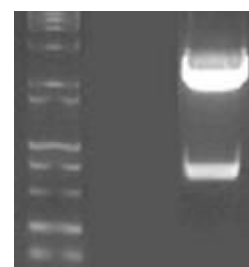


图 3 pGEM-T-LAMBp 双酶切(Kpn I/Xho I).

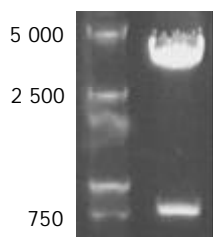


图4 pCAT3-LAMB-p 双酶切(Kpn I/Xho I).

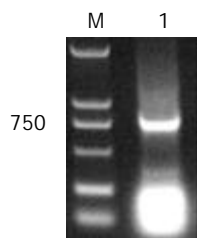


图5 pCAT3-LAMB-p 菌落 PCR.

2.3 重组质粒转染实验及报告基因 CAT 的检测 将重组质粒 pCAT3-LAMB-p 转染 COS-7、NIH 3T3 细胞, 如表 1 所示, pCAT3-LAMB-p 具有启动子活性.

表 1 pCAT3-LAMB-p 转染 COS-7、NIH 3T3 细胞中后 CAT 的表达

组别	质粒	吸光度(A 值)
阴性对照 COS-7	pCAT3-basic	0.050
阴性对照 NIH 3T3	pCAT3-basic	0.060
阳性对照 COS-7	pCAT3-control	1.258
阳性对照 NIH 3T3	pCAT3-control	0.258
实验组 COS-7	pCAT3-LAMB-p	1.046
实验组 NIH 3T3	pCAT3-LAMB-p	0.129

2.4 重组质粒 pCAT3-LAMB-p 与 pcDNA3.1(-)-core 共转染 COS-7 并检测报告基因 CAT 的表达 共转染 pCAT3-LAMB-p+pcDNA3.1(-)-core 时 CAT 的表达较对照质粒明显升高, 如表 2 所示, 说明 HCV 核心蛋白对 LAMB 启动子具有激活作用.

表 2 pCAT3-LAMB-p+pcDNA3.1(-)-core 共转染后 CAT 的表达

组别	质粒	吸光度(A 值)
阴性对照组	pCAT3-basic	-0.059
阳性对照组	pCAT3-control	0.138
实验对照组	pCAT3-LAMB-p	0.338
共转染组	pCAT3-LAMB-p+pcDNA3.1(-)-core	1.006

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)易在感染个体中形成持续感染状态, 并容易发展为慢性肝炎、肝硬化(LC), 甚至肝细胞癌(HCC)^[5-7], 其确切的机制仍不明确. HCV 核心蛋白是一种多功能蛋白质, 除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞、病毒基因表

达、细胞生长以及免疫调节等功能^[8,9]. 实验研究显示核心蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是 NF- κ B、AP-1 和 SRE 相关途径具有明显的反式激活作用^[10-12]; 在 HepG2 细胞中, 核心蛋白激活人胰岛素样生长因子 II (IGF-II) 基因、和 SV40 早期启动子^[13-15]; 核心蛋白还能抑制或增强 p53 基因启动子功能^[16,17]. HCV 核心蛋白的反式激活功能在 HCV 致病中发挥重要的作用, 研究其作用分子生物学机制有助于理解 HCV 感染的慢性化和致癌作用. 我室采用抑制性消减杂交方法^[18]克隆 HCV 反式激活基因. 成功地构建了 HCV 核心蛋白反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库. 其中发现 HCV 核心蛋白可上调 LAMB 基因的表达^[19]. 为了进一步研究 HCV 核心蛋白是否对 LAMB 的表达有激活作用, 根据 GenBank 中 LAMB 基因组序列^[20], 确定 LAMB 的翻译起始点, 截取其上游 798 bp 核苷酸序列进行克隆, 并构建含报告基因 CAT 的重组质粒, 结果发现 HCV 核心蛋白对 LAMB 的表达确有激活作用, 证实了 cDNA 消减文库的发现.

层粘连蛋白是细胞外基质成分, 主要存在于基底膜的透明层, 对细胞的黏附、移行和增生均有影响^[21,22]. 层粘连蛋白由 A、B1、B2 三条链组成. 其中 LAMB 是其主要的活性区域, 含有与分布在肿瘤和上皮细胞上的受体高度亲和的配体区^[23-25]. 虽然一些正常实质细胞能够表达层粘连蛋白^[26,27], 但 Geerts et al^[28]利用原位杂交技术在正常鼠肝细胞中未发现层粘连蛋白 mRNA 的表达. 目前研究表明, 层粘连蛋白参与肿瘤的血管形成, 促进肿瘤的转移^[29,30]. HCV 核心蛋白上调 LAMB 表达的生物学意义并不明确, 但由于层粘连蛋白参与血管基底膜的形成及促进肿瘤的转移, 可能与肝纤维化、肝硬化时肝窦血管化及肝癌的扩散有关. 本研究为进一步探讨 HCV 感染的发病机制、HCV 核心蛋白致癌的分子生物学机制提供新的研究基础.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:37-42
- 2 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
- 3 Flichman D, Cello J, Castano G, Campos R, Sookoian S. In vivo down regulation of HIV replication after hepatitis C superinfection. *Medicina (B Aires)* 1999;59:364-366
- 4 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. *中华肝脏病学杂志* 2002;10:354-356
- 5 刘妍, 成军. HCV 致肝细胞癌分子生物学机制. *国外医学·流行病学传染病学分册* 2000;27:10-13
- 6 Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. the sentinel counties chronic non-A, non-B hepatitis study team. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905
- 7 Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepato-

- cellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6547-6549
- 8 MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 2002; 185:720-727
- 9 Honda M, Kaneko S, Shimazaki T, Matsushita E, Kobayashi K, Ping LH, Zhang HC, Lemon SM. Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology* 2000;31: 1351-1359
- 10 Chung YM, Park KJ, Choi SY, Hwang SB, Lee SY. Hepatitis C virus core protein potentiates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation through TRAF2-IKKbeta-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:15-19
- 11 Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 2002; 292:272-284
- 12 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 13 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 14 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
- 15 Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology* 2001;283:167-177
- 16 Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000;275:34122-34130
- 17 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- 18 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6025-6030
- 19 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,李莉. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26: 880-883
- 20 Pikkariainen T, Eddy R, Fukushima Y, Byers M, Shows T, Pihlajaniemi T, Saraste M, Tryggvason K. Human laminin B1 chain. A multidomain protein with gene (LAMB1) locus in the q22 region of chromosome 7. *J Biol Chem* 1987;262:10454-10462
- 21 Graf J, Ogle RC, Robey FA, Sasaki M, Martin GR, Yamada Y, Kleinman HK. A pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67 000 laminin receptor. *Biochemistry* 1987;26:6896-6900
- 22 Vuolteenaho R, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human laminin B1 chain gene. *J Biol Chem* 1990;265:15611-15616
- 23 Nelson J, Scott WN, Allen WE, Wilson DJ, Harriott P, McFerran NV, Walker B. Murine epidermal growth factor peptide (33-42) binds to a YIGSR-specific laminin receptor on both tumor and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:26179-26186
- 24 Massia SP, Rao SS, Hubbell JA. Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67-kilodalton laminin receptor with alpha-actinin and vinculin. *J Biol Chem* 1993;268:8053-8059
- 25 Terranova VP, Rao CN, Kalebic T, Margulies IM, Liotta LA. Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:444-448
- 26 Bissell D. Connective tissue metabolism and hepatic fibrosis: an overview. *Semin Liver Dis* 1990;10:1-83
- 27 Maher JL, McGuire R. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cell during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest* 1990;86: 1641-1648
- 28 Geerts A, Greenwel P, Cunningham M, De Bleser P, Rogiers V, Wisse E, Rojkind M. Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial, Kupffer and fat-storing cells by Northern hybridization analysis. *J Hepatol* 1993;19:148-158
- 29 Soini Y, Autio-Harmainen H. Synthesis and degradation of basement membranes in benign and malignant salivary gland tumours. A study by in situ hybridization. *J Pathol* 1993;170: 291-296
- 30 Soini Y, Hurskainen T, Hoyhtya M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H. 72 KD and 92 KD type IV collagenase, type IV collagen, and laminin mRNAs in breast cancer: a study by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1994;42:945-951

丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达

杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林

杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 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 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
杨倩, 女, 32岁, 广西桂平人, 博士研究生, 主要从事传染病临床与基础研究工作。国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-03-21

Up-regulating effect of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 on NACA gene promoter

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

Qian Yang, Yan Liu, Jun Cheng, Ke Li, Jian-Jun Wang, Yuan Hong, Shu-Lin Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038
Correspondence to: 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: 2003-01-11 Accepted: 2003-03-21

Abstract

AIM: By using yeast-two hybrid technique and bioinformatics analysis, human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 (HCBP6) was screened and identified. To investigate activity of HCBP6 on alpha chain of nascent polypeptide-associated complex (NACA) promoter by co-transfection and reporter gene expression methods.

METHODS: Promoter DNA sequence for a subunit α of nascent polypeptide-associated complex was identified in GenBank by bioinformatics and amplified from HepG2 genome by polymerase chain reaction (PCR). The amplified product was cloned to pCAT3 vector. The NIH 3T3 and COS-7 cell line were transfected by pCAT3-NACA-p, the NIH 3T3 cell line was co-transfected by pCAT3-NACA-P and pcDNA3.1 (-)-HCBP6. The chloromycin acetyltransferase (CAT) activity was detected by an enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit.

RESULTS: In all cell lines, we found pCAT3-NACA-p had higher activity of CAT than pCAT3-basic by ELISA kit. The expression of CAT tested in co-transfection was 4 times as higher as pCAT3-NACA-p plasmid.

CONCLUSION: HCBP6 has trans-activity on NACA promoter, and this result implicates HCBP6 can affect metabolism.

Yang Q, Liu Y, Cheng J, Li K, Wang JJ, Hong Y, Zhang SL. Up-regulating effect of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 on NACA gene promoter. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):959-962

摘要

目的: 探讨HCV核心蛋白结合蛋白6对新生多肽相关复合物 α 多肽启动子的激活作用。

方法: 以基因表达谱芯片技术筛选HCBP6表达质粒转染HepG2细胞后的差异表达基因为基础, 利用生物信息学技术确定NACA的启动子区域(NACA-p), 聚合酶链反应(PCR)扩增NACA-p, 克隆至真核表达载体pCAT3中, 构建pCAT3-NACA-p表达载体; 以该质粒转染COS-7、NIH 3T3细胞系, 用酶联免疫黏附方法(ELISA)检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性; 与pcDNA3.1(-)-HCBP6共转染NIH 3T3细胞系, 用ELISA法检测CAT的表达活性。

结果: 质粒pCAT3-NACA-p在NIH 3T3、COS-7细胞中能够激活CAT的表达; 共转染实验中pCAT3-NACA-p+pcDNA3.1(-)-HCBP6组CAT的表达活性是pCAT3-NACA-p的4倍。

结论: pCAT3-NACA-p具有启动子活性; HCV核心蛋白结合蛋白6对NACA-p有激活作用。本研究为探讨HCV核心蛋白结合蛋白6的功能提供新的实验及理论基础。

杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达. *世界华人消化杂志* 2003; 11(7):959-962

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/959.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白是一种多功能蛋白质, 除作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞及病毒基因表达的功能, 在HCV引起的慢性肝炎、肝硬化、肝癌的发病机制中起到重要的作用^[1,2]. 其中核心蛋白与宿主蛋白之间的相互作用可能是病毒持续感染的重要原因^[3-5]. 为了进一步探索核心蛋白与肝细胞之间的相互作用, 我室采用酵母双杂交系统3, 以HCV核心蛋白作为“诱饵”, 对肝细胞cDNA文库进行筛选, 获得了一些与核心蛋白结合的肝细胞蛋

白的编码基因,其中包括未知功能基因6号,命名为HCV核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)^[6,7]。为进一步研究该基因的功能,利用基因表达芯片技术筛选HCBP6表达质粒转染HepG2细胞后的差异表达基因,发现HCBP6可上调一些基因的表达,其中包括新生多肽相关复合物 α 多肽(α subunit of nascent polypeptide-associated complex, NACA),本研究利用生物信息学手段对NACA 5' - 上游调控序列进行分析、克隆,并与报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)构建表达质粒,与HCBP6表达载体共转染,证明HCBP6对NACA启动子(promoter)具有激活作用,使下游CAT基因的表达增强。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌JM109,细胞株COS-7、NIH 3T3、pcDNA3.1(-)-HCBP6。为本室保存。pEGM-T、pCAT3载体购自Promega公司,脂质体FuGENE6购自Roche公司,Taq DNA聚合酶购自鼎国生物公司,限制性内切酶Kpn I、Xho I购自Takara公司。质粒DNA提取试剂盒(Promega公司),玻璃奶DNA回收试剂盒(博大公司),CAT ELISA试剂盒(Roche公司)。引物合成、核苷酸序列测序由上海博亚公司完成。

1.2 方法

1.2.1 NACA启动子结构分析 根据GenBank中NACA基因组序列,确定NACA的转录起始点,截取其上游963 bp,设计并合成引物,在上下游引物的5' - 端分别加上Kpn I和Xho I。上游引物:5' -GGT ACC CTG GGA AGG AGA ATC TGC AC-3';下游引物:5' -CTC GAG GTG CAG GGA ACG CGG AAC CAA G-3'。

1.2.2 质粒构建 PCR扩增NACA启动子序列,玻璃奶纯化回收DNA片段,在T4 DNA连接酶的作用下,与pGEM-T载体连接,转化大肠杆菌JM109,挑取在选择性培养基(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色菌落提取质粒,经酶切(Kpn I/Xho I)及测序鉴定。Kpn I/Xho I双酶切重组质粒pEGM-T-NACA-promoter,玻璃奶纯化回收酶切产物,定向克隆至pCAT3载体,构建成重组质粒pCAT3-NACA-promoter。经双酶切及菌落PCR鉴定连接产物。试剂盒方法提取质粒以备转染。

1.2.3 细胞培养及转染 COS-7、NIH 3T3细胞系在含10%小牛血清的DMEM培养液中生长。细胞生长至50-80%时采用脂质体转染法,具体转染方法参照FuGENE6说明书进行。质粒pCAT3-NACA-promoter转染30 h后收获细胞。

1.2.4 共转染实验 NIH 3T3细胞生长至50-80%时,质粒pCAT3-NACA-promoter与pcDNA3.1(-)-HCBP6、质粒pCAT3-NACA-promoter与pcDNA3.1(-)空载体共转染。因pCAT3-NACA-promoter活性较强,将共转染剂量减至0.2 μ g。具体转染方法参照FuGENE6说明书进行。转染30 h后收获细胞。

1.2.5 CAT表达量的检测 将收获的细胞进行裂解,提取上清液,取200 μ l用于检测CAT的表达量。具体方法严格按照CAT ELISA试剂盒说明书进行。在415 nm光波下测吸光度A值

2 结果

2.1 NACA启动子结构 根据GenBank中NACA基因组序列,确定NACA的转录起始点,截取其上游963 bp,其核苷酸序列见图1。对此序列进行分析发现有多个TATA盒存在,同时含有多个CCGCCC序列。

1	CTGGGAAGGA GAATCTGCAG CTTTATAATT TCAACATCGG CTA AATTGTC
51	GTGAACCTAA ACAATCAAAA GGGCCGGAAT CTATTTAAAG AGTTTATTCA
101	AGGGCAGTGT GAGGATGGAC CAACCAGAAA ACCTCCAAAG AATGGAGTCA
151	GCCTTCAGAA GTAGAGAAGT TACGATTTCA TTTATTTAGG GAGACAGAGG
201	AGTTTTTAGC TGGATTACGT TATCCATACA AGGTTGGAAC ATAATTACAG
251	AATTTGGTTA CAAGAAGTGT TTTTTTTTGG GGGGGGGGCG GGGGTACAGC
301	TAACATTGTT TTACGAAGAG TTTAACACGC ATGAGTTGCT GTCATCTGGT
351	GACATCGTTT GAGTCTCTCT AGTCATTGAA CAGAACAAGA AAAATCGAAT
401	TAAATTTATA ATCTGAACTG AAGTTATATG TGACCCATCA CATCTCTCAA
451	GTTTTAAAAT GGGTTTTTTT GTTGTGTTG ATGGGGGGGG AGAGGGTCCA
501	GCAGCTTTTA AATGTTTTCA CATCGTGTGT TCCAAAATA ACTGGTTAGC
551	CTAAGTCACT TCCACCCTCC AATGTTGTGA ATGCAGTCTC TAGCATTCCG
601	TATTTAATGT CTCTTCCTG CACTATTTGA GAAATCGCGA GGTCGACTTA
651	ATACCGCAGT CGCCACTTCG CGGACCGGAG GCGCGAGTCT GCTTAGTTCT
701	GAGGACTGCG TGGGTCCGCG CAGAGAGCTC CTGCTAGGCC TGCGCGTCCC
751	GTTCTAAATT CTTACCCTTT AGTTCTTGTC ACCACCCCG CCGTGGAAC
801	GGCCTGACAG TCACTCGTCA AAGGAAGTGG CTGCCGGCAG CTCTTGACCC
851	GGAATCGGAT CCTAGTCCCA CCCCTCCGC TCCAGGCTTC CTTCTGCAAC
901	GGCGTGGGT CACGCTCTCG CTCGGTCTTT CTGCCGCAT CTTGGTTCCG
951	CGTTCCTGCG AC

图1 NACA转录启动子核苷酸序列。

2.2 重组质粒的构建 以 HepG2 基因组为模板, PCR 扩增 NACA 启动子 DNA 序列, 于 963 bp 处出现理想条带. 将扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 双酶切鉴定, 显示两条带. 并送测序鉴定正确. 双酶切产物与 pCAT3 载体连接, 连接产物双酶切鉴定如图 1 所示(4 000 bp 的 pCAT3-basic 空载体和 963 bp 的 NACA-promoter DNA 片段)连接转化生长的菌落进行 PCR 鉴定, 如图 2 所示, 于 963 bp 处可见理想条带.

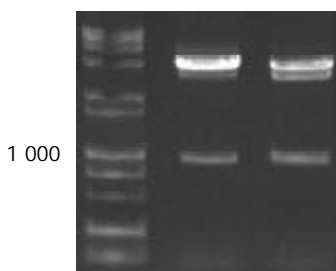


图 2 pCAT3-NACA-promoter 双酶切(Kpn I/Xho I).

2.3 重组质粒转染实验及报告基因 CAT 的检测 将重组质粒 pCAT3-NACA-p 转染 COS-7、NIH 3T3 细胞, 如图 3 所示 pCAT3-NACA-p 具有启动子活性. 其中组 1 为 COS-7 细胞系; 组 2 为 NIH 3T3 细胞系. pCAT3-basic(阴性对照), pCAT3-control(阳性对照).

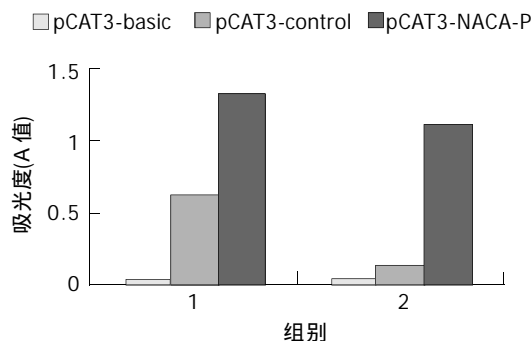


图 3 pCAT3-NACA-p 转染 COS-7、NIH 3T3 细胞后 CAT 的表达. 组 1: COS-7 细胞系; 组 2: nih 3T3 细胞系 pCAT3-basic(阴性对照), pCAT3-control(阳性对照).

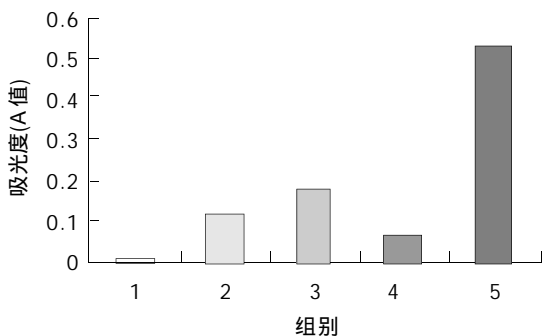


图 4 共转染 NIH 3T3 细胞后 CAT 的表达. 1: pCAT3-basic; 2: pCAT3-control; 3: pCAT3-NACA; 4: pcDNA3.1(-)-vector(空载体); 5: pCAT3-NACA-p.

2.4 重组质粒 pCAT3-NACA-promoter 与 pcDNA3.1(-)-HCBP6 共转染 NIH 3T3 并检测报告基因 CAT 的表达.

共转染 pCAT3-NACA-promoter+pcDNA3.1(-)-HCBP6 时 CAT 的表达较对照质粒明显升高, 如图 4 所示, 说明 HCBP6 对 HCBP6 启动子具有激活作用. 其中组 1 为 pCAT3-basic, 组 2 为 pCAT3-control, 组 3 为 pCAT3-NACA, 组 4 为 pcDNA3.1(-)-vector(空载体), 组 5 为 pCAT3-NACA-p.

3 讨论

HCV 核心蛋白是一种多功能蛋白, 除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还结合细胞内的蛋白质, 如载脂蛋白 AII、肿瘤坏死因子受体-1(TNFR-1)、淋巴毒素- β 受体(LT- β R), 对细胞信号转导、宿主的免疫调节起作用^[8,9]. 为研究 HCV 核心蛋白与宿主肝细胞蛋白的相互作用, 我们将肝细胞 cDNA 文库与 HCV 核心蛋白“诱饵”进行酵母双杂交, 筛选并克隆了与 HCV 核心蛋白相互作用的新的蛋白质基因 HCBP6^[10,11]. 利用生物信息学技术, 我们确定了 HCBP6 的染色体定位, 运用在线软件对其蛋白质一级结构序列进行了分析, 为探讨 HCBP6 蛋白表达的特点及功能奠定了基础^[12,13]. 同时在四唑氮蓝(MTT)实验中发现 HCBP6 可以促进细胞生长, 与 HCV 核心质粒共转染研究中发现其在一定程度上可抑制 HCV 核心蛋白对 SV40 早期启动子的反式激活作用^[14]. 为进一步研究 HCBP6 的功能, 我们采用基因芯片方法筛选 HCBP6 基因转染细胞差异表达的基因, 结果表明 HCBP6 可上调一些基因的表达, 其中包括 NACA 基因^[15]. 根据 GenBank 中 NACA 基因组序列, 确定 NACA 的转录起始点^[16,17], 截取其上游 963 bp 核苷酸序列进行克隆, 并构建含报告基因 CAT 的重组质粒, 结果发现 HCBP6 对 NACA 的表达确有激活作用. 对 HCBP6 的功能研究提供了新的依据.

新生多肽相关复合物由 α 、 β 两条肽链组成, 主要在胞质中分布^[18,19]. 研究发现去除 NAC 后, 细胞将产生两种缺陷: (1)与新生肽链信号肽连接并将其靶向与内质网连接的信号识别颗粒, 失去信号识别功能, 而与无信号肽的新生肽链交叉连接; (2)核糖体翻译与内质网膜错误连接的非分泌性的蛋白质^[20-22]. NACA 单独不能与核糖体连接, 但对核酸有较高的亲和力^[23,24]. Beatrix et al^[25]发现 NACA 除了能和 DNA 结合外, 还能与 RNA、mRNA、tRNA、7S LRNA 相结合, 并且可以进入核内^[26,27]. Mossabeb et al^[28]发现 NACA 可以诱导特异性皮炎患者特异性淋巴细胞增生反应, 并且与自发性 IgE 抗体特异性结合. Yotov et al^[29]研究表明富含脯氨酸的不同 NACA 拼接体可以激活肌球蛋白启动子的转录活性, 在调控肌源性细胞分化时的基因表达发挥重要作用. Moreau et al^[30]也证明 NACA 能够与 c-Jun 蛋白的 1-89 位氨基酸结合, 并且作为辅激活蛋白 NACA 可以与非磷酸化和 73 位丝氨酸磷酸化的 c-Jun 蛋白结合, 从而在成骨细胞分化过程中起到转录调节的作用.

HCBP6 的生物学功能目前仍不是很明确, 对其反

式激活作用的研究有助于探索其在细胞分化、信号传导中的作用. 并对 HCV 感染慢性化、HCV 引起原发性肝癌的致病机制提供新的研究方向.

4 参考文献

- 1 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
- 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 Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol* 1997;71:657-662
- 4 Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-6055
- 5 成军. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 6 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,李莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因的表达载体构建及在酵母中表达. 军医进修学院学报 2002;23:1-3
- 7 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,洪源,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 8 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:123-127
- 9 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,董菁,洪源,张跃新,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 10 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,邵得志,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,洪源,陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:51-54
- 11 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
- 12 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11(待发表)
- 13 Husmeier D, Wright F. Probabilistic divergence measures for detecting interspecies recombination. *Bioinformatics* 2001;17(Suppl 1):S123-131
- 14 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
- 15 刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军. 丙型肝炎核心蛋白结合蛋白 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(待发表)
- 16 Yotov WV, St-Arnaud R. Mapping of the human gene for the alpha-NAC/1.9.2 (NACA/1.9.2) transcriptional coactivator to Chromosome 12q23-24.1. *Mamm Genome* 1996;7:163-164
- 17 Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 1994;370:434-440
- 18 Shi X, Parthun MR, Jaehning JA. The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the alpha NAC subunit of the human nascent polypeptide-associated complex. *Gene* 1995;165:199-202
- 19 Reimann B, Bradsher J, Franke J, Hartmann E, Wiedmann M, Prehn S, Wiedmann B. Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* 1999;15:397-407
- 20 Lauring B, Sakai H, Kreibich G, Wiedmann M. Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5411-5415
- 21 Wiedmann B, Prehn S. The nascent polypeptide-associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane. *FEBS Lett* 1999;458:51-54
- 22 Bacher G, Pool M, Dobberstein B. The ribosome regulates the GTPase of the beta-subunit of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 1999;146:723-730
- 23 Whitby MC, Dixon J. Fission yeast nascent polypeptide-associated complex binds to four-way DNA junctions. *J Mol Biol* 2001;306:703-716
- 24 Franke J, Reimann B, Hartmann E, Kohlerl M, Wiedmann B. Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *J Cell Sci* 2001;114:(Pt 14) 2641-2648
- 25 Beatrix B, Sakai H, Wiedmann M. The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* 2000;275:37838-37845
- 26 St-Arnaud R, Quelo II. Transcriptional coactivators potentiating AP-1 function in bone. *Front Biosci* 1998;3:D838-848
- 27 Goatley LC, Twigg SR, Miskin JE, Monaghan P, St-Arnaud R, Smith GL, Dixon LK. The African swine fever virus protein j4R binds to the alpha chain of nascent polypeptide-associated complex. *J Virol* 2002;76:9991-9999
- 28 Mossabeh R, Seiberler S, Mittermann I, Reininger R, Spitzauer S, Natter S, Verdino P, Keller W, Kraft D, Valenta R. Characterization of a novel isoform of alpha-nascent polypeptide-associated complex as IgE-defined autoantigen. *J Invest Dermatol* 2002;119:820-829
- 29 Yotov WV, St-Arnaud R. Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alpha NAC into amu-specific transcription factor. *Genes Dev* 1996;10:1763-1772
- 30 Moreau A, Yotov WV, Glorieux FH, St-Arnaud R. Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 1998;18:1312-1321

乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e 系统及 APF 水平

柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖 箐, 李建国

柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖箐, 李建国, 中山大学第三附属医院传染病学
广东省广州市 510630

柯伟民, 男, 1957-09-05 生, 广东省南澳县人。1983 年中山医学院本科毕业, 1988 年中山医科大学临床硕士研究生毕业。现任中山大学附属第三医院传染病学副教授, 副主任。从事传染病的临床医疗、教学和研究工作。发表论文和专著 30 篇。

项目负责人: 柯伟民, 510630, 广东省广州市, 中山大学附属第三医院传染病学。
kwmkwm@21cn.com

电话: 020-85516867-2033 传真: 020-85515940

收稿日期: 2002-11-12 接受日期: 2002-11-28

Correlation of splenic ultrasonography, HBV e system and AFP levels in hepatitis B with hepatic fibrosis and carcinogenesis

Wei-Min Ke, Guo-Li Lin, Yi-Nong Ye, Qin Lai, Jian-Guo Li

Wei-Min Ke, Guo-Li Lin, Yi-Nong Ye, Qin Lai, Jian-Guo Li, Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Wei-Min Ke, Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. kwmkwm@21cn.com

Received: 2002-11-12 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To clarify the relationship of splenic ultrasonography in liver fibrosis and carcinogenesis associated with hepatitis B, the spontaneous conversion of HBeAg to Anti-HBe and AFP level.

METHODS: The indexes of splenic ultrasonography of liver fibrosis along with carcinogenesis related with hepatitis B, positive rates of HBeAg or Anti-HBe and AFP levels were compared in different liver fibrosis stages and hepatocellular carcinoma (HCC) related with hepatitis B.

RESULTS: The lengths of spleen (mm) in stages of liver fibrosis S1, S2, S3, S4 and HCC with hepatitis B were 104.6 ± 13.1 , 108.7 ± 13.6 , 110.5 ± 15.4 , 123.0 ± 16.8 and 116.9 ± 28.2 , respectively; differences of splenic length between group S4 and groups S1, S2 or S3 were significant statistically ($P < 0.05$). The thicknesses of spleen (mm) in groups S1, S2, S3, S4 and HCC were 35.2 ± 6.3 , 37.0 ± 7.7 , 37.8 ± 9.6 , 43.3 ± 10.8 and 40.8 ± 11.2 , respectively; difference in splenic thickness between group S4 and S1 was significant statistically ($P < 0.05$). The widths of splenic vein (mm) in groups S1, S2, S3, S4 and HCC were 6.0 ± 1.4 , 6.5 ± 1.4 , 6.8 ± 1.7 , 7.8 ± 1.7 and 6.8 ± 2.6 respectively; there were differences among groups S4 and S1 or S2 ($P < 0.05$) statistically. The positive rates of HBeAg were 92% (23/25), 75.6% (31/41), 68.8% (22/32), 51.9% (14/27) and 13.5% (5/37); and the positive rates of anti-HBe were 4% (1/25), 19.5% (8/41), 25% (8/32), 33.3% (9/27) and 70.3% (26/37) in group S1, S2, S3, S4

and HCC, respectively; difference between each two group among group S1, S2, S3, S4 and HCC was significant ($P < 0.05$). The AFP levels ($\mu\text{g/L}$) were 11.0 ± 6.7 , 49.4 ± 74.5 , 112.1 ± 159.0 , 179.3 ± 210.8 and 367.4 ± 617.1 in group S1, S2, S3, S4 and HCC, respectively; there were differences among groups HCC and S1 or S2; S4, S3 or S2 and S1 ($P < 0.05$), statistically.

CONCLUSION: The length and thickness of spleen and width of splenic vein were increased as the deterioration of severity of hepatic fibrosis. The length of spleen is more sensitive in indicating the severity of liver fibrosis. Both AFP level and splenic size were elevated as the increase rate of spontaneous conversion from HBeAg to anti-HBe. The risk of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B exists in any stages of liver fibrosis.

Ke WM, Lin GL, Ye YN, Lai Q, Li JG. Correlation of splenic ultrasonography, HBV e system and AFP levels in hepatitis B with hepatic fibrosis and carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(7):963-965

摘要

目的: 探讨慢性乙型肝炎肝纤维化分期以及癌变时脾脏超声影像与HBeAg至抗-HBe自发血清转换以及甲胎蛋白水平的关系。

方法: 对慢性乙型肝炎不同肝纤维化分期以及癌变时脾脏超声影像指标, HBeAg与抗-HBe的阳性率和甲胎蛋白的水平进行比较。

结果: 慢性乙型肝炎肝纤维化的不同分期 S1, S2, S3, S4 组以及肝细胞癌组(HCC): 脾脏长径(mm)分别为 104.6 ± 13.1 , 108.7 ± 13.6 , 110.5 ± 15.4 , 123.0 ± 16.8 和 116.9 ± 28.2 , S4 组与 S1, S2 或 S3 组比较存在差异 ($P < 0.042-0.001$)。脾脏厚度(mm)分别为 35.2 ± 6.3 , 37.0 ± 7.7 , 37.8 ± 9.6 , 43.3 ± 10.8 和 40.8 ± 11.2 , 仅 S4 组与 S1 组比较存在差异 ($P < 0.017$)。脾静脉内径(mm)分别为 6.0 ± 1.4 , 6.5 ± 1.4 , 6.8 ± 1.7 , 7.8 ± 1.7 和 6.8 ± 2.6 , S4 组与 S1 或 S2 组比较存在差异 ($P < 0.05$)。HBeAg 的阳性率分别为 92% (23/25), 75.6% (31/41), 68.8% (22/32), 51.9% (14/27) 和 13.5% (5/37); 抗-HBe 的阳性率分别为 4% (1/25), 19.5% (8/41), 25% (8/32), 33.3% (9/27) 和 70.3% (26/37); HBeAg 和抗-HBe 的阳性率在 S1-S4 组和 HCC 组五组之间两两比较均存在差异 ($P < 0.05$)。AFP 的水平 ($\mu\text{g/L}$) 分别为 11.0 ± 6.7 , 49.4 ± 74.5 , 112.1 ± 159.0 , 179.3 ± 210.8 和 367.4 ± 617.1 ; HCC 组与 S1 或 S2 组比较, S4, S3 或 S2 组与 S1 组

比较存在差异($P < 0.05$)。

结论: 随着慢性乙型肝炎肝纤维化从S1至S4的逐渐加重, 脾脏的长径, 厚度和静脉内径也逐渐增大, 其中, 以脾脏的长径间接反映肝纤维化程度更为灵敏。伴随HBeAg至抗-HBe自发血清转换率的逐步增加, AFP水平逐渐升高, 脾脏也不断增大。乙型肝炎不同肝纤维化分期均有发生乙型肝炎相关肝细胞癌的危险。

柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖箐, 李建国. 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e系统及APF水平. 世界华人消化杂志 2003;11(7):963-965

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/963.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染造成肝脏炎症、坏死、再生和纤维化病变的持续活动^[1-4], 伴随脾脏的逐渐增大^[5], 有时甚至出现癌变^[6,7]。尽管, 肝脏病理组织学检查是评价肝脏病变的金指标, 但是, 肝活检是一种创伤性的检查, 普遍应用受到限制^[8,9]。故此, 有必要弄清慢性乙型肝炎不同肝纤维化分期以及癌变时脾脏超声改变与HBeAg至抗-HBe自发血清转换以及APF水平的关系, 进一步阐明脾脏超声改变在慢性乙型肝炎及其癌变发病机制和临床诊断的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 慢性乙型肝炎组: 125例, 男119例, 女6例, 年龄为 30 ± 8 岁, 未用过拉米夫定、干扰素和胸腺素等抗病毒治疗, 并排除重叠甲、丁、丙或戊型肝炎病毒感染, 去除抗病毒治疗^[10-14]以及重叠感染^[15,16]对肝脏纤维化分期和AFP水平的影响。每例均在彩色B型超声波仪的引导下使用自动活检装置切割活检肝组织, 肝活检标本用40 g/L甲醛固定, 石蜡切片, HE染色及网状纤维染色, 进行肝纤维化分期^[17,18]。乙型肝炎病原学诊断和肝纤维化分期标准根据文献^[19]进行。乙型肝炎相关肝细胞癌组: 37例, 男35例, 女2例, 年龄 48 ± 18 岁, 也无拉米夫定、干扰素和胸腺素等抗病毒药物的使用史, HBsAg阳性, 经手术获得病理标本, 经病理组织学检查诊断为肝细胞癌。

1.2 方法 血清AFP: 采用放射免疫法测定, 试剂盒由潍达3V公司提供, 检测方法按照说明书进行。血清甲、乙、丙、丁和戊型肝炎病毒标志物: 采用国内或合资厂家的商品化试剂, 用酶联免疫黏附试验方法检测, 血清采集与贮存, 检测程序和结果测定按照产品说明书的要求进行。脾脏超声检查: 使用BIOSOUND AU4彩色多普勒超声诊断仪, 探头3.5MHz测量脾脏的长径、厚度和脾静脉的内径。

统计学处理 应用统计软件SPSS 10.0版, 使用Dunnett T3方差检验对不同纤维化分期及癌变时脾脏超声改变和AFP水平进行两两比较; 使用多组之间 χ^2 检验对不同纤维化分期及癌变时HBV e系统进行两两比较。

2 结果

乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声改变, HBV e系统及APF水平见表1。乙型肝炎肝纤维化分期及癌变时脾脏超声改变, HBV e系统及AFP水平两两比较的统计学分析结果见表2。

2 结果

乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声改变, HBV e系统及APF水平见表1。乙型肝炎肝纤维化分期及癌变时脾脏超声改变, HBV e系统及AFP水平两两比较的统计学分析结果见表2。

表1 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声改变, HBV e系统及APF水平

参数	S1(25)	S2(41)	S3(32)	S4(27)	HCC(37)
脾脏长径(mm)	104.6 ± 13.1	108.7 ± 13.6	110.5 ± 15.4	123.0 ± 16.8	116.9 ± 28.2
脾脏厚度(mm)	35.2 ± 6.3	37.0 ± 7.7	37.8 ± 9.6	43.3 ± 10.8	40.8 ± 11.2
脾静脉内径(mm)	6.0 ± 1.4	6.5 ± 1.4	6.8 ± 1.7	7.8 ± 1.7	6.8 ± 2.6
HBeAg(+)-抗-HBe(-)	92%(23/25)	75.6%(31/41)	68.8%(22/32)	51.9%(14/27)	13.5%(5/37)
HBeAg(-)-抗-HBe(-)	4%(1/25)	4.9%(2/41)	6.3%(2/32)	14.8%(4/27)	16.2%(6/37)
HBeAg(-)-抗-HBe(+)	4%(1/25)	19.5%(8/41)	25%(8/32)	33.3%(9/27)	70.3%(26/37)
AFP(μ g/L)	11.0 ± 6.7	49.4 ± 74.5	112.1 ± 159.0	179.3 ± 210.8	367.4 ± 617.1

表2 乙型肝炎肝纤维化分期及癌变时脾脏超声改变, HBV e系统以及AFP水平两两比较

	脾脏长径	脾脏厚度	脾静脉内径	HBeAg(+)-抗-HBe(-)	HBeAg(-)-抗-HBe(+)	AFP
S1与S2	0.925	0.970	0.827	<0.05	<0.05	0.021
S1与S3	0.731	0.906	0.339	<0.05	<0.05	0.011
S1与S4	0.001	0.017	0.001	<0.05	<0.05	0.003
S1与HCC	0.219	0.125	0.622	<0.05	<0.05	0.008
S2与S3	1.000	1.000	0.984	<0.05	<0.05	0.335
S2与S4	0.005	0.107	0.020	<0.05	<0.05	0.042
S2与HCC	0.675	0.555	0.997	<0.05	<0.05	0.026
S3与S4	0.042	0.363	0.325	<0.05	<0.05	0.844
S3与HCC	0.923	0.914	1.000	<0.05	<0.05	0.152
S4与HCC	0.957	0.991	0.608	<0.05	<0.05	0.581

3 讨论

部分急性乙型肝炎病变迁延超过 6 mo 转变为慢性乙型肝炎, 引起肝脏纤维化进展以及门静脉压力的逐渐升高^[20,21]; 加上肝脏 Kupffer 细胞对来自门脉系统抗原处理能力下降促使免疫系统增生, 共同导致肝纤维化从 S1 至 S4 逐步发展, 脾脏的长径, 厚度和脾静脉内径逐渐增大(见表 1)。脾脏的长径在 S4 与 S1, S2 或 S3 的比较均有统计学差异($P < 0.042-0.001$), 比脾脏的厚度和脾静脉的内径反映肝纤维化更为敏感。一般认为, 乙型肝炎肝硬化比慢性乙型肝炎更容易并发肝细胞癌, HBV 可通过基因的整合^[22]、HBx 反式激活^[23,24]、转化生长因子 α 或抑癌基因 P⁵³ 的变异^[25,26]等机制引起癌变。但是, HCC 组脾脏的长径, 厚度和脾静脉内径均大于 S1, S2 和 S3 组而小于 S4 组, 与 S1-S4 四组之间比较均无统计差异, 说明乙型肝炎相关 HCC 的发病启动机制复杂^[27,28], 在慢性乙型肝炎不同分期均有发生 HCC 的可能。

肝纤维化从 S1 组至 S4 组, 再到 HCC 组, HBeAg 阳性率逐步下降, 反而, 抗-HBe 阳性率逐步升高, AFP 的水平也逐步升高。统计学分析(见表 2)HBV e 系统状态各组之间的两两比较均存在差异($P < 0.05$); AFP 水平在 S1 组与 S2, S3, S4 或 HCC 组, S2 与 S4 或 HCC 组之间的比较存在差异($P < 0.042-0.003$)。本组 162 例患者均没有拉米夫定、干扰素和胸腺素等抗病毒药物的使用史, 并且排除重叠甲、丙、丁或戊型肝炎的重叠感染, 在机体慢性免疫清除压力下, HBV 前 C 区出现变异, 逐渐出现 HBeAg 的自发血清转换, 导致 HBeAg 阳性率逐步下降和抗-HBe 阳性率逐步升高, 伴随肝脏的炎症、坏死、再生和纤维生成的累积, 造成脾脏进行性增大, APF 水平逐步升高, 肝纤维化不断发展, 有时甚至发生癌变。

4 参考文献

- Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsushashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2086-2092
- 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
- Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:42-48
- Macias-Rodriguez MA, Rendon-Unceta P, Martinez-Sierra MC, Teyssiere-Blas I, Diaz-Garcia F, Martin-Herrera L. Prognostic usefulness of ultrasonographic signs of portal hypertension in patients with child-pugh stage A liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3595-3600
- Okuno M, Kojima S, Moriwaki H. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma: concept, progress and perspectives. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1329-1335
- Wang XW, Hussain SP, Huo T, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002;27:181-182
- Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:679-685
- Han HL, Lang ZW. Changes in serum and histology of patients with chronic hepatitis B after interferon alpha-2b treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:117-121
- Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of Thymosin-a1 versus interferon-alpha-treatment in patients with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- Rizzetto M, Lagget M. Hepatitis B: therapeutic perspectives. *Forum (Genova)* 2001;11:137-150
- Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003;124:105-117
- Husa P, Chalupa P, Stroblova H, Husova L, Slesinger P. Efficacy of alpha-interferon therapy of chronic hepatitis patients infected with wild type hepatitis B virus and HBEAG-minus mutant. *Acta Virol* 2001;45:293-297
- You J, Zhuang L, Tang BZ, Yang WB, Ding SY, Li W, Wu RX, Zhang HL, Zhang YM, Yan SM, Zhang L. A randomized controlled clinical trial on the treatment of Thymosin a1 versus interferon-alpha in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:411-414
- Geller SA. Hepatitis B and hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2002;6:317-334
- Squadrito G, Orlando ME, Pollicino T, Raffa G, Restuccia T, Cacciola I, Di Marco V, Picciotto A, Colucci G, Craxi A, Raimondo G. Virological profiles in patients with chronic hepatitis C and overt or occult HBV infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1518-1523
- Scheuer PJ. Scoring of liver biopsies: are we doing it right? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8:1141-1143
- Scheuer PJ, Standish RA, Dhillon AP. Scoring of chronic hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002;6:335-347
- Chinese Society of Infectious Diseases and Parasitology and Chinese Society of Hepatology of Chinese medical association. The programme of prevention and cure for viral hepatitis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:324-329
- Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
- Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, Toyoda J, Yasuda K, Iino S. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2002;37:355-363
- 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
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001;36:651-660
- Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 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
- Liu H, Wang Y, Zhou Q, Gui SY, Li X. The point mutation of p53 gene exon7 in hepatocellular carcinoma from Anhui Province, a non HCC prevalent area in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:480-482
- Delpuech O, Trabut JB, Carnot F, Feuillard J, Brechot C, Kremsdorf D. Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2002;21:2926-2937
- 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

乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在HepG₂细胞的HLA-I表达

陈伟红, 何海棠, 张明霞, 刘志华, 周永兴

陈伟红, 周永兴, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710038
何海棠, 张明霞, 刘志华, 中国人民解放军第一军医大学南方医院传染科 广东省广州市 510515
陈伟红, 女, 1964-10-13 生, 浙江省嘉兴市人, 汉族, 医学博士生, 讲师。
项目负责人: 陈伟红, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科. chenwhong101@163.com
电话: 029-3377752 传真: 029-3537377
收稿日期: 2002-10-09 接受日期: 2002-11-09

Expression of HLA-I on HepG₂ cells by hepatitis B virus nucleocapsid mutants

Wei-Hong Cheng, Hai-Tang He, Ming-Xia Zhang, Zhi-Hua Liu, Yong-Xing Zhou

Wei-Hong Cheng, Yong-Xing Zhou, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.
Hai-Tang He, Ming-Xia Zhang, Zhi-Hua Liu, Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China.
Correspondence to: Wei-Hong Cheng, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. chenwhong101@163.com
Received: 2002-10-09 Accepted: 2002-11-09

Abstract

AIM: To study the expression of HLA-I/antigen peptide complex on HepG₂ cells transfected with HBV (adr) wild type and nucleocapsid protein mutants.

METHODS: The site-directed mutation was performed to introduce nucleocapsid protein point mutations V60 and L97 into 1.2 copies of HBV genome plasmid p3.8 II. After identification of DNA sequence and biological activities, the plasmid p3.8 II and mutant plasmid constructs were subcloned respectively into EB virus based vector EBO-plpp for stable expression. The vector constructed EBO-wild type, EBO-V60, and EBO-L97 were analyzed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing, then transfected into HepG₂ cells via the liposome technique, respectively. HBV antigen in their culture supernatants was quantified by Abbott kits. The cells were stained with murine monoclonal antibody anti-HLA-ABC conjugated directly to FITC, and expression of HLA-I on their membrane was analyzed by flow-cytometry.

RESULTS: Restriction enzyme digestion of 3 vector constructs showed two bands similar to HBV 1.2 copies genome and EBO vector, respectively. Analysis of DNA sequence confirmed the mutated nucleotides of EBO-V60 and EBO-L97 (i.e nt2078 C → G, nt2189 A → C). The expression of HBeAg S/CO in culture supernatant of EBO-wild type was much higher than that of mutant EBO-V60 and EBO-L97, while the expression of HBsAg S/N in three constructs had similar level, indicating similar transfecting rate in this experiment.

The expression of HLA-I on HepG₂ cells transfected with EBO empty vector was at low level. Fluorescence intensity of HLA-I expression of transfected cells was elevated by EBO-wild type (18.2), while that of L97 was increased to 34.5 and V60 declined to 3.4.

CONCLUSION: HBV might enhance the expression of HLA-I/antigen peptide complex on HepG₂ cells. Hot-spot mutations of HBV nucleocapsid protein L97 and V60 could influence the expression level of HLA-I on host cells.

Chen WH, He HT, Zhang MX, Liu ZH, Zhou YX. Expression of HLA-I on HepG₂ cells by hepatitis B virus nucleocapsid mutants. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):966-969

摘要

目的: 研究HBV adr亚型野生株和核壳蛋白变异株在HepG₂细胞表面的HLA-I/抗原肽复合物的表达。

方法: 通过定点突变技术将1.2拷贝HBV野生型质粒p3.8 II构建成核壳蛋白变异株V60和L97。经序列测定和生物学活性检测后,野生株和变异株重组质粒分别亚克隆入EB病毒表达载体EBO-plpp以稳定表达。重组载体EBO-野生株、EBO-V60和EBO-L97分别作内切酶双酶切和序列测定鉴定,再用脂质体介导转染HepG₂细胞,ELISA(Abbott)试剂盒定量检测各株培养上清HBV抗原,转染细胞用FITC标记的鼠抗HLA-ABC单抗染色,流式细胞术分析细胞表面HLA-I表达。

结果: 3株重组载体经内切酶消化,电泳后显示2条区带,分别与1.2拷贝HBV基因组和EBO载体大小相同。测序结果证实EBO-V60和EBO-L97分别在nt2078 C → G和nt2189 A → C,保持原定点突变。EBO-野生株的培养上清HBeAg定量S/CO值明显高于变异株V60和L97,3株HBsAg定量S/N值接近,HBsAg表达相近表明实验的转染效率相当。EBO空载体转染的HepG₂细胞HLA-I轻微表达,3株重组载体转染细胞HLA-I的荧光强度不同,野生株增强为18.2, L97明显升高至34.5,而V60降低至3.4。

结论: HBV能增强HepG₂细胞表面HLA-I/抗原肽复合物的表达,核壳蛋白热点变异V60和L97可使宿主细胞HLA-I表达发生变化。

陈伟红,何海棠,张明霞,刘志华,周永兴. 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在HepG₂细胞的HLA-I表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):966-969
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/966.asp>

0 引言

细胞表面的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)是激发并调节机体 T 细胞免疫应答的关键分子, HLA 与 HBV 的感染、病毒诱导的免疫应答和免疫病理的相关性已受到广泛关注^[1-9]. HBV C 基因编码的核壳蛋白是免疫应答的主要靶抗原, 免疫效应细胞 CTL 通过 TCR 识别并结合 HLA-I/病毒肽复合物实施细胞毒作用. 慢性感染者的 HBV C 基因长期处于免疫选择压力下常发生聚集性变异, 其中 AA97 的点突变占错义变异 45% 以上^[10-12]. 我国 HBV 主要流行亚型 adr 型的 C 基因变异中以 AA97 的异亮氨酸 ATC → 亮氨酸 CTC(L97)为最常见, AA60 亮氨酸 CTG → 缬氨酸 GTG(V60)为另一热点变异. 我们构建 HBV(adr)全基因野生株及 L97, V60 变异株 EBO 真核表达载体, 体外实验分析各株诱导 HepG₂ 细胞表面 HLA-I/抗原肽复合物表达的特性, 探讨核壳蛋白热点变异对 HLA-I 表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 含 1.2 拷贝 HBV adr 亚型基因组质粒 p3.8 II 由中国科学院生物化学研究所汪垣教授惠赠, 为野生株 3.2 kb 基因组 3' 端重叠 587 bp(nt1 402-1 987)片段插入 pBS⁺ 的重组质粒. EB 病毒稳定真核表达载体 EBO-plpp 由美国 Scripps 研究所 Francis V. Chisari 博士惠赠. 根据 Gan et al (Zhongguo Kexue B Gi 1986;1:55-65)报道的我国 HBV adr 核苷酸序列设计 PCR 引物(表 1).

表 1 PCR 引物核苷酸序列

引物	序列(5' → 3')
L97 点突变引物	L1 GGCTAAAACCTCAGACAACCTA
	L2 TAGTTGTCTGAGTTTTAGGCC
V60 点突变引物	V1 AGGCAAGCTATTGTGTGTGGGGTG
	V2 CACCCCAACACACAATAGCTTGCCT
测序引物	Pee2 GCGGGTACCCTAACATTGAGATTCCCCG
亚克隆引物	P1 GCTGTCGACCGCTTGATGCCT
	P2 CCTTCTCGGTACCGGGGATCTA

1.2 方法 p3.8 II 变异株重组质粒的构建采用 Quik ChangTM 定点突变试剂盒(Stratagene), 以质粒 p3.8 II DNA 为模板, 分别加入 L97 及 V60 点突变引物 L₁, L₂ 及 V₁, V₂ 进行定点突变, 构建成 p3.8 II L97 和 p3.8 II V60 重组质粒. 变异株重组质粒用 Pee₂ 引物扩增后进行全自动测序(上海基康生物公司). 将 p3.8 II 野生株(WT)及变异株重组质粒以脂质体(Gibco)介导分别转染 HepG₂ 细胞, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液(Gibco)培养 96 h, 收集细胞和培养上清, 用 Southern 印迹杂交(HBV 地高辛标记探针)分析细胞内 HBV DNA 的复制, ELISA 法测定上清中 HBV 抗原, 以检测其生物活性. EBO-野生株及变异株重组载体的亚克隆构建以 p3.8 II WT,

p3.8 II L97 及 p3.8 II V60 质粒 DNA 为模板, 各自加入 5' 端带 Sal I 及 Kpn I 酶切位点的引物 P₁ 及 P₂, 用 Z-Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)进行 PCR 扩增, 各株 PCR 产物及 EBO-plpp 载体分别用 Sal I 及 Kpn I (Promega)双酶切, 电泳后凝胶回收, 用 T₄DNA 连接酶(Promega)在 16 °C 连接过夜, 转化感受态细菌 XL-1, 筛选阳性克隆. 各株重组载体阳性克隆用 Sal I 及 Kpn I 双酶切, 进行凝胶电泳. 以 Pee₂ 引物 PCR 扩增各株阳性克隆, 再次作自动化测序(上海基康生物公司). 将 EBO-WT, EBO-L97, EBO-V60 重组载体及 EBO 空载体 DNA 各 2 μg, 经脂质体 10 μL 介导转染 HepG₂ 细胞, 用潮霉素 200 mg/L 筛选, 每 2 d 定量更换培养液, 建立各株稳定表达的细胞. 转染实验重复进行 3 次. 用 ELISA(Abbott)试剂盒测定各株细胞培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的含量, 分别以 S/N 值和 S/CO 值表示. 收集各株转染的 HepG₂ 细胞 2 × 10⁶ 个, 以 FITC 标记的鼠抗 HLA-ABC 单克隆抗体(Phar Mingen)室温避光染色 30 min, PBS 洗 2 次, 40 mL/L 多聚甲醛固定, 以未转染的 HepG₂ 细胞作阴性对照, 用流式细胞仪检测, 分析 5 × 10⁴ 个细胞的荧光强度.

2 结果

2.1 p3.8 II 变异株重组质粒序列测定及生物活性检测 变异株质粒 DNA 测序结果, p3.8 II L97 的 nt2189 A → C, p3.8 II V60 的 nt 2 078 C → G, 证实定点突变. p3.8 II 变异株及 p3.8 II 野生株转染细胞的 Southern 印迹杂交显示在 3.8 kb 处呈现一明显杂交带, 符合目的基因组大小, 表明所构建的重组质粒均能在细胞内复制, 细胞培养上清中均测出 HBsAg 和 HBeAg, 有 HBV 抗原表达.

2.2 EBO 重组载体的酶切鉴定及序列测定 所构建的 EBO-WT, EBO-97 及 EBO-V60 重组载体 DNA 各经 Sal I 及 Kpn I 内切酶双酶切, 电泳后均出现二条区带, 分别与 HBV 目的基因组及 EBO 表达载体的大小相符. EBO-L97 及 EBO-V60 DNA 测序结果显示均保持原定的点突变.

2.3 EBO 重组载体转染细胞培养上清 HBsAg 和 HBeAg 定量检测 3 次转染实验的细胞培养上清中 HBV 抗原平均含量, 3 株表达的 HBeAg S/CO 值不同, EBO-L97 及 EBO-V60 均明显低于 EBO-WT, 3 株上清的 HBsAg S/N 值接近, 表达水平相似(表 2).

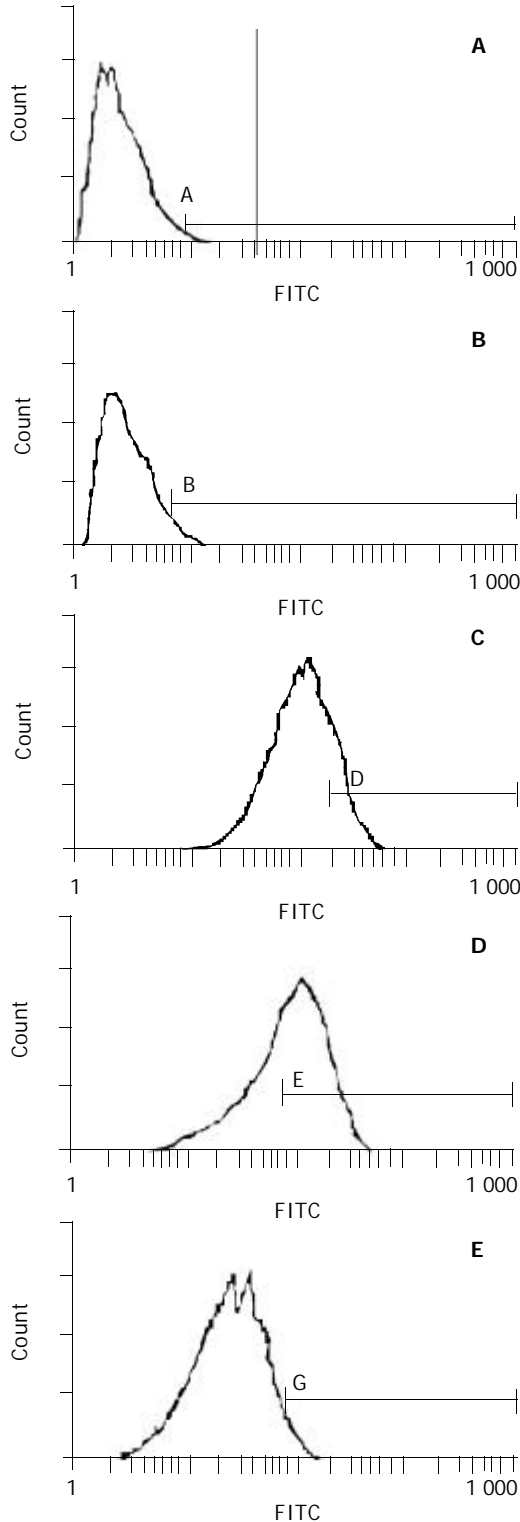
表 2 转染细胞培养上清 HBV 抗原含量

HBV 抗原	EBO-WT	EBO-L97	EBO-V60
HBsAg(S/N)	4.34	3.96	4.18
HBeAg(S/CO)	3.30	0.98	1.52

HBsAg 含量 S/N 参考值 < 2.00 HBeAg 含量 S/CO 参考值 < 1.00.

2.4 宿主细胞表面 HLA-I 表达 流式细胞术分析测定 3 批转染实验的 HepG₂ 细胞. 未转染的及 EBO 空载体转染

的 HepG₂ 细胞表面的 HLA-I 为轻微表达, 其荧光强度为 1.8 和 2.2. 3 株重组载体转染细胞的 HLA-I 表达水平各不相同, 野生株的 HLA-I 荧光强度增强为 18.2, L97 变异株升高至 34.5, 而 V60 变异株表达的荧光强度仅为 3.4 (图 1).



A: 空白未转染; B: EBO 空载体转染;
C: EBO - WT 转染; D: EBO - L97 转染; E: EBO - V60 转染
图 1 流式细胞仪对 HepG₂ 细胞表面 HLA-I 表达的检测.

3 讨论

HBV 并非直接导致肝细胞病变, 而是其编码蛋白与机

体免疫应答相互作用后, 引起肝组织发生免疫病理损伤, 同时抑制和清除细胞内外病毒, 在免疫应答过程中 HLA-I 类分子限制的特异性 CD₈⁺T 细胞的细胞毒作用十分重要^[13-18]. 正常肝细胞表面不表达或仅微量表达 HLA-I 类分子. 研究已表明 HBV 感染者肝细胞膜上 HLA-I 表达强度与肝组织病变活动性及损伤程度往往呈正相关, 急性重型肝炎患者为强表达, 慢性感染者在免疫耐受期为弱表达, 免疫激活期 HLA-I 表达增强, 肝组织炎症活动, 部分病毒被清除^[4,6,19]. 机体内细胞膜上 HLA-I 的表达受到病毒及免疫细胞激活后产生的细胞因子及其他诸多方面的诱导和调节^[20,21], 建立细胞模型可探讨病毒本身与宿主细胞间的相互作用. 由于 HBV 基因组结构复杂, 编码基因相互重叠, 基因内部有调节序列^[10,22,23], 单一基因片段的体外表达有局限性, 用全基因重组质粒转染细胞更接近病毒在体内的复制、表达、加工和分泌情况. 我们用 HBV adr 亚型野生株含 1.2 拷贝基因组质粒 p3.8 II, 对核壳蛋白热点变异 97 位氨基酸及 60 位氨基酸分别进行定点突变, 再双酶切定向亚克隆入 EB 病毒真核表达载体 EBO-plpp, 能在转染的 HepG₂ 细胞中稳定表达, HepG₂ 细胞的 HLA 抗原型别以 HLA-A2 为主, HLA-A2 在亚洲人群中携带频率最高, 因而本实验采用了较合理的细胞模型^[24-26], 进行核壳蛋白密码子点突变的 HLA-I 表达的研究. 实验结果显示, HBV 野生株重组载体 EBO-WT 较 EBO-plpp 空白载体转染和未转染的 HepG₂ 细胞表面 HLA-I 表达明显增强, 与国外 (Zhou et al 1990, Takehara et al 1992) 体外表达的研究结果相同, 初步表明 HBV 病毒自身可增强细胞膜上 HLA-I 表达. 其他病毒可上调感染细胞 HLA-I 表达的实验研究报道也不少, 如黄热病病毒家族、呼吸道合胞病毒、单纯疱疹病毒、人副流感病毒 3 型等^[27-31].

EBO-WT, EBO-L97 及 EBO-V60 重组载体转染 HepG₂ 细胞稳定传代后, 培养上清中 HBV 抗原定量检测结果, 3 株表达 HBeAg 的水平不同, L97 及 V60 变异株的 HBeAg S/CO 值明显较野生株为低, 3 株的 HBsAg S/N 值接近, HBsAg 表达水平相近, 表明重组载体转染率及检测结果相当, 因而其转染细胞膜上 HLA-I 表达分析有一定可比性. 流式细胞术分析 3 株宿主细胞 HLA-I 表达, L97 变异株 HLA-I 荧光强度高于野生株, 而 V60 变异株表达强度低于野生株, 表明 HBV 核壳蛋白单个错义点突变可使宿主细胞表面 HLA-I 表达发生差异. Yuan et al^[32-34]用 HBV adr 亚型双拷贝基因组的核壳蛋白变异株做体外实验, 发现 L97(I97L)及 V60(L60V)变异在 HepG₂ 细胞内的复制水平与野生株相近, 但 L97 分泌未成熟的 (含 ssDNA) Dane 颗粒, 且颗粒数量明显增加, V60 则分泌成熟的 Dane 颗粒, 其量下降 3-6 倍, 充分说明 HBV 核壳蛋白上述密码子错义突变能引起病毒的表达、加工、分泌等生物学功能的变化. 我国 HBV 感染率高^[35-40], 关于 HBV 转染细胞中内源性细胞因子对

HLA - I 表达的影响以及核壳蛋白 L97 及 V60 变异导致宿主细胞 HLA-I 表达变化的机制, 均有待深入研究探讨.

4 参考文献

- 1 Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, Kim YS, Park K, Kim DK, Moon YM. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000; 31:1371-1373
- 2 Neumann UP, Langrehr JM, Naumann U, Lang M, Rayes N, Steinmuller T, Radtke C, Neuhaus P. Impact of HLA-compatibilities in patients undergoing liver transplantation for HBV-cirrhosis. *Clin Transplant* 2002;16:122-129
- 3 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:43-50
- 4 Jang YG, Wang YM. HLA complex and hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1150-1153
- 5 Zhang XQ, Zhang R, Gu CH, Wang YM. Significance of ICAM-1 and HLA-DR expression in liver of hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:233-234
- 6 Si H, Wang FS. Host factors in chronicity of hepatitis b virus infection and their significances in clinic. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:66-69
- 7 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Significance of HLA-DR antigen expression in chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:835-836
- 8 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression and significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in liver biopsy specimens of chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:907-910
- 9 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression and significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1139-1142
- 10 Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000;31:1037-1044
- 11 Preikschat P, Gunther S, Reinhold S, Will H, Budde K, Neumayer HH, Kruger DH, Meisel H. Complex HBV populations with mutations in core promoter, C gene, and pre-S region are associated with development of cirrhosis in long-term renal transplant recipients. *Hepatology* 2002;35:466-477
- 12 Yuan TT, Sahu GK, Whitehead WE, Greenberg R, Shih C. The mechanism of an immature secretion phenotype of a highly frequent naturally occurring missense mutation at codon 97 of human hepatitis B virus core antigen. *J Virol* 1999;73:5731-5740
- 13 Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002;195:1089-1101
- 14 Sobao Y, Tomiyama H, Sugi K, Tokunaga M, Ueno T, Saito S, Fujiyama S, Morimoto M, Tanaka K, Takiguchi M. The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication. *J Hepatol* 2002;36:105-115
- 15 Matsumura S, Yamamoto K, Shimada N, Okano N, Okamoto R, Suzuki T, Hakoda T, Mizuno M, Higashi T, Tsuji T. High frequency of circulating HBeAg-specific CD8 T cells in hepatitis B infection: a flow cytometric analysis. *Clin Exp Immunol* 2001;124:435-444
- 16 Maini MK, Reignat S, Boni C, Ogg GS, King AS, Malacarne F, Webster GJ, Bertoletti A. T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection. *Eur J Immunol* 2000;30:3067-3078
- 17 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280
- 18 Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertoletti A. Direct *ex vivo* analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999;117:1386-1396
- 19 Stolarz W, Wiczkowski A, Wojnicz R, Dziambor A, Kepa L, Biskupska-Karasinska M. The HLA-I and HLA- II expression evaluation in liver biopsy specimens of patients with chronic viral hepatitis. *Przegl Epidemiol* 1999;53:385-393
- 20 Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 1999;42:100-116
- 21 Dorries R. The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001;253:219-245
- 22 Zoulim F, Trepo C. New antiviral agents for the therapy of chronic hepatitis B virus infection. *Intervirology* 1999;42:125-144
- 23 Shan H, Niitsuma H, Nagasaki F, Cervantes J, Ojima T, Ueno Y, Kobayashi K, Ishii M, Shimosegawa T. Analysis of the entire nucleotide sequence of hepatitis B virus: characteristics of HBeAg-positive asymptomatic carriers, HBeAb positive asymptomatic carriers and patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2002;23:251-252
- 24 Detema G, Mulder A, Claas FH, van den Elsen PJ. Detection and characterization of HLA class I molecules in the supernatant of an hepatocarcinoma cell line and of EBV-transformed B cell lines. *Hum Immunol* 1999;60:435-441
- 25 Keskinen P, Nyquvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melen K, Julkunen I. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 1999;263:364-375
- 26 Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:654-657
- 27 Momburg F, Mullbacher A, Lobigs M. Modulation of transporter associated with antigen processing (TAP)-mediated peptide import into the endoplasmic reticulum by flavivirus infection. *J Virol* 2001;75:5663-5671
- 28 Wang SZ, Hallsworth PG, Dowling KD, Alpers JH, Bowden JJ, Forsyth KD. Adhesion molecule expression on epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Eur Respir J* 2000;15:358-366
- 29 Jamaluddin M, Wang S, Garofalo RP, Elliott T, Casola A, Baron S, Brasier AR. IFN-beta mediates coordinate expression of antigen-processing genes in RSV-infected pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L248-257
- 30 Abendroth A, Simmons A, Efstathiou S, Pereira RA. Infection with an H2 recombinant herpes simplex virus vector results in expression of MHC class I antigens on the surface of human neuroblastoma cells *in vitro* and mouse sensory neurons *in vivo*. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 10):2375-2383
- 31 Gao J, De BP, Banerjee AK. Human parainfluenza virus type 3 up-regulates major histocompatibility complex class I and II expression on respiratory epithelial cells: involvement of a STAT1- and CIITA-independent pathway. *J Virol* 1999;73:1411-1418
- 32 Yuan TT, Tai PC, Shih C. Subtype-independent immature secretion and subtype-dependent replication deficiency of a highly frequent, naturally occurring mutation of human hepatitis B virus core antigen. *J Virol* 1999; 73:10122-10128
- 33 Yuan TT, Shih C. A frequent, naturally occurring mutation (P130T) of human hepatitis B virus core antigen is compensatory for immature secretion phenotype of another frequent variant (I97L). *J Virol* 2000;74:4929-4932
- 34 Yuan TT, Le Pogam S, Sahu GK, Chatterjee S, Shih C. Low-level secretion of human hepatitis B virus virions caused by two independent, naturally occurring mutations (P5T and L60V) in the capsid protein. *J Virol* 2000;74:9099-9105
- 35 Li H, Li RC, Liao SS, Gong J, Zeng XJ, Li YP. Long-term effectiveness of infancy low-dose hepatitis B vaccine immunization in Zhuang minority area in China. *World J Gastroenterol* 1999;5:122-124
- 36 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation insite 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 37 Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52
- 38 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 39 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- 40 Wei J, Wang YQ, Lu ZM, Li GD, Wang Y, Zhang ZC. Detection of anti-preS1 antibodies for recovery of hepatitis B patients by immunoassay. *World J Gastroenterol* 2002;8:276-281

联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达

王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明

王志荣, 陈锡美, 同济大学附属同济医院消化内科 上海市 200065
李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092

王志荣, 男, 1962-09 生, 安徽省凤阳县人, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 1986 年安徽中医学院本科毕业, 1991 年山西医科大学硕士毕业, 2001 年于上海第二医科大学博士毕业, 主要从事慢性肝病和慢性胃黏膜疾病的基础与临床研究, 发表论文 20 篇。

项目负责人: 王志荣, 200065, 上海市新村路 389 号, 同济大学附属同济医院消化内科。wzrg@sohu.com

电话: 021-56501080-1075

收稿日期: 2001-12-20 接受日期: 2002-10-03

Suppression of expression extracellular matrix in hepatic fibrosis rat with tetrandrine and glycyrrhizinic acid

Zhi-Rong Wang, Xi-Mei Chen, Ding-Guo Li, Hong-Shan Wei, Xin Huang, Yu-Tao Zhan, Han-Ming Lu

Zhi-Rong Wang, Xi-Mei Chen, Ding-Guo Li, Hong-Shan Wei, Xin Huang, Yu-Tao Zhan, Han-Ming Lu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, 389 Xincun Rd. Shanghai 200065, China
Correspondence to: Zhi-Rong Wang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, 389 Xincun Rd. Shanghai 200065, China. wzrg@sohu.com

Received: 2001-12-20 Accepted: 2002-10-03

Abstract

AIM: To investigate effects and mechanism of tetrandrine (Tet) and glycyrrhizinic acid (Glz) in combination on metabolism of extracellular matrix in hepatic fibrotic rats induced by carbon tetrachloride.

METHODS: The hepatic fibrosis model rats induced with carbon tetrachloride were grouped randomly into 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg Tet, 5 mg/kg Tet+50 mg/kg Glz, 10 mg/kg Tet+50 mg/kg Glz, 20 mg/kg Tet+50 mg/kg Glz and 50 mg/kg Glz groups. Rats in experimental groups were administered with Tet and/or Glz by gavage or peritoneal injection every day. Serum levels of HA, LN, and PIIIP were detected with radioimmunoassay. Histopathological change was examined with VG staining and observed under light-microscope. mRNA of collagen type I and III were evaluated by RT-PCR.

RESULTS: In comparison with model group, Tet and Glz in combination could markedly decrease serum levels of HA, LN and PIIIP (121.8 ± 9.5 vs 58.4 ± 7.6 , 85.7 ± 12.1 vs 46.2 ± 7.3 , 35.9 ± 3.5 vs 23.5 ± 2.9 ; $P < 0.05$), and suppress the expressions of type I, III procollagen mRNA (0.53 ± 0.07 vs 0.26 ± 0.09 , 0.47 ± 0.05 vs 0.21 ± 0.07 ; $P < 0.05$), and reduce deposition of extracellular matrix. Compared with Tet (10mg/kg) only group, Tet with Glz in combination could markedly reduced the serum levels of HA, LN and PIIIP (69.2 ± 11.1 vs 58.4 ± 7.6 ;

52.3 ± 6.7 vs 46.2 ± 7.3 ; 29.9 ± 3.2 vs 23.5 ± 2.9 ; $P < 0.05$), and inhibit the expression of type I, III procollagen mRNA (0.33 ± 0.06 vs 0.26 ± 0.09 , 0.29 ± 0.04 vs 0.21 ± 0.07 ; $P < 0.05$).

CONCLUSION: Tet and Glz in combination could inhibit expression and deposition of extracellular matrix in fibrotic rats more significantly than either Tet or Glz.

Wang ZR, Chen XM, Li DG, Wei HS, Huang X, Zhan YT, Lu HM. Suppression of expression extracellular matrix in hepatic fibrosis rat with tetrandrine and glycyrrhizinic acid. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):970-974

摘要

目的: 观察联合应用粉防己碱(Tet)与甘草酸(Glz)对实验性肝纤维化大鼠细胞外基质代谢的影响, 并探讨其作用机制。

方法: 将四氯化碳诱导的Sprague-Dawley大鼠肝纤维化动物模型随机分为模型对照组、5 mg/kg 体重 Tet 组、10 mg/kg 体重 Tet 组、20 mg/kg 体重 Tet 组、5 mg Tet+50 mg Glz 组、10 mg Tet+50 mg Glz 组、20 mg Tet+50 mg Glz 组及 50 mg/kg 体重 Glz 组。分别给予不同剂量 Tet 剂量和/或 Glz 灌胃和/或腹腔注射, 对照组给予相应溶媒等干预。用放射免疫法、VG 染色法和 RT-PCR 法检测血清透明质酸、层粘连蛋白和 III 型前胶原肽含量及组织病理学变化和 I、III 型前胶原 mRNA 表达。

结果: 与模型组比较, 联合应用 Tet 与 Glz 能够降低血清 HA、LN 及 PIIIP 水平 (121.8 ± 9.5 vs 58.4 ± 7.6 , 85.7 ± 12.1 vs 46.2 ± 7.3 , 35.9 ± 3.5 vs 23.5 ± 2.9 ; $P < 0.05$); 减轻肝组织细胞外基质沉积 ($P < 0.05$); 较单独应用 Tet 效果更显著 (69.2 ± 11.1 vs 58.4 ± 7.6 ; 52.3 ± 6.7 vs 46.2 ± 7.3 ; 29.9 ± 3.2 vs 23.5 ± 2.9 ; $P < 0.05$)。与模型组比较, 联合应用 Tet 与 Glz 能够显著抑制纤维化大鼠肝组织 I、III 型前胶原 mRNA 表达 (0.53 ± 0.07 vs 0.26 ± 0.09 , 0.47 ± 0.05 vs 0.21 ± 0.07 ; $P < 0.05$); 较单独应用 Tet 效果更显著 (0.33 ± 0.06 vs 0.26 ± 0.09 , 0.29 ± 0.04 vs 0.21 ± 0.07 ; $P < 0.05$)。

结论: 联合应用 Tet 与 Glz 较单独用药更显著的抑制肝纤维化细胞外基质合成, 有望将二种药物制成复方以提高抗肝纤维化疗效。

王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明. 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):970-974

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/970.asp>

0 引言

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成过多、降解减少而沉积于组织间隙是肝纤维化发生发展的基本病理过程, 调节ECM代谢是防治肝纤维化的关键. 迄今为止尚无特效药物能够完全阻断慢性肝病肝脏ECM过多表达与沉积^[1,2]. 既往研究资料表明粉防己碱(tetrandrine, Tet)具有保护肝细胞、抗炎、抗氧化、阻断Ca²⁺通道及抗肝纤维化作用^[3]; 但由于Tet的中毒剂量与有效剂量较为接近而影响其临床推广应用. 甘草酸(glycyrrhizinic acid, Glz)具有保护细胞膜、清除自由基、调节免疫及抗肝纤维化功能^[4,5]. 为了达到提高疗效, 减少毒副作用的目的, 本研究探讨了联合应用Tet与Glz对实验性肝纤维化大鼠肝脏ECM代谢的影响, 并探讨其机制.

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物♂ Sprague-Dawely大鼠, 体重为200 ± 10 g, 清洁级, 购自中国科学院上海实验动物中心. 普通饲料喂养, 自由饮水及进食. 四氯化碳为上海长江化工厂产品. Tet粉剂为浙江金华第三制药厂产品. Glz(由江苏正大天晴制药有限公司产品提供). 透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)及III型前胶原肽(procollagen type III peptide, PIIIP)测定试剂盒购自海军上海医学研究所产品. RNA抽提试剂盒(TRIZOL Reagent)和DNA Marker(7zf(+)/DNA/HaeIII): 华舜生物工程公司产品. 逆转录试剂盒(AccuPower™ RTPreMix): 赛百盛公司公司产品. Taq DNA聚合酶、随机引物、dNTP及10× Reaction Buffer: 上海生工生物工程有限公司产品. I型、III型前胶原及磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因引物序列为I型前胶原: Sense 5' -CCTGGCAAGAACGGAGATGA T-3', Antisense 5' -ACCGAC AGCACCATCGTTACC-3', III型前胶原: Sense 5' TGGCCAACCAGGAG AGAA GG 3', Antisense 5' ATCCGTCTCGACGTGGCTGA 3', GAPDH: Sense 5' CATG GTCTACACGTTCCAGT 3', Antisense 5' GGCTAAGCAGTTGG TGGTGC 3', 由生工公司合成.

1.2 方法

动物模型的建立: 按照0.3 ml/100 g体重剂量, 於大鼠腹股沟或背部皮下注射40% CCl₄溶液, 首次剂量加倍, 以后每3 d给药1次, 共6 wk. 动物分组及处理: 81只♂ Sprague-Dawely大鼠随机分为9组: I组: 模型组; II组: 5 mg/kg体重Tet组; III组: 10 mg/kg体重Tet; IV组: 20 mg/kg体重Tet组; V组: 5 mg/kg体重Tet + 50 mg/kg体重Glz组; VI组: 10 mg/kg体重Tet + 50 mg/kg体重Glz组; VII组: 20 mg/kg体重Tet + 50 mg/kg体重Glz组; VIII组: 50 mg/kg体重Glz组; IX组: 正常组. 模型对照组给予相应剂量CCl₄皮下注射, 各剂量Tet干预组及各联合干预组同时给予相应剂量的Tet混悬液灌胃, 1次/d; Glz干预组及各联合干预组给予相应剂量Glz注射液腹腔注射, 1次/d; 其余各组给予相同体积溶媒皮下或腹腔注射和/或灌

胃, 共42 d. 最后1次给药24 h后处死动物, 取血清和肝组织标本, 置-80℃冰箱中保存待测. 并取部分肝组织用10%中性甲醛固定, 用于组织病理学检测. 采用放射免疫法检测血清HA、LN及PIIIP含量, 具体步骤分别按试剂盒说明书进行.

用van Gieson苦味酸酸性复红染色法检测肝纤维化组织病理学, 参照有关文献[6], 进行肝纤维化程度计分.

RT-PCR法检测I型和III型前胶原mRNA表达, 采用异硫氰酸胍一步法, 按试剂盒说明书操作, 提取大鼠肝组织总RNA后, 按逆转录试剂盒说明逆转录成cDNA. 采用体积为25 ml的PCR反应体系进行扩增, 在0.5 ml薄壁反应管内依次加入: (1) H₂O 14 μl; (2) 10×Reaction Buffer 2.5 μl; (3) dNTP(2 mM) 1 μl; (4) MgCl₂(25 mM) 1 μl; (5) Sense primer (10 pmol) 2 μl; (6) Antisense primer (10 pmol) 2 μl; (7) TaqDNA polymerase (2.5 u) 0.5 μl; (8) 逆转录产物 2 μl. 置PCR仪中进行扩增. I型前胶原mRNA扩增条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 51.5℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共30个循环; 72℃ 5 min. 扩增片断长度为698 bp. III型前胶原mRNA扩增条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共30个循环; 72℃ 5 min. 扩增片断长度为487 bp. GAPDH mRNA扩增条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 51.5℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共30个循环; 72℃ 5 min. 扩增片断长度为349 bp. PCR产物经2%琼脂糖凝胶, 25 mV, 50 mA条件下电泳. 电泳结果经Fluors-Multimager扫描仪扫描成像. 用Multi-Analyst software package进行PCR产物半定量. I型、III型前胶原mRNA相对含量用I型、III型前胶原mRNA相对含量用I型、III型前胶原吸光度×面积与GAPDH吸光度×面积之比值表示.

统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经SAS统计分析软件包进行ANOVA及Ridit分析.

2 结果

2.1 各组动物血清HA、LN及PIIIP含量变化

各组动物血清HA、LN及PIIIP水平见表1, I组动物血清HA、LN及PIIIP浓度均显著高于IX组(P < 0.001). III组、IV组、VI组及VII组血清LN含量显著低于I组(P < 0.05), VI组及VII组最为明显; II组、V组及VIII组动物血清LN无明显降低(P > 0.05). III组、V、VI、VII组及VIII组动物血清PIIIP含量均低于I组(P < 0.05), VI组效果最优; II组和IV组动物血清PIIIP含量与II组无差异(P > 0.05). III组、IV组、V组、VI组、VII组及VIII组动物血清HA含量均显著低于I组(P < 0.05), VI组和VII组血清HA浓度最低, 两组间无差异(P > 0.05); II组与I组比较无显著降低(P > 0.05). 结果提示除5 mg/kg体重组外, 各药物干预组均能不同程度地降低肝纤维化大鼠血清HA、LN及PIIIP含量, 10 mg/kg体重或20 mg/kg体重Tet与Glz联合应用效果更好.

2.2 肝组织病理学变化

各组动物肝组织病理学变化见表2及组织学照片(图1-9). 结果显示I组大鼠肝组织中可见明显的肝细胞脂肪变性、坏死及炎性细胞浸润; 汇管区胶原

纤维沉积,纤维结缔组织自汇管区呈放射状扩展、向小叶周围延伸;部分中央静脉区纤维结缔组织沉积增多;有典型的假小叶形成;肝纤维化积分显著高于IX组(图1,2)。III组、IV组、V组、VI组、VII组及VIII组大鼠肝组织中肝细胞变性坏死明显减轻,纤维结缔组织沉积减少,纤维间隔及假小叶形成率明显低于I组,VI组疗效最为显著(图4-9);II组与I组差异不显著(图2,3)。提示10 mg/kg 体重 Tet、20mg/kg 体重 Tet、50 mg/kg 体重 Glz 单独运用,或不同剂量 Tet 与 Glz 联合应用能够显著减轻肝纤维化组织病理学变化。

2.3 各组动物肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达 各组动物肝组织 I 型及 III 型前胶原 mRNA 相对含量见表3及(图10,11)。I组大鼠肝组织 I 型及 III 型前胶原 mRNA 相对含量显著高于 IX 组($P < 0.001$); III 组、IV、V 组、VI 组、VII 组及 VIII 组动物肝组织 I 型和 III 型胶原 mRNA 含量显著低于 I 组($P < 0.05$); VI 组动物肝组织 I 型和 III 型胶原 mRNA 含量低于 Tet 及 Glz 单独用药组。II 组与 I 组比较无显著差异($P > 0.05$)。

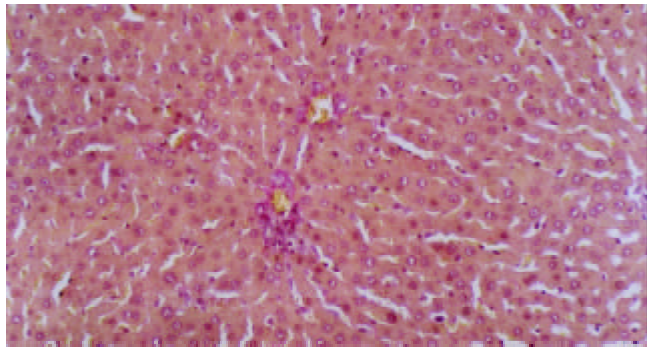
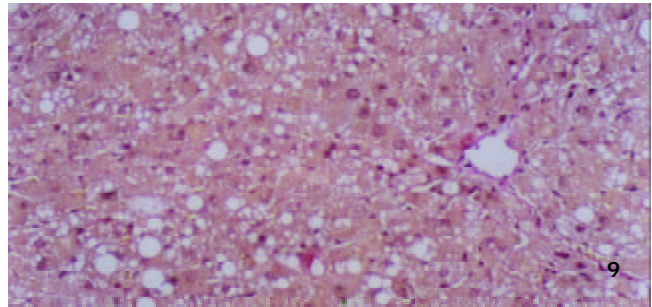
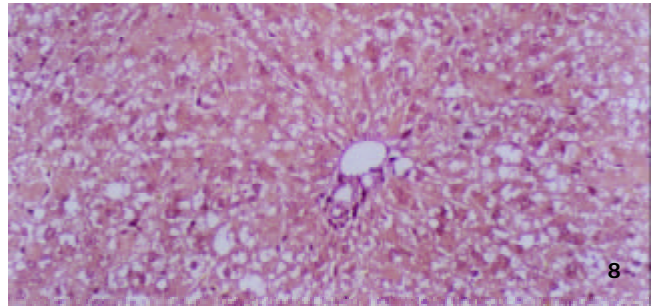
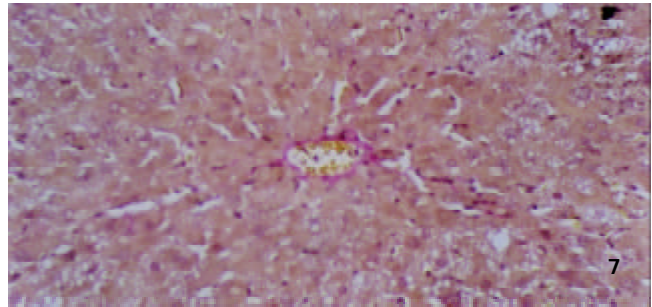
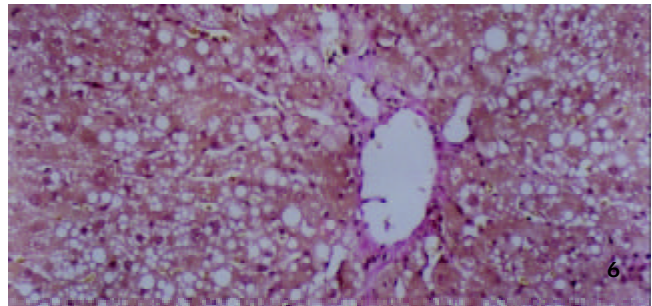
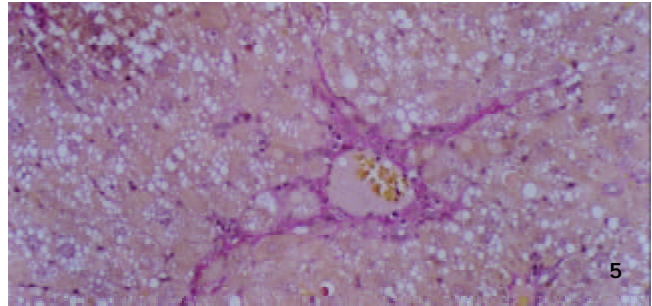
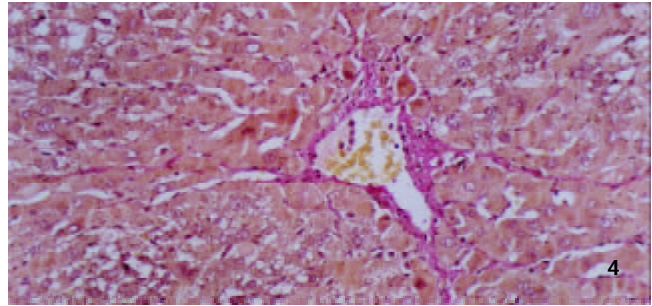


图1 IX组肝组织,VG染色×200.

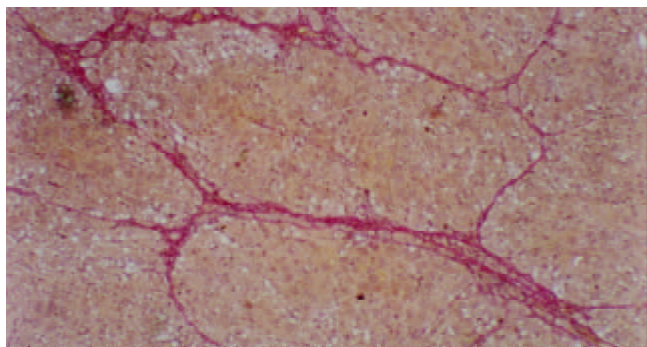


图2 I组肝组织,VG染色×100.

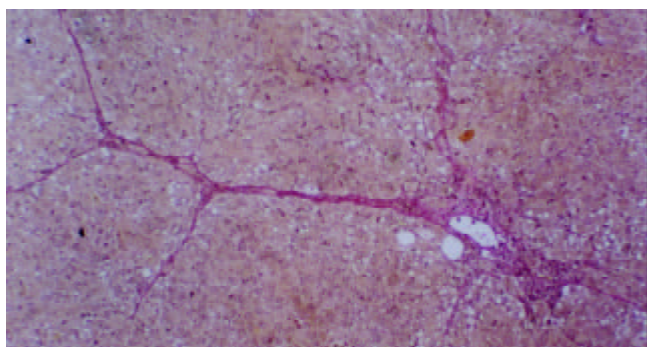


图3 II组肝组织,VG染色×100.

图4 III组肝组织,VG染色×200. 图5 IV组肝组织,VG染色×100.
图6 VI组肝组织,VG染色×200. 图7 V组肝组织,VG染色×200.
图8 VII组肝组织,VG染色×200. 图9 VIII组肝组织 VG染色×200.

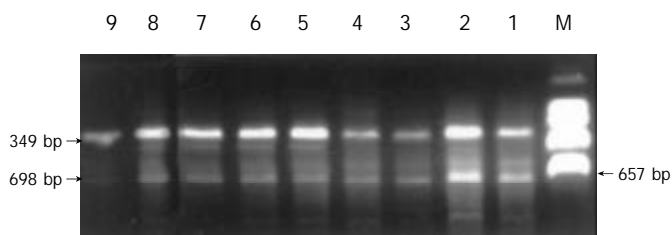


图 10 各组动物肝组织 I 型前胶原 mRNA 电泳条带.

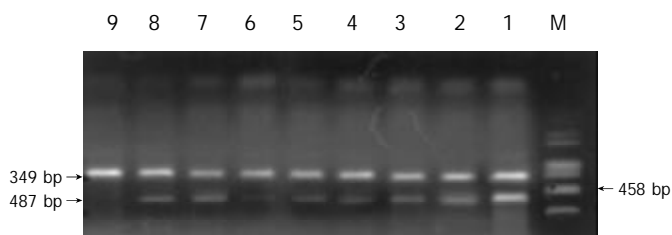


图 11 各组动物肝组织 III 型前胶原 mRNA 电泳条带.

表 1 各组动物血清 LN、PIIIP 及 HA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	Ln($\mu\text{g/L}$)	PIIIP(ng/L)	HA(ng/L)
I 组	8	85.7 \pm 12.1 ^a	35.9 \pm 3.5 ^a	121.8 \pm 9.5 ^a
II 组	9	78.2 \pm 7.9	33.7 \pm 2.6	110.3 \pm 13.4
III 组	8	52.3 \pm 6.7 ^b	29.9 \pm 3.2 ^b	69.2 \pm 11.1 ^b
IV 组	9	61.3 \pm 8.4 ^b	32.3 \pm 3.3	78.5 \pm 8.6 ^b
V 组	8	69.3 \pm 7.5	31.0 \pm 3.3 ^b	94.7 \pm 18.4 ^b
VI 组	8	46.2 \pm 7.3 ^{bc}	23.5 \pm 2.9 ^{bc}	58.4 \pm 7.6 ^{bc}
VII 组	9	48.1 \pm 3.4 ^b	30.8 \pm 3.4 ^b	65.8 \pm 7.2 ^b
VIII 组	8	71.7 \pm 6.5	30.4 \pm 3.4 ^b	89.1 \pm 16.8 ^b
IX 组	9	37.1 \pm 6.3	15.6 \pm 2.8	33.1 \pm 3.7

^aP < 0.001 vs IX 组比较, ^bP < 0.05 or 0.01 vs I 组比较, ^cP < 0.05 vs III 组比较.

表 2 各组动物肝组织纤维化病理分级比较

	<i>n</i>	病理分级				
		0	1	2	3	4
I 组 a	8	0	0	1	3	4
II 组	9	0	1	2	3	3
III 组 b	8	1	2	3	1	1
IV 组 b	9	1	3	2	2	1
V 组 b	8	0	3	3	1	1
VI 组 b	8	1	4	2	1	0
VII 组 b	9	1	2	3	2	1
VIII 组 b	8	0	2	3	2	1
IX 组	9	8	0	0	0	0

^aP < 0.001 vs IX 组比较, ^bP < 0.05 or 0.01 vs I 组比较.

表 3 各组动物肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	I 型前胶原	III 型前胶原
I 组	8	0.53 \pm 0.07 ^a	0.47 \pm 0.05 ^a
II 组	9	0.51 \pm 0.07	0.48 \pm 0.09
III 组	8	0.33 \pm 0.06 ^b	0.29 \pm 0.04 ^b
IV 组	9	0.39 \pm 0.04 ^b	0.37 \pm 0.3 ^b
V 组	8	0.35 \pm 0.07 ^b	0.31 \pm 0.07 ^b
VI 组	8	0.26 \pm 0.09 ^b	0.21 \pm 0.07 ^b
VII 组	9	0.31 \pm 0.09 ^b	0.28 \pm 0.08 ^b
VIII 组	8	0.36 \pm 0.08 ^b	0.32 \pm 0.05 ^b
IX 组	9	0.11 \pm 0.03	0.09 \pm 0.05

^aP < 0.001 vs IX 组比较, ^bP < 0.05 or 0.01 vs I 组比较.

3 讨论

肝脏 ECM 由胶原、糖蛋白及蛋白聚糖成分组成, 主要包括 HA、LN 和 I、III、IV 型胶原等. 生理状况下, 肝组织 ECM 含量相对较少, 具有维持组织正常生理结构和内环境稳定的作用^[6,7]. 肝纤维化时, HSC 分泌 I 型、III 型及 IV 型胶原、HA、LN 及纤维连接素等增加; 同时由于窦周毛细血管化、内皮细胞功能障碍等因素使得 ECM 降解减少, 血循环中 HA、LN 及 PIIIP 含量升高. I 型及 III 型胶原、HA 及 LN 合成增多、降解相对减少而沉积于细胞间隙^[8-10]. 组织病理学检查可见肝细胞变性坏死的同时小叶间、汇管区扩大, 汇管区胶原纤维沉积, 纤维结缔组织增生明显并自汇管区呈放射状扩展、向小叶周围延伸; 部分中央静脉区纤维结缔组织沉积增多; 典型的假小叶形成时即可诊断为肝硬化. 本研究表明模型组动物肝组织病理改变与上述文献^[11,12]报道一致. 我们发现单独应用 10 mg/kg 体重、20 mg/kg 体重 Tet 或 50 mg/kg 体重 Glz, 或不同剂量 Tet 与 Glz 联合应用均能不同程度地降低纤维化大鼠血清 HA、LN 及 PIIIP 水平, 以 10 mg/kg、20 mg/kg 体重 Tet 联合 Glz 治疗组效果最为显著. 给予 10 mg/kg 体重、20 mg/kg 体重 Tet 可显著降低实验性肝纤维化大鼠肝组织汇管区及中央静脉区结缔组织沉积, 与有关资料报道^[13]相似. 给予 50 mg/kg 体重 Glz 可显著减轻肝纤维化程度. 我们还发现各剂量 Tet 联合 Glz 应用可显著减少 ECM 的沉积, 肝纤维化组织病理学积分较各单独用组显著降低, 以 10 mg/kg 体重 Tet 联合 Glz 组效果最为显著. 表明 Tet 与 Glz 在抑制 HSC 激活、增生转化及 ECM 合成, 促进 ECM 降解等方面有协同效应.

从基因转录水平检测肝组织或 HSC I 型和 III 型前胶原表达调控是研究肝纤维化发生机制、探讨抗肝纤维化药物作用机制的重要手段. 研究资料^[14]表明连续给予皮下注射 CCl₄ 或胆管结扎诱导大鼠肝纤维化, 肝组织 I 型及 III 型胶原 mRNA 表达水平上调 5-10 倍. 本实验结果显示正常组动物肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达很弱, 而模型组肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达显

著增强; 10 mg/kg 体重和 20 mg/kg 体重 Tet 及 50 mg/kg 体重 Glz 能够显著抑制 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达, 表明二种药物可在转录水平抑制胶原蛋白合成, 联合应用 Tet 与 Glz 能够更加显著地抑制肝纤维化大鼠肝组织 I 型和 III 型前胶原 mRNA 的表达, 10 mg/kg 体重 Tet 与 Glz 联合组效果最为显著, 与病理组织学结果相吻合. 其诱导 I 型和 III 型前胶原 mRNA 表达下调的机制为 (1) Tet 和 Glz 分别能够抑制 HSC 增生, HSC 细胞总数目及转化为肌成纤维样母细胞数目减少^[15,16], 故组织 mRNA 含量下降; (2) Tet 和 Glz 还能通过抑制脂质过氧化反应、廓清自由基, 减少 TGF β_1 、PDGF、TNF α 等细胞因子及其受体表达, 阻断 Ca²⁺、PKC 及 IP-3K、MAPK、JNKs 等细胞内信号传导通路, 下调 NF κ B 结合活性^[17-19], 从而在转录水平或转录上游水平减少 I 型和 III 型前胶原 mRNA 生成.

本研究结果提示联合应用 Tet 和 Glz 单独应用均能有效抑制 ECM 表达与沉积, 两种药物联合应用疗效显著优于单独应用 Tet 及 Glz. 这种协同效应可能与 Glz 保护肝细胞、降低 Tet 的细胞毒等作用有关. 联合用药可为防治肝纤维化提供新的途径

4 参考文献

- 1 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenter Hepatol J* 1999;14:618-633
- 2 Liu HL, Li XH, Wang DY, Yang SP. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in fibrotic rat liver. *World J Gastroenterol* 2000;6:881-884
- 3 王志荣, 李定国, 陆汉民. 粉防己碱药理作用研究进展. *中国药理学通报* 2000;16:488-492
- 4 van Rossum TG, Vulto AG, de Man RA, Brouwer JT, Schalm SW. Review article: glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther J* 1998;12:199-205
- 5 Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:115-119
- 6 王泰龄, 王宝恩, 刘霞, 贾继东, 赵静波, 李新民, 张晶, 李宁章. 慢性病毒性肝炎纤维化分期与血清学指标的关系. *中华病理学杂志* 1998;27:185-190
- 7 Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- 8 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
- 9 Ma L, Zhao LS, Li CH, Lu Q, Li RK, Deng SS. A study on the dynamic alterations of serum HA in rats with carbon tetrachloride induced liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):60
- 10 Wang YD, Jia LW, Li CM. Hepatic content of collagens and laminin in rat model of experimental liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):73
- 11 McCrudden R, Iredale JP. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol J* 2000;15:1159-1168
- 12 Jung SA, Chung YH, Park NH, Lee SS, Kim JA, Yang SH, Song IH, Lee YS, Suh DJ, Moon IH. Experimental model of hepatic fibrosis following repeated periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:969-975
- 13 李定国, 夏维新, 陆汉明. 检测血清 III 型胶原肽在钙离子阻滞剂治疗肝纤维化中的意义. *中华内科杂志* 1990;29:453-456
- 14 Bueno MR, Daneri A, Armendariz-Borunda J. Cholestasis-induced fibrosis is reduced by interferon alpha-2a and is associated with elevated liver metalloprotease activity. *J Hepatol* 2000;33:915-925
- 15 田子彬, 刘思良, 李定国, 陆汉明. 汉防己甲素对血小板衍生生长因子促细胞增生效应的阻断作用. *中华医学杂志* 1997;77:50-53
- 16 Matsushima Y, Baba T. An antigranulomatous effect of glycyrrhizin. *J Exp Pathol* 1992;6:25-30
- 17 Ho LJ, Chang DM, Lee TC, Chang ML, Lai JH. Plant alkaloid tetrandrine downregulates protein kinase C-dependent signaling pathway in T cells. *Eur J Pharmacol* 1999;367:389-398
- 18 O' Brian CA, Ward NE, Vogel VG. Inhibition of protein kinase C by the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate antagonist glycyrrhetic acid. *Cancer Lett* 1990;49:9-12
- 19 Chen F, Lu Y, Demers LM, Rojanasakul Y, Shi X, Vallyathan V, Castranova V. Role of hydroxyl radical in silica-induced NF-kappa B activation in macrophages. *Ann Clin Lab Sci* 1998;8:1-13

复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢

曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐 辉

曾维政, 蒋明德, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉, 成都军区总医院消化内科
四川省成都市 610083
吴晓玲, 重庆医科大学附属一院消化内科 重庆市 400016
邓桂英, 成都市第六人民医院内镜室 四川省成都市 610051
曾维政, 男, 1961-12-20 生, 湖南邵阳人, 汉族, 1990 年重庆医科大学硕士研究生毕业, 教授。主要从事肝病的基础与临床研究。
成都军区“十五”医药科研基金课题, No.01A009
项目负责人: 曾维政, 610083, 四川省成都市天回镇, 成都军区总医院消化内科。
zengweizheng@163.com
电话: 028-83577558
收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2002-10-22

Protective effects of Rhodiola sachalinesis A Bor on CCl₄-induced liver fibrosis in rats

Wei-Zheng Zeng, Xiao-Ling Wu, Ming-De Jiang, Gui-Ying Deng,
Xiao-Bin Chen, Yong Zhang, Jian-Ping Qin, Hui Xu

Wei-Zheng Zeng, Ming-De Jiang, Xiao -Bin Chen, Yong Zhang,
Jian-Ping Qin, Hui Xu, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu
610083, Sichuan Province, China
Xiao-Ling Wu, Chongqing University of Medical Science, Chongqing
400016 China
Gui-Ying Deng, The Sixth Hospital of Chengdu, Chengdu 610051, Sichuan
Province, China
Supported by Medical Scientific Foundation of Chengdu Command, No.01A009
Correspondence to: Prof. Wei-Zheng Zeng, General Hospital of Chengdu
Command, Chengdu 610083, Sichuan Province China. zengweizheng@163.com
Received: 2002-10-08 Accepted: 2002-10-22

Abstract

AIM: To study the protective effects of Rhodiola sachalinesis A Bor on CCl₄-induced liver fibrosis.

METHODS: Male SD rats were divided into 3 groups: normal (N), Rhodiola sachalinesis A Bor (R) and model (M) group. The M and R group were given 300 ml/L CCl₄ (3ml/kg, 2 times/week) for 15 weeks and Rhodiola sachalinesis A Bor (0.5g/kg, p.o., daily for 15 weeks) was administered to rats of R group. Histopathological changes were examined. The changes of hepatic content of hydroxyproline and expression of $\alpha 1(I)$ mRNA were observed.

RESULTS: Rhodiola sachalinesis A Bor decreased the hepatic content of hydroxyproline ($657 \pm 74 \mu\text{g/g}$ vs $1257 \pm 98 \mu\text{g/g}$, $P < 0.05$) and severity of hepatic fibrosis, improved the liver histopathological changes and inhibited the expression of $\alpha 1(I)$ mRNA and decreased the level of HA, C IV, PC III and TGF $\beta 1$ ($164 \pm 46 \mu\text{g/L}$, $97 \pm 15 \mu\text{g/L}$, $289 \pm 76 \mu\text{g/L}$, $60 \pm 20 \text{mg/L}$ vs $265 \pm 98 \mu\text{g/L}$, $160 \pm 30 \mu\text{g/L}$, $456 \pm 113 \mu\text{g/L}$, $89 \pm 23 \text{mg/L}$. $P < 0.05$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Rhodiola sachalinesis A Bor is effective in protecting against CCl₄-induced liver fibrosis in rats, its mechanisms appear to be associated with the inhibition

of collagen production and protection of hepatic cells.

Zeng WZ, Wu XL, Jiang MD, Deng GY, Chen XB, Zhang Y, Qin JP, Xu H. Protective effects of Rhodiola sachalinesis A Bor on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):975-978

摘要

目的: 探讨复方红景天对四氯化碳(CCl₄)诱导的肝纤维化大鼠模型胶原代谢的干预作用。

方法: 用 CCl₄ 皮下注射法诱导 SD 大鼠肝纤维化模型, 同时给予复方红景天口服, 观察肝组织病理变化、羟脯氨酸(Hyp)含量、I 型前胶原($\alpha 1(I)$)mRNA 表达, 及血清 HA、C IV、PC III、TGF $\beta 1$ 变化情况。

结果: 口服复方红景天可改善肝组织病理变化, 减少 Hyp 含量($657 \pm 74 \mu\text{g/g}$ vs $1257 \pm 98 \mu\text{g/g}$, $P < 0.05$)及 I 型前胶原 $\alpha 1(I)$ mRNA 表达(85.7% vs 96.7% , $P < 0.05$), 降低血清 HA、C IV、PC III、TGF $\beta 1$ 的水平($164 \pm 46 \mu\text{g/L}$, $97 \pm 15 \mu\text{g/L}$, $289 \pm 76 \mu\text{g/L}$, $60 \pm 20 \text{mg/L}$ vs $265 \pm 98 \mu\text{g/L}$, $160 \pm 30 \mu\text{g/L}$, $456 \pm 113 \mu\text{g/L}$, $89 \pm 23 \text{mg/L}$. $P < 0.05$, $P < 0.01$).

结论: 复方红景天可有效保护 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化, 其作用机制可能与抑制肝脏胶原纤维合成、保护肝细胞等有关。

曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉. 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):975-978

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/975.asp>

0 引言

肝纤维化是许多肝脏疾病的中间发展环节^[1-5], 最终会发展为肝硬化^[6-8], 因而治疗肝纤维化具有极为重要的临床意义. 寻找有效治疗药物是目前肝病领域研究的热点^[9-15]. 红景天具有抗肾、肺间质纤维化, 保护心、肝细胞功能等多种作用, 苦参碱抗肝纤维化及抗病毒作用已有许多报道^[10-18], 但疗效却有限. 本实验研究旨在观察复方红景天对 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化模型胶原代谢的影响, 从组织、血清及分子水平探讨复方红景天干预肝纤维化的疗效及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 体重 $150 \pm 10 \text{g}$ 健康 SD 大鼠 90 只(购自华西医科大学实验动物中心), 随机分为 3 组: 正常对照组

10只, 红景天干预组40只, 模型对照组40只, 各组间暴露因素无差别($P > 0.05$). CCl_4 (成都联合化工试剂研究所), 复方红景天颗粒(自制红景天苦参水提物: 生药红景天6g、苦参3g制成复方红景天颗粒0.5g), 羟脯氨酸标准品(中国科学院生物物理研究所), RT-PCR引物(上海生工公司).

1.2 方法 用 CCl_4 皮下注射法制备大鼠肝纤维化模型, 即用300 ml/L CCl_4 石蜡溶液, 以3 ml/kg做皮下注射, 2次/wk, 共15wk. 红景天组在造模的同时给予复方红景天颗粒水溶液0.5 g/kg每日灌胃, CCl_4 模型组造模同时予生理盐水灌胃, 正常组予等量石蜡油皮下注射和生理盐水灌胃处理. 各组动物在最后一次 CCl_4 注射后48 h处死, 取肝组织和血清标本待检. 肝纤维化指标HA, C IV, PC III采用RIA法; 血清TGF β 1水平采用ELISA法. 肝组织标本HE染色和VG胶原染色、Masson三重染色作组织病理学检查, 按如下标准进行肝组织肝纤维化评分: 0, 正常; +1, 胶原纤维向中央静脉周

围延伸; +2, 胶原纤维轻微增生、延伸, 未形成纤维间隔; +3, 胶原纤维增生, 形成假小叶; +4, 纤维间隔增厚, 大量假小叶形成. Jamall法测定肝组织Hyp含量, 即取湿肝组织经盐酸水解、氯胺T溶液、欧氏溶液反应, 558 nm测定A值, 计算标准曲线回归方程和样品含量, 以肝组织匀浆液总蛋白含量校正, 以 $\mu\text{g/g}$ 表示肝组织Hyp含量. 肝组织切片原位RT-PCR法检测 $\alpha 1(I)$ mRNA表达情况, 参考文献[19]进行, 上游引物(5' \rightarrow 3')CAC CCT CAA CAG CCT GAG TC, 下游引物(3' \rightarrow 5')GTT CGG GCT GAT GTA CCA GT, 以生物素标记, BCIP和NBT显色, 显微镜下观察结果, 根据胞质显色颗粒多少分为4级: (-)蓝色颗粒; (+)少量颗粒; (++)中等颗粒; (+++)大量颗粒.

统计学处理 数据以均值 \pm 标准差表示, t检验.

2 结果

2.1 肝组织病理学改变(图1-4) HE染色光镜下可见模

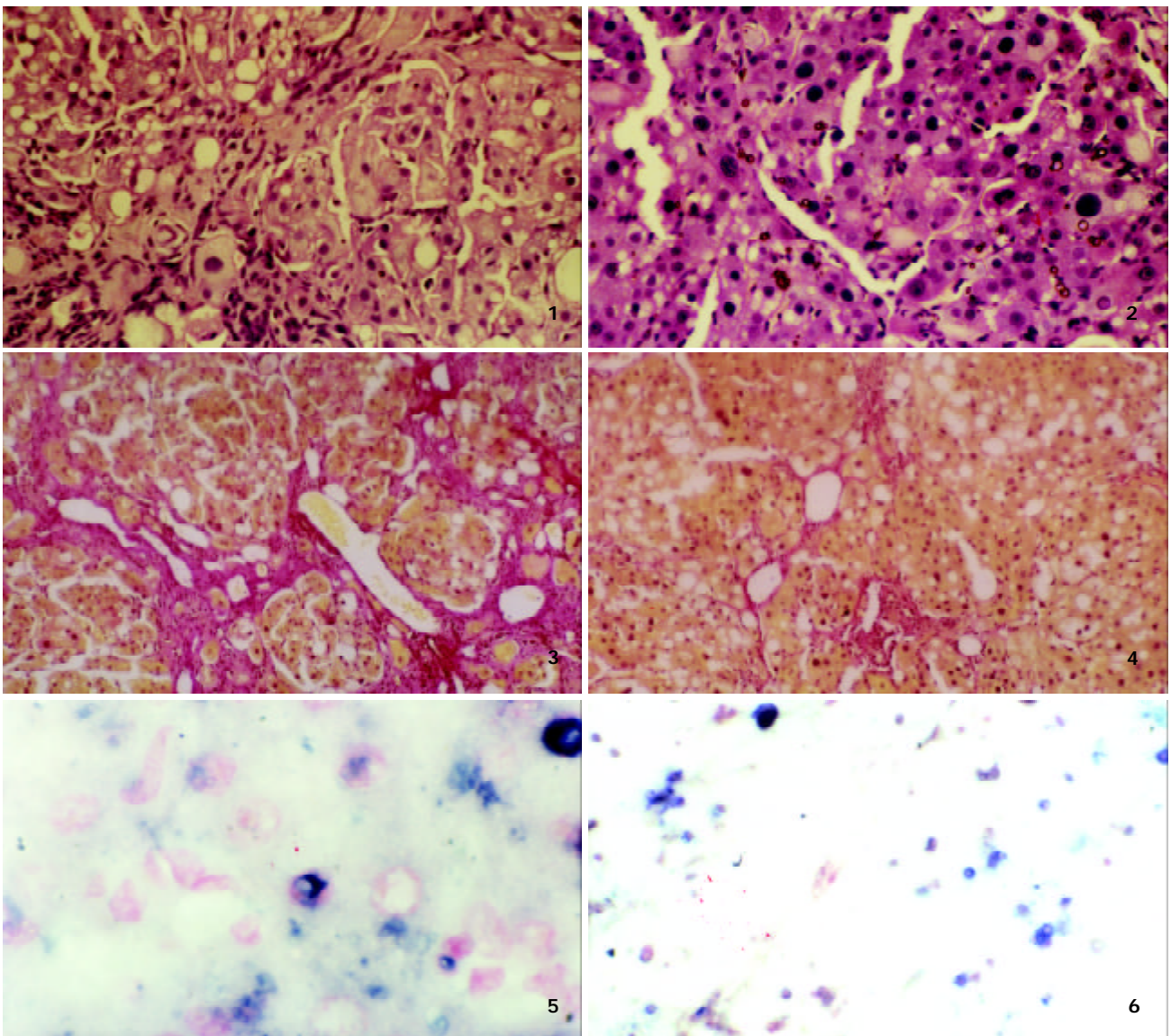


图1 模型组大鼠肝组织HE染色(10 \times 25). 图2 复方红景天组大鼠肝组织HE染色(10 \times 25).
图3 模型组大鼠肝组织VG染色(10 \times 25). 图4 复方红景天组大鼠肝组织VG染色(10 \times 25).
图5 模型组大鼠肝组织内前胶原 $\alpha 1(I)$ mRNA表达(10 \times 40). 图6 复方红景天组大鼠肝组织内前胶原 $\alpha 1(I)$ mRNA表达(10 \times 40).

型组大鼠肝细胞广泛脂肪变性、坏死, 有炎性细胞浸润, 以汇管区及中央静脉周围为重, 肝小叶结构破坏, VG 胶原染色及 Masson 胶原染色见胶原纤维明显增生, 汇管区 - 中央静脉区纤维间隔宽大, 包绕分隔肝小叶, 形成大量大小不等的假小叶, 假小叶形成率为 90%。红景天干预治疗组大鼠可见肝细胞变性、坏死较轻, 汇管区及小叶间有少量纤维组织增生, 部分向小叶内伸展, 形成纤细的纤维间隔, 仅小部分完全包裹假小叶, 假小叶形成率为 42.8%, 二者差别非常显著 ($P < 0.01$), 经进行肝纤维化积分分析, CCl_4 模型组大鼠纤维化积分明显增加 (3.5 ± 0.7), 而复方红景天干预性治疗可减低模型大鼠肝纤维化积分 (2.4 ± 0.7 , $P < 0.05$)。

2.2 肝组织 Hyp 含量 Hyp 是胶原纤维特有的氨基酸, 其含量能够代表肝脏胶原纤维的量。经 Jamall 法检测, CCl_4 模型组大鼠 Hyp 含量 ($1\ 257 \pm 98 \mu\text{g/g}$) 显著增高, 而复方红景天干预治疗可明显减少肝组织 Hyp 含量 ($657 \pm 74 \mu\text{g/g}$, 与模型组比较 $P < 0.05$), 正常对照组仅为 $223 \pm 37 \mu\text{g/g}$, 说明复方红景天能抑制肝脏胶原纤维的合成与沉积。

2.3 肝组织前胶原 $\alpha 1(I)$ mRNA 表达 多数 CCl_4 模型组大鼠肝组织标本星状细胞内呈现蓝色颗粒, 阳性率达 96.7%, 且多为 ++ ~ +++, 复方红景天组阳性率为 85.7%, 多为 + ~ ++ (图 5, 6), 正常对照仅为 20%, 显示 CCl_4 皮下注射造模能使大鼠前胶原 $\alpha 1(I)$ mRNA 表达明显增加, 用复方红景天预防可使前胶原 $\alpha 1(I)$ mRNA 表达明显减少 ($P < 0.05$)。

2.4 血清 HA, C IV, PC III, TGF β 1 CCl_4 模型组大鼠血清 PC III, C IV, HA, TGF β 1 水平与正常对照组、复方红景天干预组比较差异有极显著性意义 ($P < 0.01$), 皮下注射 CCl_4 使大鼠血清 PC III, C IV, HA 水平显著升高, 并与肝纤维化积分呈正相关 (r 分别为 +0.78, +0.65, +0.59, +0.63), 口服复方红景天可明显降低其血清水平 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 大鼠血清肝纤维化指标比较

分组	n	PC III ($\mu\text{g/L}$)	C IV ($\mu\text{g/L}$)	HA ($\mu\text{g/L}$)	TGF β 1 (mg/L)
正常组	10	90 \pm 11 ^b	36 \pm 10 ^b	112 \pm 46 ^b	44 \pm 16 ^b
CCl_4 组	30	265 \pm 98	160 \pm 30	456 \pm 113	89 \pm 23
红景天组	35	164 \pm 46 ^a	97 \pm 15 ^a	289 \pm 76 ^a	60 \pm 20 ^a

^b $P < 0.01$, ^a $P < 0.05$, vs CCl_4 组。

3 讨论

目前肝纤维化的治疗研究非常活跃, 很多方面取得令人瞩目的成绩^[20-25], 但已有报道的药物无一被正式批准用于临床抗肝纤维化。近年来中医药防治慢性肝病显示了光明的前景, 部分中药具有较好的抗纤维化效果^[26-35]。红景天的主要成分为红景天甙、酪醇以及多种氨基酸, 在抗缺氧、抗疲劳、抗肾间质纤维化、抗缺血等方面广

泛应用; 但用于肝纤维化动物整体防治未见报道。体外研究发现, 红景天能够保护肝细胞、抑制成纤维细胞增生。我们在前期的实验中观察到红景天甙对体外培养的 HSC 增生、活化具有抑制作用, 并能降低胶原纤维合成等作用^[36], 苦参 (*sophora flavescens ait*) 是一味有效的抗肝纤维化药物, 其主要成分为苦参碱、氧化苦参碱、 β - 谷甾醇、芥子酸十六酯等。氧化苦参碱对体外培养的大鼠 HSC 增生及胶原合成有明显抑制作用, 能减轻肝炎症、保护肝功能, 抑制肝内胶原合成; 且具有活血化瘀、抗乙肝病毒、调节免疫、抑制肝细胞凋亡、保护肝细胞等功效, 大量动物实验均证实其具有一定的抗肝纤维化作用。我们选用红景天为主药, 辅以苦参的复方红景天颗粒 (水提物) 对 CCl_4 诱导的 SD 大鼠肝纤维化模型进行干预性治疗, 从组织、血清及分子水平的探讨其对肝组织胶原代谢的影响。结果显示, 15 wk 的 CCl_4 注射能较好制备 SD 大鼠肝纤维化模型, 组织病理学改变与人类酒精性肝硬化类似。肝组织切片 HE 染色发现, 所有模型大鼠肝细胞变性坏死明显, 汇管区胶原纤维明显增多, 并有大量炎性细胞浸润, 假小叶形成率达 90%, 肝纤维化积分为 3.5 ± 0.7 , 二者明显高于红景天组的 42.8% 和 2.4 ± 0.7 ($P < 0.05$), 提示复方红景天具有良好改善肝组织病理学指标及抑制胶原合成或增加胶原降解的作用, 血清学检测提示复方红景天能明显降低血清肝纤维化指标 PC III、C IV、HA、TGF β 1 的水平, 与模型组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$)。肝组织内 Hyp 检测结果显示模型组含量 ($1\ 257 \pm 98 \mu\text{g/g}$) 最高, 红景天组次之 ($657 \pm 74 \mu\text{g/g}$), 正常对照组最低, 三组间有明显差异 ($P < 0.05$), 亦直接提示复方红景天具有明确抗肝纤维化作用。分子病理学方法原位 RT-PCR 检测前胶原 $\alpha 1(I)$ mRNA 表达情况表明, 红景天干预组前胶原 $\alpha 1(I)$ mRNA 阳性率达 87.5%, 且多为 + ~ ++, 而模型组为 96.7%, 阳性强度多为 ++ ~ +++, 提示复方红景天抗纤维化作用可能与抑制肝组织前胶原基因表达有关。

尽管对红景天在慢性肝病中的治疗作用定论尚早, 但其抗肝纤维化作用已经组织病理学分子病理学及组织 Hyp 含量分析及血清肝纤维化标志物等方面得到一定论证, 其分子机制可能与保护肝细胞、抑制炎症及直接抑制胶原合成及增加胶原分解等有关, 其临床应用开发价值不容低估, 值得深入细致的研究。

4 参考文献

- 1 金博. 细胞外基质与肝脏疾病. 世界华人消化杂志 2002;10:53-64
- 2 周馨, 李宣海, 李定国. 库普弗细胞与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2002;10:65-68
- 3 何云, 王建宾, 王宇明. 慢性肝炎肝纤维化程度诊断方法的进展. 世界华人消化杂志 2001;9:1305-1309
- 4 Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steintraesser L, Alarcont WH, Remick DG, Wang SC. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology* 2000;31:932-936
- 5 Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N,

- Kane da K. *In vitro* migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999;29:1760-1767
- 6 陈文慧,刘平,徐光福,陆雄,熊卫国,李风华,刘成海. 脂质过氧化在二甲亚硝胺大鼠肝纤维化形成过程中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:645-648
- 7 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
- 8 Huang ZG, Zhai WR, Zhang YE, Zhang XR. Study of heteroserum-induced rat liver fibrosis model and its mechanism. *World J Gastroenterol* 1998;4:206-209
- 9 张盈涛,袁新明,李欣,李恒力. 螺内酯对肝纤维化大鼠 I/III 型胶原蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:1120-1124
- 10 Wang JY, Guo JS, Yang CQ. Expression of exogenous rat collagenase *in vitro* and in a rat model of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:901-907
- 11 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
- 12 Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:739-745
- 13 Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002;8:679-685
- 14 Liu CH, Hu YY, Wang XL, Liu P, Xu LM. Effects of salvianolic acid-A on NIH/3T3 fibroblast proliferation, collagen synthesis and gene expression. *World J Gastroenterol* 2000;6:361-364
- 15 Ding SP, Li JC, Xu J, Mao LG. Study on the mechanism of regulation on the peritoneal lymphatic stomata with Chinese herbal medicine. *World J Gastroenterol* 2002;8:188-192
- 16 伍严安,高春芳,王皓,黄超,孔宪涛. 苦参碱抑制血小板衍生生长因子诱导的小鼠皮肤成纤维细胞增生. *第二军医大学学报* 2000;21:724-726
- 17 甘乐文,王国俊,李玉莉. 氧化苦参碱对大鼠肝纤维化的影响. *第二军医大学学报* 1999;20:445-448
- 18 李继强,李超群,曾民德,余祥奎,李国钦,范建高,华静,邱德凯,萧树东. 氧化苦参碱治疗慢性丙型肝炎的初步研究. *中国中西医结合杂志* 1998;18:227-229
- 19 曾维政,蒋明德,栲桂珍,张建华,陈泰庆,楚人俊,邓桂英,张家碧. 原位聚合酶链技术检测肝细胞癌组织内丙型肝炎病毒核酸及其意义. *中华内科杂志* 1994;33:747-751
- 20 伍严安,高春芳,万伟东,王皓,孔宪涛. 全反式视黄酸对人 $\alpha 1(I)$ 前胶原启动子活性的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:47-49
- 21 王宇,高毅,俞金龙,黄宇琦,蒋晓青. IFN- α 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* 2001;9:20-23
- 22 崔云华,王晓玲,刘晴,刘平. 丹参酮的抗氧化作用对大鼠肝星状细胞增生的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:317-319
- 23 王福生,吴祖泽. 肝纤维化和肝硬变基因治疗的研究现状. *世界华人消化杂志* 2000;8:371-373
- 24 张晶,宗春华,李定国,周仁建,杜学亮,周馨,徐芹芳,陆汉明. 肝内肾素-血管紧张素-醛固酮系统与大鼠肝纤维化的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:397-400
- 25 向德栋,魏永利,李奇芬. 转化生长因子 $\beta 1$ 对 Ito 细胞作用的分子机制. *世界华人消化杂志* 1999;7:980-981
- 26 姚希贤,唐有为,姚冬梅,修贺明. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠 I, III 型胶原蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:263-267
- 27 杨晴,颜迎春,高彦欣. 去纤软肝胶囊抗肝纤维化的实验与临床研究. *世界华人消化杂志* 2001;9:1246-1249
- 28 刘玉侃,沈薇. 虫草菌丝对大鼠实验性肝纤维化肝细胞增生的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:388-391
- 29 杜荔菁,唐望先,但自力,张文英,李绍白. 中药肝炎平防治肝纤维化的实验研究. *华人消化杂志* 1998;6:21-22
- 30 蔡大勇,陈家春,赵刚,叶根梅,邴飞虹,陈金星. 紫金胶囊防治大鼠 D-氨基半乳糖性肝损伤. *华人消化杂志* 1998;6:23-26
- 31 王晓玲,刘平,刘成海,刘成. 拆方扶正化瘀方对肝细胞及肝星状细胞功能的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:663-665
- 32 赵东强,张晓岚,姜慧卿. TNF- α 与肝星状细胞. *世界华人消化杂志* 2001;9:947-948
- 33 沈敏,邱德凯,陈颖,熊伍军. 重组肝细胞再生增强因子丹参及苦参对大鼠纤维细胞的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:1129-1133
- 34 李宝刚,李继尧,梁惠云,朱文玉. 牛磺酸对实验性大鼠肝纤维化的预防作用. *北京医科大学学报* 1998;30:335-336
- 35 陈岳祥,李石,张兴荣,张忠夏,孔宪涛. 牛磺酸对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的抑制. *中华消化杂志* 1999;19:185-187
- 36 蒋明德,甘新宇,解方为,曾维政,吴晓玲. 红景天苷对乙酰刺激的大鼠肝星状细胞增生及胶原基因表达的影响. *药理学学报* 2002;37:841-844

选择性环氧合酶 - 2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE₂ 和血管内皮因子表达的影响

谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜 勤, 蔡建庭, 钱可大

谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 浙江大学医学院第二附属医院消化内科
浙江省杭州市 310009
杜勤, 蔡建庭, 钱可大, 上海交通大学第一附属医院消化内科 上海市 200080
谢传高, 男, 1972-08-24 生, 山东省邹城人, 汉族, 1998 年泰山医学院本科毕业, 2002 年上海医科大学硕士研究生毕业, 医师, 主要从事胰腺疾病的研究。
上海市科技发展基金重点资助项目, No.994119016
项目负责人: 王兴鹏, 200080, 上海市武进路 85 号, 上海交通大学第一附属医院消化内科. xpwcn@public7.sta.net.cn
电话: 021-63240090 传真: 021-63240825
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-10-30

Effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor Celebrex on the expressions of PGE₂ and VEGF in pancreatic carcinoma

Chuan-Gao Xie, Xing-Peng Wang, Yu-Wei Dong, Qin Du, Jian-Ting Cai, Ke-Da Qian

Chuan-Gao Xie, Xing-Peng Wang, Yu-Wei Dong, Department of Gastroenterology of the First Affiliated Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, Shanghai China
Qin Du, Jian-Ting Cai, Ke-Da Qian, Department of Gastroenterology of the Second Affiliated Hospital Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China
Supported by the Bureau Youth Foundation of Shanghai, No.994119016
Correspondence to: Dr Xing-Peng Wang, Department of Gastroenterology of the First Affiliated Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, Shanghai China. xpwcn@public7.sta.net.cn
Received: 2002-10-07 Accepted: 2002-10-30

Abstract

AIM: To investigate the effects of Celebrex, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on tumor growth and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and PGE₂ in pancreatic carcinoma of xenografted nude mice induced by pancreatic carcinoma PC-3 cell lines.

METHODS: The effects of Celebrex on tumor growth, and the expression of VEGF and PGE₂ were assayed by using enzyme-linked immuno-adsorbent assay (ELISA) and radioimmunoassay (RIA), respectively.

RESULTS: Compared to control mice, the growth curve of treated mice was much lower and flatter. Average tumor volume from control mice was 0.438 cm³ as compared with 0.212 cm³ from treated mice (51.6% inhibition, $P < 0.05$). The expression of PGE₂ in control mice (66±12 ng/g) was significantly higher than that in treated mice (29±5 ng/g) ($P < 0.01$). VEGF expression was significantly down regulated in the Celebrex-treated tumors. ELISA revealed the expression of VEGF was 1.11±0.11 μg/g in control mice, while 0.66±0.11 μg/g in treated mice ($P < 0.05$). The inhibitory rate of VEGF was 40.6%

CONCLUSION: COX-2 may play an important role in the angiogenesis of pancreatic carcinoma, PGE₂ is likely to act

as an important intermediate part between COX-2 and tumor generation. The selective COX-2 inhibitor, Celebrex, can inhibit angiogenesis and tumor growth.

Xie CG, Wang XP, Dong YW, Du Q, Cai JT, Qian KD. Effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor Celebrex on the expressions of PGE₂ and VEGF in pancreatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):979-981

摘要

目的: 观察选择性环氧合酶 - 2(COX-2)抑制剂 Celebrex 对裸鼠胰腺癌 PC-3 细胞株移植瘤生长和肿瘤组织 VEGF 和 PGE₂ 表达的影响。

方法: 观测 Celebrex 对移植瘤生长的影响, 并采用放射免疫测定(RIA)和酶联免疫黏附测定(ELISA)检测裸鼠移植瘤组织中 PGE₂ 和 VEGF 的表达。

结果: 治疗组移植瘤生长曲线较对照组明显低平。对照组移植瘤近似体积为 0.438 cm³, 治疗组为 0.212 cm³(抑瘤率为 51.6%, $P < 0.05$)。PGE₂ 表达, 对照组为 66 ± 12 ng/g, 治疗组为 29 ± 5 ng/g, 两组间表达有非常显著性($P < 0.01$)。VEGF 表达, 对照组 1.11 ± 0.11 μg/g, 治疗组 0.66 ± 0.11 μg/g, VEGF 抑制率为 40.6%, 两组间有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: COX-2 可能参与了肿瘤新生血管的生成, 而 PGE₂ 可能在该过程中起着重要的介导作用, 选择性 COX-2 抑制剂 Celebrex 则具有抑制肿瘤生长和对抗肿瘤新生血管生成的作用。

谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大. 选择性环氧合酶 - 2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE₂ 和血管内皮因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):979-981

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/979.asp>

0 引言

环氧合酶 - 2(cyclooxygenase-2, COX-2)与肿瘤的关系密切^[1, 2]. COX-2 参与肿瘤形成的具体机制还不明确. 我们研究选择性 COX-2 抑制剂 Celebrex 对肿瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)和 PGE₂ 表达的影响, 探讨 COX-2 参与肿瘤生成的可能机制, 并为药物 Celebrex 的临床应用提供必要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 4-6 周龄 BALB/C-nu/nu 裸小鼠购自上海肿瘤

研究所; 胰腺癌 PC-3 细胞株由北京协和医院刘彤华教授建立并惠赠; RPMI1640 购自 Gibco 公司; 小牛血清购自华美公司; 2.5 g/L 胰蛋白酶为 Hyclon 公司产品; 选择性 COX-2 抑制剂 Celebrex 为美国希尔公司产品. 裸鼠移植瘤模型的 PC-3 细胞用含 50 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基, 另添加 Na₂CO₃ (20 mmol/L) 和抗生素 (100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素), 置 37 °C, 50 mL/L CO₂ 混合气体的孵箱中培养, 细胞换液时间为 1-2 d, 传代 3-5 d, 传代前用 2.5 g/L 胰酶消化.

1.2 方法 质量 18-22 g, 4-6 周龄 BALB/C-nu/nu 裸鼠 30 只, 均为 ♂, 实验前观察 1 wk, 若裸鼠生长正常 (死亡率不超过 10%), 于左后腿外侧皮内注射 PC-3 人胰腺癌细胞 1 × 10⁷, 1 wk 后, 待移植瘤肉眼可见时, 随机分为 2 组: 对照组和 Celebrex 处理组 (治疗组). 治疗组予以蒸馏水配制的 15 mg/L 浓度的 Celebrex 液饮用, 对照组则只给予正常蒸馏水. 定期观察小鼠精神、饮食及排便情况, 称质量, 估算肿瘤近似体积, 绘制生长曲线. 3 mo 后结束实验, 取下肿瘤组织, 计算抑瘤率: [1 - (治疗组开始平均体积 - 治疗组结束平均体积) ÷ (对照组开始平均体积 - 对照组结束平均体积)] × 100%, 部分组织甲醛溶液固定, 常规包埋切片, 部分组织置液氮冻存备用. 每个标本取 100 mg, 加入生理盐水 1 mL, 用研磨器将组织磨碎, 然后取其匀浆至 1.5 mL 的 Eppendorf 管, 编号. 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 将上清液分装于数个小的 Eppendorf 管中, 每小管 100 μL, -20 °C 冰箱储存. 用 ELISA 检测 VEGF 量, 并计算 VEGF 抑制率: (对照组 VEGF 值 - 处理组 VEGF 值) ÷ 对照组 VEGF 值 × 100%, 另部分标本采用 RIA 法检测肿瘤组织中 PGE₂ 量.

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用计量资料两样本均数比较的 T 检验, P < 0.05 为有统计学意义.

2 结果

2.1 Celebrex 对裸鼠移植瘤生长的影响 对照组肿瘤呈递增性生长, 而治疗组生长曲线则较为低平, 并且两组肿瘤在开始一段时间内, 生长比较迅速, 此后, 生长速度逐渐减慢 (图 1). 抑瘤率为 51.6%. 肿瘤组织取出后, 无论是体积 (0.438 vs 0.215 cm³, P < 0.05) 还是肿瘤质量 (0.552 vs 0.244 g, P < 0.05), 2 组间均存在显著性差异 (图 2).

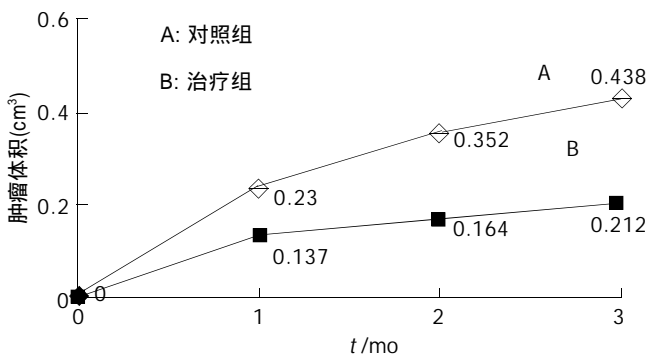


图 1 裸鼠移植瘤生长曲线图.

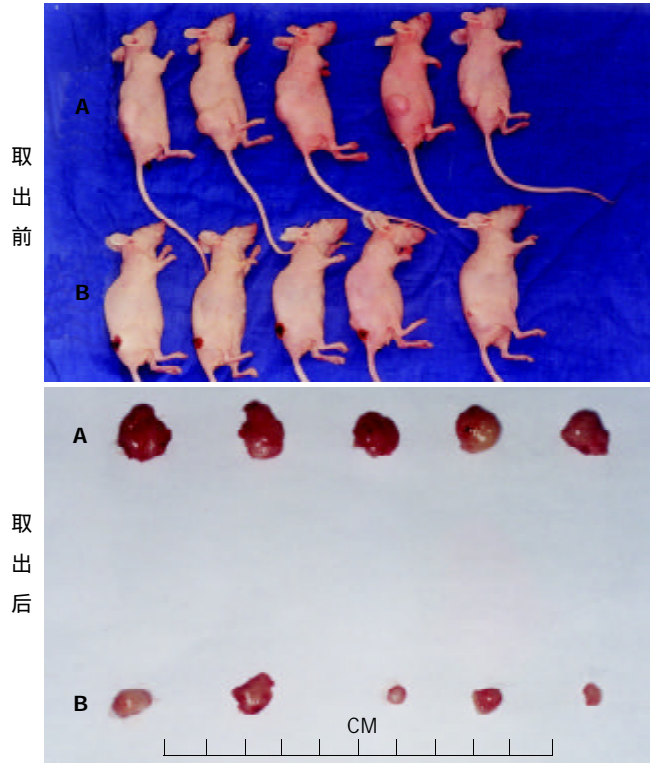


图 2 裸鼠移植瘤.

2.2 Celebrex 对移植瘤组织 VEGF 和 PGE₂ 表达的影响 对照组 VEGF 表达量为 1.11 ± 0.11 μg/g, 治疗组为 0.66 ± 0.11 μg/g, 两组间有显著性差异 (P < 0.05), VEGF 表达的抑制率为 40.6%. RIA 对裸鼠肿瘤组织上清液 PGE₂ 表达的检测结果显示, 治疗组中 PGE₂ 的表达较对照组明显降低, 二者之间存在显著性差异 (66 ± 12 vs 29 ± 5 ng/g, P < 0.01).

3 讨论

环氧合酶是花生四烯酸代谢过程中前列腺素合成的限速酶, 目前已经知道其至少存在两种亚型, COX-1 和 COX-2. COX-1 属结构型 (constitutive) 酶, 在多种组织中呈微量表达, 其催化产物只要参与维持细胞结构的完整性^[3]; COX-2 属诱导型 (inducible) 酶, 正常组织中很少表达, 在各种刺激因素如细胞因子, 炎性递质以及促癌剂等作用下, 其表达则迅速上调^[4,5]. 其上调可能与 MAPK, PKC 等激酶途径的激活有关^[6,7], 此外, 生成的前列腺素也可能反馈上调 COX-2 的表达^[8,9]. COX-2 抑制剂分为选择性和非选择性两种. 实验中我们所采用的 Celebrex 又名 Celecoxib, 就是一种特异性 COX-2 抑制剂. 研究表明, 高脂饮食尤其是 6-n 簇多不饱和脂肪酸的摄入增加可能与胰腺癌的发病率上升有关^[10,11]. 晚近, 对脂质代谢紊乱与肿瘤的相关性研究则揭示有 COX-2 途径导致的脂质代谢紊乱可能是促进消化系统肿瘤发生和发展的重要原因之一.

COX-2 与消化系统肿瘤的关系, 首先表现为 COX-2 在多种肿瘤中的过度表达^[12-14]. 其次, 表现为 COX-2 抑

制剂对肿瘤生长的抑制作用^[15,16]. 与其他肿瘤类似, 胰腺癌同样也存在着COX-2的过度表达情况^[17,18]. 我们应用 Celebrex 来干预胰腺癌移植瘤的生长, 结果发现, 应用 Celebrex 的裸鼠, 移植瘤生长曲线低平, 体积和质量较对照组均明显减少, 抑瘤率达到 51.6%, 证实了 Celebrex 对肿瘤生长的抑制作用. COX-2 参与肿瘤生成的具体机制还不清楚, 考虑可能与肿瘤细胞增生与凋亡的紊乱、肿瘤新生血管生成以及细胞间的黏附、浸润等多个环节有关. 实验中, 我们重点探讨了 COX-2 与肿瘤新生血管生成之间的关系. 目前已经知道, 血管生成的主要原因是血管生成促进因子和抑制因子表达平衡的失调, 其中尤以 VEGF 最为重要. 大量资料表明, COX-2 可能参与了肿瘤的新生血管生成. 为了证实这个问题, 我们首先通过 ELISA 检测了肿瘤组织间 VEGF 表达情况, 结果显示治疗组 VEGF 表达较对照组明显降低, 这与 Liu et al 的研究结果相类似. 这就提示我们, COX-2 有可能是通过诱导以 VEGF 为主的血管生成因子表达失衡来参与肿瘤新生血管生成的, 而选择性 COX-2 抑制剂 Celebrex 对肿瘤生长的抑制作用可能部分与其抑制 VEGF 等血管生成因子表达有关.

环氧合酶上调血管因子表达的途径可能是通过其下游的前列腺素来实现的. 目前引起人们注意的前列腺素主要有 PGE₁, PGE₂ 和 PPAR_γ. 实验表明, 单一的 PGE₂ 就可独自刺激血管的形成. 在 COX-2 高表达的胃癌患者中, PGE₂ 的表达较对照组明显增高. 在 PC-3ML 前列腺癌细胞株中, 加入外源性的 PGE₂ 后, 也可使受抑的 VEGF 表达重新上调, 且应用 COX-2 抑制剂抑制肿瘤 COX-2 表达后, PGE₂ 与 VEGF 的表达情况基本一致. 可见, COX-2 来源的 PGE₂ 的确可能在肿瘤新生血管的生成中发挥着重要的作用. 上调的 PGE₂ 可能通过 EP 受体/cAMP 途径来调节生长因子的表达的. 类似的实验中还发现了 PGE₁ 和 PPAR_γ 对 VEGF 的上调作用. 并认为其分别是通过特殊的 PGE 受体和 PPAR_γ (15 d-PGJ₂ 的核内受体) 来发挥上述作用的. 实验中, 我们通过 RIA 对移植瘤组织中 PGE₂ 表达情况进行了检测, 结果显示治疗组 PGE₂ 表达较对照组明显降低, 两组间具有显著性差异, 且肿瘤组织中 PGE₂ 变化趋势与 VEGF 变化趋势基本一致, 所有这些均提示我们, PGE₂ 可能在 COX-2 参与肿瘤新生血管生成中起着重要的介导作用.

由于胰腺癌的预后极差, 5 a 的存活率仅为 0.4%, 上述研究无疑为胰腺癌的预防和治疗提供了一条新的思路. 但值得注意的是, 肿瘤血管生成是一个多因素参与的复杂过程, 是由于肿瘤中基因的变化(包括癌基因的激活和/或抑癌基因的丢失), 导致了众多酶及受体表达的表化, 并进而引起血管生成促进因子和抑制因子间失衡的综合结果. 在脂质代谢紊乱方面, 应该是调节脂质代谢的各种酶及受体相互间表达失调, 导致各种前列腺素代谢平衡的打破, 某些前列腺素可能被上调, 而某些前列腺素则可能被下调, PGE₂ 可能是被下调的一种, 且

可能与血管生成关系较为密切. 尽管我们重视 VEGF 和 PGE₂ 在 COX-2 参与肿瘤新生血管生成中的作用, 但我们同样不应忽视其他血管生成因子和前列腺素在该过程的作用.

4 参考文献

- 1 Howe LR, Dannenberg AJ. A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer. *Semin Oncol* 2002;29(3 Suppl 11):111-119
- 2 Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclo-oxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet oncol* 2001;2:544-555
- 3 Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271:33157-33160
- 4 Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995;109:285-301
- 5 Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2692-2696
- 6 Mestre JR, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Tanabe T, Daly JM. Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells. *J Biol Chem* 2001;276:3977-3982
- 7 Lo CJ, Cryer HG, Fu M, Lo FR. Regulation of macrophage eicosanoid generation is dependent on nuclear factor kappa B. *J Trauma* 1998;45:19-23
- 8 Lau CK, Black WC, Belley M, Chan C, Charleson S, Denis D, Gauthier JY, Gordon R, Guay D, Hamel P, Kargman S, Leblanc Y, Mancini J, Ouellet M, Percival D, Prasit P, Roy P, Skorey K, Tagari P, Vickers P, Wong E. From indomethacin to a selective COX-2 inhibitor. Development of indolalkanoic acids as potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 1997;407:73-78
- 9 Tjandrawinata RR, Dahiya R, Hughes-Fulford M. Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 1997;75:1111-1118
- 10 Bueno de Mesquita HB, Maisonneuve P, Runia S, Moerman CJ. Intake of foods and nutrients and cancer of the exocrine pancreas: a population-based case-control study in the Netherlands. *Int J Cancer* 1991;48:540-549
- 11 Wenger FA, Jacobi CA, Kilian M, Zieren HU, Huller JM. Dose dietary alpha-linolenic acid promote liver metastases in pancreatic carcinoma initiated by BOP in Syrian hamster. *Ann Nutr Metab* 1999;43:121-126
- 12 Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:198-204
- 13 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999;29:688-696
- 14 Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, Kim HS, Nam DK, Lee KB, Kim HC. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:519-525
- 15 Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. A hypothesis: non-steroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:355-358
- 16 Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995;333:609-614
- 17 Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000;21:139-146
- 18 Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ 3rd. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999;59:987-990

早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究

彭毅志, 袁志强, 肖光夏

彭毅志, 袁志强, 肖光夏, 中国人民解放军第三军医大学西南医院烧伤研究所 重庆市 400038

彭毅志, 男, 1958-08-17 生, 重庆市人, 汉族, 1983 年, 第三军医大学本科毕业, 1993 年第三军医大学博士毕业, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事烧伤感染及创面修复的研究。

项目负责人: 彭毅志, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院烧伤研究所. yizhipen@mail.tmmu.com

电话: 023-68754173 传真: 023-65320896

收稿日期: 2002-08-02 接受日期: 2002-08-16

Effects of early enteral feeding on intestinal mucosa injury in burned rat

Yi-Zhi Peng, Zhi-Qiang Yuan, Guang-Xia Xiao

Yi-Zhi Peng, Zhi-Qiang Yuan, Guang-Xia Xiao, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038 China

Correspondence to: Dr. Yi-Zhi Peng, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038 China. yizhipen@mail.tmmu.com

Received: 2002-08-02 Accepted: 2002-08-16

Abstract

AIM: To analysis the mechanism of early enteral nutrition extenuating the damage of intestinal mucosa in burned rats.

METHODS: Lymphatic fistula of intestine was created in Wistar rats, the rats were then sustained with 30 % TBSA third degree scald and divided randomly to early enteral nutrition, non early enteral nutrition and operation control groups. The content of malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase (SOD), endotoxin and tumor necrosis factor (TNF) in intestinal lymph and intestinal lymph flow were observed dynamically.

RESULTS: After burns the intestinal lymph flow and SOD were significantly decreased ($P < 0.01$); the level of intestinal lymph endotoxin, MDA and TNF were evidently increased ($P < 0.05$). However, the early enteral nutrition could increase the intestinal lymph flow and SOD ($P < 0.05$), decrease the levels of intestinal lymph endotoxin, MDA and TNF ($P < 0.05$). The level of intestinal lymph MDA was positively related to the endotoxin level and the endotoxin level was positively related to the TNF level in early enteral nutrition and simply burn groups.

CONCLUSION: Oxygen-derived free radicals are one of the factors of intestinal mucosal damage after burns, and the early enteral nutrition could protect the intestinal mucosal barrier from being injured and inhibit the bacterial translocation from the intestine.

Peng YZ, Yuan ZQ, Xiao GX. Effects of early enteral feeding on intestinal mucosa injury in burned rat. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(7):982-985

摘要

目的: 探讨早期肠道营养在减轻烧伤后肠黏膜损伤中的作用机制。

方法: 通过建立大鼠肠淋巴瘘模型, 随机将大鼠分为早期肠道营养组、烧伤对照组和单纯手术对照组, 动态观察了烧伤前及伤后 3, 6, 12, 24 h 大鼠肠淋巴液流量、肠淋巴液中丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量、内毒素含量及肿瘤坏死因子(TNF)含量。

结果: 烧伤后肠淋巴液流量及SOD含量明显下降($P < 0.05$), 早期肠道营养组肠淋巴液流量及SOD含量显著高于烧伤对照组($P < 0.05$); 烧伤后肠淋巴液内毒素、MDA及TNF含量明显升高($P < 0.05$), 早期肠道营养组肠淋巴液内毒素、MDA及TNF含量显著低于烧伤对照组($P < 0.05$); 早期肠道营养组和烧伤对照组肠淋巴液MDA与内毒素含量呈显著正相关($r_{A组} = 0.95$, $r_{B组} = 0.93$, $P < 0.01$); 肠淋巴液内毒素与TNF含量也呈显著正相关($r_{A组} = 0.91$, $r_{B组} = 0.98$, $P < 0.01$)。

结论: 早期肠道营养可通过改善肠黏膜缺血缺氧, 减轻氧自由基引起的肠黏膜损伤以及阻断内毒素-炎性递质-肠黏膜损伤这一恶性循环, 从而保护了肠黏膜屏障, 减少了肠源性感染的发生。

彭毅志, 袁志强, 肖光夏. 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11(7):982-985

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/982.asp>

0 引言

严重创伤、烧伤、出血性休克、肠梗阻及高热等均可削弱肠黏膜屏障功能, 肠腔内存在的大量微生物和内毒素侵入体循环, 从而形成肠源性感染。后者与顽固性休克、难以控制的早期暴发性败血症及多器官功能衰竭(MOF)的发生发展密切相关^[1-4]。近年来早期肠道营养在防治肠源性感染中的作用引起越来越多的注意^[5-10]。我们通过观察烧伤后大鼠肠淋巴液流量、肠淋巴液中丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量、内毒素含量及肿瘤坏死因子(TNF)含量, 对早期肠道营养在减轻烧伤后肠黏膜损伤中的作用机制进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar大鼠146只(第三军医大学动物所提供), 雌雄各半, 质量 250 ± 20 g。腹腔麻醉下, 于

大鼠右肾静脉平面, 肠系膜动脉旁找到肠淋巴管, 插入去热原的聚乙烯管(外径: 0.8 mm, 内径: 0.5 mm), 见淋巴液经引流管流出后予以妥善固定. 肠淋巴管造瘘成功后, 于胃前壁作浆肌层荷包缝合, 暂不结扎, 在荷包缝线中央用尖刀片切开胃壁, 置入硅胶管(外径: 1.5 mm, 内径: 0.8 mm), 通过幽门插入小肠约 2 cm, 结扎荷包缝线固定胶管后将其经腹壁引出, 缝合腹壁切口. 术后将大鼠放入限制笼^[17]. 术后 24 h, 大鼠肠淋巴液流量趋于稳定. 禁食 5h 后腹腔麻醉, 将大鼠背部剃毛, 置剃毛区于 92 °C 水中 18 s, 造成 30 % TBSA III 度烧伤. 伤后立即腹腔注入平衡液 40 mL/kg. 仍将大鼠放入限制笼内饲养.

1.2 方法 随机将 146 只大鼠分为 3 组, 最后有 48 只大鼠成功用于本研究. 早期肠道喂养组(A 组, $n = 14$): 致伤后 20 min 内开始肠道喂养营养液(Eusure, 美国产, 每毫升营养液含 1 kcal 热量. 热卡分布为: 蛋白质 14 %, 脂肪 31.5 %, 碳水化合物 54.5 %.)180 mL/kg · 24 h. 使用 LDB-H 型微量电子蠕动泵经胃造瘘管 24 h 持续均匀输入; 烧伤对照组(B 组, $n = 14$): 用等量复方乳酸林格氏液代替营养液, 其他处理同 A 组; 单纯手术对照组(C 组, $n = 20$): 仅行肠淋巴管造瘘和胃造瘘, 但不致伤,

自由进食. 观察记录致伤前和伤后 3, 6, 12, 24 h 肠淋巴液流量, 并收集淋巴液. 肠淋巴液标本收集和内毒素测定所用的所有器材均经蒸馏水清洗、烘干, 高压蒸气消毒后用 ⁶⁰Co 照射去热原. 按各时相点取肠淋巴液, 500 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 采用基质偶氮显色法试验测定其内毒素含量, 由上海市医学化验所提供试剂盒, 严格按说明书操作. 肠淋巴液 MDA 和 SOD 测定: 按各时相点取肠淋巴液, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 采用南京铁道医学院提供的 MDA 和 SOD 试剂盒, 按说明书操作测定肠淋巴液中 MDA 和 SOD 含量. 肠淋巴液 TNF 测定: 采用双抗体夹心法(ELISA), 由军事医学科学院提供 TNF 试剂盒, 严格按说明书操作.

统计学处理 采用 SPLM 软件包对实验数据进行处理, 包括 T 检验和相关性分析.

2 结果

烧伤对照组(B 组)伤后 3 h 肠淋巴液流量明显下降, 持续到伤后 24 h($P < 0.05$); 早期肠道营养组(A 组)虽然肠淋巴液流量也明显低于单纯手术对照组(C 组)($P < 0.05$), 但显著高于烧伤对照组($P < 0.05$), 早期肠道营养组伤后各时相点肠淋巴液流量比烧伤对照组约高一倍(表 1).

表 1 烧伤后大鼠肠淋巴液流量变化($\bar{x} \pm s$, mL/h)

分组	n	PBH				
		0	3	6	12	24
A 组	14	0.78±0.10	0.43±0.09 ^{bc}	0.48±0.17 ^{bc}	0.40±0.11 ^{bc}	0.31±0.09 ^{bc}
B 组	14	0.78±0.11	0.19±0.05 ^a	0.29±0.04 ^a	0.17±0.03 ^a	0.15±0.03 ^a
C 组	20	0.79±0.15	0.78±0.14	0.82±0.17	0.76±0.11	0.67±0.06

^a $P < 0.05$ vs C 组; ^b $P < 0.05$ vs B 组.

表 2 肠淋巴液内毒素、MDA、SOD 及 TNF 含量变化

指标	分组	n	PBH				
			0	3	6	12	24
内毒素 (Eu/ml)	A 组	14	0.19±0.04	0.48±0.08 ^{bc}	0.61±0.05 ^{bc}	0.72±0.09 ^{bc}	0.52±0.07 ^{bc}
	B 组	14	0.19±0.04	1.47±0.14 ^a	1.52±0.17 ^a	1.90±0.23 ^a	1.80±0.22 ^a
	C 组	20	0.19±0.04	0.19±0.04	0.20±0.04	0.19±0.03	0.21±0.06
MDA (nmol/L)	A 组	14	8.04±1.97	20.00±2.46 ^{bc}	26.10±2.04 ^{bc}	23.73±2.71 ^{bc}	19.77±2.62 ^{bc}
	B 组	14	9.23±1.68	55.30±4.15 ^a	77.92±10.05 ^a	66.31±10.39 ^a	66.72±6.40 ^a
	C 组	20	9.02±1.94	8.75±1.99	9.24±1.93	9.31±1.92	8.34±1.78
SOD (NU/L)	A 组	14	265±26	193±30 ^{bc}	182±29 ^{bc}	198±23 ^{bc}	231±32 ^{bc}
	B 组	14	259±24	106±22 ^a	131±32 ^a	157±33 ^a	196±28 ^a
	C 组	20	256±29	255±25	263±26	253±23	262±24
TNF (ng/L)	A 组	14	0.62±0.06	1.47±0.09 ^{bc}	1.58±0.10 ^{bc}	1.54±0.12 ^{bc}	1.95±0.16 ^{bc}
	B 组	14	0.62±0.06	3.73±0.20 ^a	3.90±0.18 ^a	4.07±0.16 ^a	4.11±0.23 ^a
	C 组	20	0.62±0.07	0.61±0.08	0.58±0.17	0.59±0.05	0.64±0.05

^a $P < 0.05$ vs C 组; ^b $P < 0.05$ vs B 组.

2.1 肠淋巴液内毒素含量 烧伤对照组(B组)大鼠肠淋巴液内毒素含量伤后3h即显著增高,12h达高峰,持续到伤后24h($P < 0.05$);早期肠道营养组(A组)伤后各时相点肠淋巴液内毒素含量明显低于烧伤对照组($P < 0.05$),但仍显著高于单纯手术对照(C组,表2)。

2.2 肠淋巴液MDA、SOD含量的变化 烧伤后各时相点肠淋巴液MDA含量均高于单纯手术对照组(C组),烧伤对照组(B组)肠淋巴液中MDA含量明显增高,伤后6h达高峰,伤后24h仍高于正常($P < 0.05$);早期肠道营养组(A组)烧伤后MDA升高的幅度显著低于烧伤对照组($P < 0.05$)。烧伤对照组(B组)肠淋巴液中SOD含量于伤后3h即下降到最低点,持续到伤后24h($P < 0.05$);而早期肠道营养组(A组)肠淋巴液中SOD含量烧伤后各时相点均显著高于烧伤对照组($P < 0.05$),A、B两组伤后各时相点SOD含量均显著低于单纯手术对照组(表2)。

2.3 肠淋巴液TNF含量的变化 烧伤后肠淋巴液中TNF含量明显高于正常,烧伤对照组(B组)肠淋巴液中TNF含量在伤后3h即开始升高,伤后24h达高峰,伤后各时相点TNF含量均显著高于单纯手术对照组($P < 0.05$);早期肠道营养组(A组)伤后各时相点TNF含量均显著低于烧伤对照组($P < 0.05$,表2)。

烧伤后早期肠道营养组(A组)和烧伤对照组(B组)肠淋巴液MDA与内毒素含量的增加呈显著正相关($r_{A组} = 0.95$, $r_{B组} = 0.93$, $P < 0.01$);肠淋巴液内毒素与TNF含量的增加也呈显著正相关($r_{A组} = 0.91$, $r_{B组} = 0.98$, $P < 0.01$)。

3 讨论

肠道是微生物和内毒素含量最高的器官,在正常情况下机体具有多种防御功能,以防止其进入全身组织和器官。当机体受到严重创伤时,由于肠黏膜屏障功能受损,肠道菌群紊乱及机体免疫功能受抑,这些防御机制可能被破坏,导致肠道内的细菌和内毒素通过肠淋巴管或门静脉移位,进而引起全身性感染^[18]。严重烧伤后,机体为了保护心脑等重要器官而减少内脏的血流量,使肠黏膜处于低灌注状态,从而导致肠黏膜屏障功能的损害。本结果显示,烧伤对照组伤后各时相点肠淋巴液流量显著减少,而早期肠道营养组则比烧伤对照组的肠淋巴液流量高一倍左右。提示烧伤后早期肠道营养可以明显改善肠黏膜缺血缺氧状态。烧伤后肠黏膜缺血再灌注时可产生大量的氧自由基($O_2^{\cdot-}$),后者主要作用于细胞膜,使之发生脂质过氧化,破坏组织细胞。已有资料表明氧自由基参与了烧伤后肠黏膜损伤^[19,20]。本结果表明,烧伤后各时相点肠淋巴液中MDA(一种脂质过氧化代谢产物)的含量均显著增高,早期肠道营养组肠淋巴液中MDA含量明显低于烧伤对照组,而且MDA含量与内毒素含量呈显著正相关。提示:反映肠黏膜屏障损伤的指标MDA在烧伤后明显增加,导致肠淋巴液中肠源性内毒素增加;早期肠道营养减少了氧自由基的产生,维护了肠黏膜结构的完整性,降低了肠淋

巴液中内毒素含量。

肠道中的微生物在突破肠道免疫屏障的过程中,内毒素可以触发多种炎性递质释放,包括TNF、血小板活化因子(PAF)及氧自由基等^[20-30]。本研究结果显示:烧伤后3h肠淋巴液中TNF含量即达较高水平,至伤后24h一直呈上升趋势;早期肠道营养组肠淋巴液中TNF含量增加的幅度显著低于烧伤对照组。相关分析的结果表明,内毒素与TNF的水平呈显著正相关。提示:烧伤后肠淋巴液TNF含量的增加与内毒素的增加有关;由于减少了烧伤后肠道内毒素的移位,所以使TNF的水平下降。烧伤后肠源性内毒素移位能引起大量炎性递质释放,这些内毒素、炎性递质反过来又可影响肠黏膜微循环,破坏组织细胞氧的传递,进一步增加肠黏膜屏障的损害,我们将这一过程称之为内毒素-炎性递质-肠黏膜损伤的恶性循环。早期肠道营养由于减少了肠道细菌和内毒素移位,因此及时阻断了这一恶性循环,不仅减轻了内毒素和炎性递质对于肠黏膜的继续损伤,而且还可避免可能发生的多器官功能衰竭。

4 参考文献

- 1 Akin ML, Uluutku H, Erenoglu C, Ilicak EN, Elbuken E, Erdemoglu A, Celenk T. Hyperbaric oxygen ameliorates bacterial translocation in rats with mechanical intestinal obstruction. *Dis Colon Rectum* 2002;45:967-972
- 2 O'Brien DP, Nelson LA, Kemp CJ, Williams JL, Wang Q, Erwin CR, Hasselgren PO, Warner BW. Intestinal permeability and bacterial translocation are uncoupled after small bowel resection. *J Pediatr Surg* 2002;37:390-490
- 3 LeVoyer T, Cioffi WG Jr, Pratt L, Shippee R, McManus WF, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Alterations in intestinal permeability after thermal injury. *Arch Surg* 1992;127: 26-29
- 4 Maejima K, Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infect Immun* 1984;43:6-10
- 5 Sefton EJ, Boulton-Jones JR, Anderton D, Teahon K, Knights DT. Enteral feeding in patients with major burn injury: the use of nasojejunal feeding after the failure of nasogastric feeding. *Burns* 2002;28:386-390
- 6 Peng YZ, Yuan ZQ, Xiao GX. Effects of early enteral feeding on the prevention of enterogenic infection in severely burned patients. *Burns* 2001;27:145-149
- 7 Peng X, Yan H, Tao LH, Zhao Y, Wang P, Wang SL. Effects of early enteral nutrition on intestinal damage and repair in burned rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1251-1254
- 8 Tassiopoulos AK. Nutritional support of the patient with severe burn injury. *Nutrition* 1999;15:956-957
- 9 Peng X, Feng J, Wang S. Effects of early enteral feeding on nitric oxide synthase activity in small intestine in burned rat. *Zhonghua Zhengxing Shaoshang Waike Zazhi* 1998;14:37-40
- 10 Hansbrough JF. Enteral nutritional support in burn patients. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1998;8:645-667
- 11 Ren J, Wang S, Li A. An experimental study of the effects of early enteral feeding of L-arginine enriched food on postburn intestinal mucosal proliferation in rats. *Zhonghua Shaoshang Zazhi* 2001;17:219-221
- 12 Zhu L, Yang Z, Li A. The protective effects on postburn renal function by early enteral feeding in burned rats. *Zhonghua Shaoshang Zazhi* 2000;16:224-227
- 13 Peng X, Wang S, Tao L. Effects of different nutritional support routes on the intestinal mucosa mucosainjury and renovation in burned rats. *Zhonghua Shaoshang Zazhi* 2000;16: 215-218
- 14 Zhou Y, Jiang Z, Sun Y. Glutamine dipeptide enriched enteral nutrition improving gut permeability in sever burns. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:825-827

- 15 Marik PE, Zaloga GP. Early enteral nutrition in acutely ill patients: a systematic review. *Crit Care Med* 2001;29:2264-2270
- 16 Qin HL, Cui HG, Zhang CH, Wu DW, Chu XP. Effects of glutamine on structure and function of gut in endotoxemic rats. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:69-72
- 17 Peng Y, Xiao GX, Ma L. Intestinal lymphatic circulation is one of the important portals for microbial translocation after thermal injury. *Zhonghua Zhengxing Shaoshang Waike Zazhi* 1996;12:83-85
- 18 吴承堂, 黄祥成, 黎沾良. 肠通透性增高与肠道细菌移位. *世界华人消化杂志* 1999;7:605-606
- 19 Latha B, Babu M. The involvement of free radicals in burn injury: a review. *Burns* 2001;27:309-317
- 20 Yang H, Sheng Z, Guo Z, Shi Z, Lu J, Chai J, Sun C. Oxygen free radical injury and its relation to bacterial and endotoxin translocation after delayed fluid resuscitation: clinical and experimental study. *Chin Med J* 1997;110:118-124
- 21 Yao Y, Yu Y, Wu Y, Shi Z, Sheng Z. The role of gut as a cytokine-generating organ in remote organ dysfunction after intestinal ischemia and reperfusion. *Chin Med J* 1998;111:514-518
- 22 Zhai H, Yao Y, Lu L. The relationship between tissue tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA expression and gut-derived endotoxemia in rats after thermal injury. *Zhonghua Zhengxing Shaoshang Waike Zazhi* 1999;15:424-427
- 23 Yao Y, Yu Y, Chen J. The effect of intestinal ischemia/reperfusion on increased sensitivity to endotoxin and its potential mechanism. *Zhonghua Zhengxing Shaoshang Waike Zazhi* 1999;15:301-304
- 24 Li JY, Lu Y, Hu S, Sun D, Yao YM. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma. *World J Gastroenterol* 2002;8:168-171
- 25 Spies M, Chappell VL, Dasu MR, Herndon DN, Thompson JC, Wolf SE. Role of TNF- α in gut mucosal changes after severe burn. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283: G703-708
- 26 Ogle CK, Noel JG, Guo X, Wells DA, Valente JF, Ogle JD. The ability of endotoxin-stimulated enterocytes to produce bactericidal factors. *Crit Care Med* 2002;30:428-434
- 27 Ruan CP, Wang YH, Wang LG. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract in rats with intestinal ischemia. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1996;4:304-305
- 28 Yu P, Xiao G, Fu W. Pathogenetic effect of platelet activating factor on enterogenic endotoxemia after burn. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:136-138
- 29 于勇, 田惠民, 施志国, 姚咏明, 王亚平, 陆连荣, 于燕, 常国友, 马诺山, 盛志勇. 大鼠烫伤致肠道免疫屏障损伤与血浆内毒素变化的关系. *华人消化杂志* 1998;6:703-704
- 30 黄维坤, 司娜, 顾琦, 孙新平, 杨旭凯, 周栋, 张安平, 赵文鹏. 肠内营养支持在消化系手术中的应用. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊 8):9

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

• 消息 •

美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单

(2002-07-19)

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

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

胃肠道平滑肌细胞作为eNOS基因转移靶细胞的研究

宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力

宁守斌, 张忠兵, 谢渭芬, 杨秀疆, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003
沈茜, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院实验诊断科 上海市 200433
赵新, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院血管外科 上海市 200433
信栓力, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院心内科 上海市 200003
宁守斌, 男, 1973-11-06生, 甘肃省景泰县人, 汉族, 上海第二军医大学博士研究生, 主要从事胃肠激素与胃肠动力的研究。
项目负责人: 张忠兵, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科。 zhongbingz@yahoo.com.cn
电话: 021-63610109-73254
收稿日期: 2002-10-09 接受日期: 2002-10-30

Gastrointestinal smooth muscle cell as target for gene transfer of eNOS gene

Shou-Bin Ning, Zhong-Bing Zhang, Qian Sheng, Wei-Fen Xie, Xiu-Jiang Yang, Xin Zhao, Shuan-Li Xin

Shou-Bin Ning, Zhong-Bing Zhang, Wei-Fen Xie, Xiu-Jiang Yang, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University 200003, Shanghai, China
Qian Sheng, Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, The Second Military Medical University 200433, Shanghai, China
Xin Zhao, Department of Vascular Surgery, Changhai Hospital, The Second Military Medical University 200433, Shanghai, China
Shuan-Li Xin, Department of cardiology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University 200003, Shanghai, China
Correspondence to: Zhong-Bing Zhang, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University 200003, Shanghai, China. zhongbingzhang@hotmail.com
Received: 2002-10-09 Accepted: 2002-10-30

Abstract

AIM: To generate an adenoviral vector carrying endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) gene in order to mediate the expression of eNOS gene in gastrointestinal smooth muscle cells (SMC) and assess the enzyme activity of eNOS.

METHODS: A recombinant adenovirus (Ad-eNOS) containing the bovine eNOS cDNA fragment was generated by homologous recombination in bacteria. The SMC of distal part of esophagus and gastric fundus of cat were isolated and cultured in vitro and infected with Ad-eNOS. The expression of eNOS gene was detected by Western blot and RT-PCR. The enzyme activity of NOS and the output of NO in SMC were measured by NOS and NO assay kit, furthermore, the different effects of given factors on the enzyme activity and the yield of NO were studied.

RESULTS: The Ad-eNOS can infect the cultured SMC efficiently (MOI=50, infection rate = 74 %). Western blot and RT-PCR confirmed the expression of eNOS in those infected cells. After the cells had been infected with Ad-eNOS, the basal activity of NOS significantly increased from 47 ± 13 nkat/L to 93 ± 13 nkat/L ($P < 0.05$), and the level of NO in cell culture supernatants increased by 3 fold (45 ± 13 vs 16 ± 7 $\mu\text{mol/L}$). In the presence of L-arginine (NOS enzyme substrate), calcium, EGTA (calcium chelating agent), and L-NAME (NOS

inhibitor), NOS activity was 94 ± 8 , 173 ± 25 , 29 ± 6 , 58 ± 11 nkat/L and NO level was 48 ± 14 , 106 ± 18 , 6 ± 2 , 17 ± 11 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

CONCLUSION: The constructed recombinant adenovirus, Ad-eNOS, can efficiently mediate the expression of eNOS gene in cultured SMC of digestive tract. The activity of eNOS can be regulated by the concentration of calcium. L-arginine is not the rate-limiting step for nitric oxide generation from endothelial nitric oxide synthase.

Ning SB, Zhang ZB, Sheng Q, Xie WF, Yang XJ, Zhao X, Xin SL. Gastrointestinal smooth muscle cell as target for gene transfer of eNOS gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):986-989

摘要

目的: 构建内皮型一氧化氮合酶(eNOS)腺病毒表达载体, 介导eNOS在胃肠道平滑肌细胞中稳定表达并评价表达产物eNOS的酶学活性。

方法: 构建牛eNOS的重组腺病毒表达载体Ad-eNOS, 感染体外培养的猫下段食管及胃底部平滑肌细胞, 采用Western blot、RT-PCR技术检测eNOS在平滑肌细胞中的表达, 测定基因转移后NOS活性以及一氧化氮(NO)产量, 并研究不同施加因素对NOS活性及NO合成的影响。

结果: Ad-eNOS可高效感染体外培养的胃肠平滑肌细胞(MOI=50, 感染效率=74%), Western blot、RT-PCR结果证实eNOS在平滑肌细胞中高效表达。Ad-eNOS感染细胞后基础NOS活性比感染前显著增高(93 ± 13 vs 47 ± 13 nkat/L, $P < 0.05$), 培养液中累积的NO增加了3倍(45 ± 13 vs 16 ± 7 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$)。分别加入L-精氨酸(10^{-4} mol/L)、钙离子(10^{-4} mol/L)、EGTA(钙离子螯合剂, 10^{-4} mol/L)及L-NAME(NOS抑制剂, 10^{-3} mol/L)后, NOS活性分别为 94 ± 8 , 173 ± 25 , 29 ± 6 , 58 ± 11 nkat/L, NO含量分别为 48 ± 14 , 106 ± 18 , 6 ± 2 , 17 ± 11 $\mu\text{mol/L}$ 。

结论: 构建的重组腺病毒Ad-eNOS能够高效介导eNOS基因在消化道平滑肌细胞中表达, 表达产物eNOS活性受钙离子浓度调节, 其作用底物L-精氨酸并不是NO合成的限速步骤。

宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力. 胃肠道平滑肌细胞作为eNOS基因转移靶细胞的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):986-989
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/986.asp>

0 引言

一氧化氮(NO)与消化系统多种疾病的发生密切相关,

他作为一种重要的抑制性氮能神经递质, 与血管活性肠肽(VIP)共同介导胃肠平滑肌的松弛运动^[1-3]. NO合成障碍是先天性巨结肠、贲门失弛缓症、弥漫性食管痉挛、肥厚性幽门梗阻、Oddi括约肌运动功能障碍等疾病发生的重要因素^[4-16]. 另外NO可通过调节胃黏膜血流量及促进胃黏液分泌发挥黏膜保护作用, 有利于溃疡的愈合^[17-21]. 但NO半衰期极短, 限制了其供体类药物的临床应用, 所以构建一种能在胃肠平滑肌细胞中稳定表达一氧化氮合酶(NOS)基因的真核表达载体, 使病变部位持续释放NO, 有可能为这些疾病的治疗提供一种新的思路和方法.

1 材料和方法

1.1 材料 编码牛eNOS的全长cDNA序列(4 092 bp)克隆在质粒eNOS-pcDNA3中, 由耶鲁大学Willian C. Sessa博士惠赠^[22]; 腺病毒AdEasyTM系统包括穿梭质粒pAdTrack-CMV以及腺病毒骨架质粒pAdEasy-1, 由美国霍华德-休斯医学研究所He TC惠赠^[23]. 鼠抗牛的eNOS单克隆抗体及驴抗鼠-IgG购自Santa Cruz公司, 限制性内切酶Pme I, Pac-I购自BioLabs公司, 其他限制性内切酶Xba I, EcoR I, Not I, Hind III以及T4 DNA连接酶、DNA片段胶回收试剂盒、1 kb及23 kb的DNA分子质量标准、RT-PCR试剂盒、脂质体LipofectAmine等分别购自Promega, Sigma, Gibco公司. NOS及NO测定试剂盒购自南京建成生物制品有限公司. 家猫两只购自第二军医大学实验动物中心.

1.2 方法 食管及胃底平滑肌细胞培养参考文献[24]并加以改进: 家猫氯氨酮麻醉后取1 cm长的下段食管组织及1.5 × 1 cm胃底部组织, 剥离环行肌及纵行肌后分别用4 ml 1 g/L胶原酶、0.1 g/L胰蛋白酶抑制剂于31 °C消化2次, 30 min/次(每隔5 min用旋涡震荡器震荡一次)至组织呈絮状, 500 μm的分子筛过滤, 离心后细胞用含150 mL/L小牛血清的高糖(12 mmol/L)DMEM培养基将细胞数调至2 × 10⁴, 接种于培养瓶中, 置于37 °C, 50 mL/L CO₂的孵箱内培养. eNOS-pcDNA3经Not I及Hind III双酶切得到4.1 kb的目的条带, 胶回收后定向克隆至穿梭质粒pAdTrack-CMV中形成转移质粒pAdTrack-CMV-eNOS, 后者与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1经电穿孔共同转化大肠杆菌BJ5183, 利用细菌内的同源重组机制进行重组^[23], 形成重组腺病毒质粒Ad-eNOS. 将Ad-eNOS用脂质体介导转染293细胞包装成病毒颗粒, 反复感染293细胞扩增病毒获得高滴度的病毒上清, 氯化铯梯度超速离心纯化后通过计数报告基因绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞数测定病毒滴度. 用相同的方法构建对照病毒Ad-Track-CMV(将空的穿梭质粒pAdTrack-CMV与pAdEasy-1进行重组). 重组腺病毒Ad-eNOS感染效率的测定: 用不同MOI(10、50、100)的重组腺病毒Ad-eNOS感染体外培养的平滑肌细胞, 荧光显微镜下观察GFP的表达情况, 流式细胞仪测定

病毒的感染效率. 重组病毒Ad-eNOS及对照病毒Ad-Track-CMV分别感染平滑肌细胞, 采用RT-PCR、Western blot等方法分别从基因转录水平及蛋白质水平测定eNOS基因在平滑肌细胞中的表达. 扩增250 bp长度eNOS的引物引自文献[25] (5' primer: TCA ACC AGT ACT ACA GCT CC; 3' primer: GTG GTT GCA GAT GTA GGT GA), 扩增350 bp长度内参照β-actin的引物自行设计 (5' primer: AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC; 3' primer: ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC). 细胞培养液中NO含量及细胞中NOS活性的测定: 用50 MOI的Ad-eNOS及对照病毒Ad-Track-CMV分别感染实验组和对照组细胞(各孔细胞数控制在10⁶左右, 培养液体积均为1.0 mL), 并分别于加入病毒之前、之后, 以及在培养液中分别加入L-精氨酸(L-Arg, 10⁻⁴ mol/L)、氯化钙(10⁻³ mol/L)、EGTA(Ca²⁺螯合剂, 10⁻⁴ mol/L)、硝基-L-精氨酸甲基酯(L-NAME, NOS抑制剂, 10⁻³ mol/L)后吸取培养液分别测定NO含量及NOS活性. NOS酶活力单位定义: 每升细胞培养液中每秒钟生成1 nmol NO为1 nkat/L.

统计学处理 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 感染前后自身对照采用配对t检验, 感染以后多个处理组间采用F检验进行统计学处理, P值 < 0.05为显著性差异.

2 结果

转移质粒pAdTrack-CMV-eNOS构建后经鉴定正确, 将pAdTrack-CMV-eNOS及pAdTrack-CMV分别与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1同源重组形成重组腺病毒质粒Ad-eNOS和Ad-Track-CMV. 二者用Pac-I均切出了4.5 kb及大于23 kb两条带, 选用位于目的基因eNOS两侧的多克隆位点, 分别用EcoR I单酶切及Xba I, Sal I双酶切均出现了4.1 kb的目的条带, Ad-Track-CMV用Xba I酶切可使其线性化(图1). 证明两个重组病毒质粒构建成功. 重组质粒包装成重组病毒颗粒并扩增纯化后GFP计数法测得Ad-eNOS和Ad-Track-CMV病毒滴度分别为6 × 10¹² pfu/L和4 × 10¹² pfu/L. 原代培养的食管及胃底平滑肌细胞生长至10-12 d大部分细胞融合, 二者在形态上无明显区别, 均呈现平滑肌细胞典型的“峰-谷”样生长方式(图2), 经抗α-actin免疫组织化学染色及电镜观察鉴定, 证明培养的细胞为平滑肌细胞, 纯度达到95%以上, 台盼蓝染色提示细胞存活率达到94%以上. 重组病毒感染平滑肌细胞后在荧光显微镜下可见平滑肌细胞内有GFP表达(图3), 流式细胞仪测定结果提示当MOI分别为10、50和100时感染效率分别为21%、74%和100%.

2.1 eNOS在食管及胃平滑肌细胞中的表达 RT-PCR结果提示, Ad-eNOS感染平滑肌细胞后可特异扩增出针对目的基因的片段, 而对照病毒感染的细胞未出现此条带(图4). Western blot结果证实, Ad-eNOS感染后,

无论细胞培养液中还是细胞裂解液中均出现了约135 kDa大小的特异性蛋白条带, 与 eNOS 基因产物的大小一致, 而对照组为阴性(图 5).

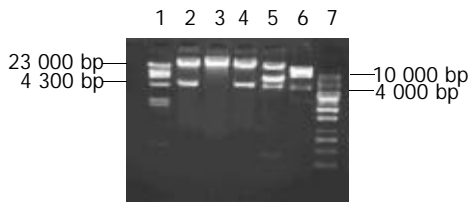


图1 Ad-eNOS及Ad-Track-CMV酶切鉴定图谱. 1 λ-Hind III DNA Marker (23 kb); 2 Ad-Track-CMV (Pac I); 3 Ad-Track-CMV (Xba I) 4 Ad-eNOS (Pac I); 5 Ad-eNOS (EcoR I); 6 Ad-eNOS (Xba I、Sal I) λ-Hind III DNA Marker (1 kb).

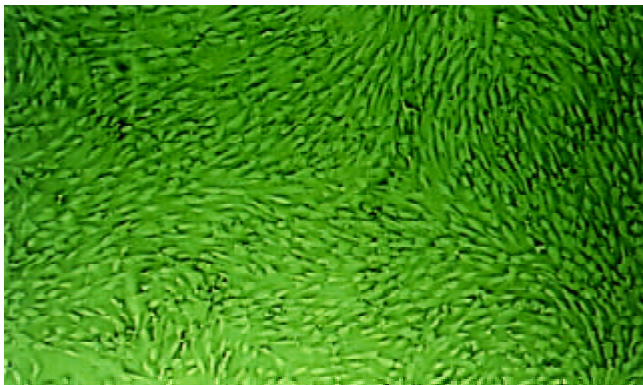


图2 食管平滑肌细胞培养 10 d 时呈现“峰-谷”状的生长方式(×50).

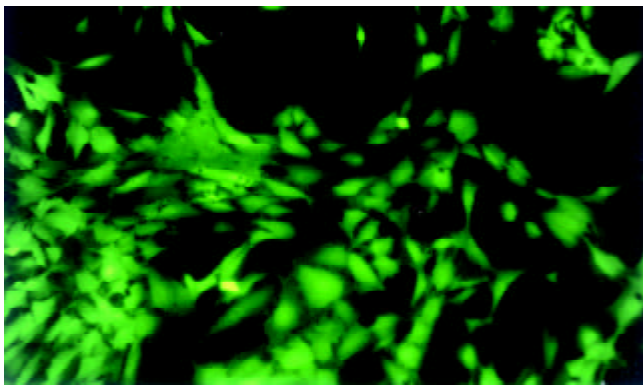


图3 报告基因 GFP 在体外培养的食管平滑肌细胞中大量表达.

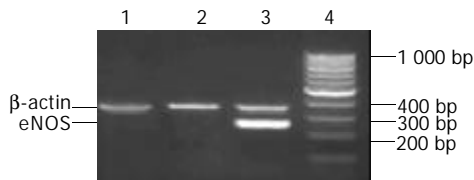


图4 RT-PCR 结果: eNOS 在平滑肌细胞中表达. 1 未感染病毒; 2 感染 Ad-Track-CMV; 3 感染 eNOS-Ad λ-Hind III DNA Marker(100 bp).

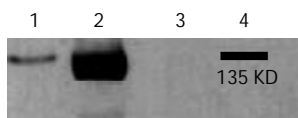


图5 Western blot 结果. 1 感染 eNOS-Ad 平滑肌细胞培养基上清; 2 感染 eNOS-Ad 平滑肌细胞裂解液; 3 感染 Ad-Track-CMV 平滑肌细胞裂解液; 4 蛋白质分子量标准.

2.2 NO 含量及 NOS 活性测定结果 Ad-eNOS 感染后平滑肌细胞中 NOS 活性、培养液中 NO 含量均比感染前及对照组明显增加(P < 0.05, 表 1). 培养液中加入 L-精氨酸(NOS 作用底物)后 NOS 活性、NO 代谢产物含量无明显变化(P > 0.05), 但加入钙离子后 NOS 活性增加、NO 含量显著升高(P < 0.05), 而钙离子螯和剂 EGTA 几乎可以完全抑制酶的活性. NOS 抑制剂 L-NAME 也可明显抑制 NOS 活性, 使培养液中 NO 含量减少(P < 0.05).

表 1 NOS 活性及 NO 含量的测定结果(̄x ± s, n=10)

	NOS(nkat/L)	NO(μmol/L)
空白组	47±13	15.64±6.62
Ad-Track-CMV	45±14	13.74±9.32
Ad-eNOS	97±13 ^{ac}	45.37±12.65 ^{ac}
L-Arg	94±8	48±14
Ca ²⁺	173±25 ^e	106±18 ^e
EDTA	29±6 ^e	6±2 ^e
L-NAME	58±11 ^e	17±11 ^e

^aP < 0.05 vs 空白组, ^cP < 0.05 vs Ad-Track-CMV, ^bP < 0.05 vs Ad-eNOS.

3 讨论

催化产生 NO 的一氧化氮合酶(NOS)有三种亚型: 即神经元型(nNOS)、诱导型(iNOS)及 Ca²⁺/钙调素(CaM)依赖结合型(eNOS), 分别由不同的基因编码^[26-28]. 人们通常将 nNOS 和 eNOS 合称为结构型一氧化氮合酶(cNOS), 其活性为 Ca²⁺/CaM 依赖性, 受细胞内 Ca²⁺ 浓度的生理性调节, 而 iNOS 活性为非 Ca²⁺ 依赖性, 其表达受内毒素、IL-1 等诱导. 结构型一氧化氮合酶广泛分布于胃肠道, nNOS 主要分布在胃肠肌间神经丛, eNOS 主要分布在胃肠平滑肌细胞、肠壁血管内皮及血管平滑肌细胞, 二者也可共存于一些黏膜固有层细胞中^[29-32]. NO 合成障碍与先天性巨结肠、贲门失弛缓症、弥漫性食管痉挛、特发性肠梗阻、肥厚性幽门梗阻、便秘等疾病的发生密切相关, 而且 NO 可以促进溃疡的愈合. 若将外源性的 eNOS 基因转移至相应部位平滑肌细胞使之产生 NO, 理论上对这些疾病能发挥有效的治疗作用.

我们利用细菌内同源重组法构建了携带目的基因 eNOS 的重组腺病毒载体. 腺病毒不仅能够高效感染多种增生细胞, 而且也能感染静息哺乳类细胞, 且不与细胞的基因组发生整合, 不引起基因突变, 可以携带较大片段的外源基因, 是一种比较理想的用于基因治疗的表达载体^[33,34]. 平滑肌细胞是组成胃肠道最重要的组织细胞之一, 是引起胃肠运动的效应细胞, 在生理情况下胃肠道平滑肌细胞内有低丰度的 eNOS 表达^[2], 所以胃肠平滑肌细胞可作为表达外源 eNOS 基因产生 NO 的理想场所, 是进行基因治疗的理想靶细胞. 我们在体外成功分离培养了较高纯度的食管及胃底平滑肌细胞, 并证明构建的 eNOS 重组腺病毒 Ad-eNOS 能高效感染体外培养

的平滑肌细胞, 从而成功介导了外源基因 eNOS 在平滑肌细胞中的表达. 进一步的实验表明, 基因表达产物 eNOS 的活性受到 Ca^{2+} 浓度的调节, 符合其 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖性的生化特征. 底物 L-精氨酸似乎并不是酶促反应的限速步骤, 可能是由于 eNOS 的 K_m 值(酶促反应速度达到最大速度一半时的底物浓度)很低, 细胞培养液中的浓度远远超过这个值, 而且平滑肌细胞可通过尿素循环将 L-瓜氨酸再转化为 L-精氨酸而被循环利用^[35], 这就保证了基因转移后在体内不会由于底物缺乏而影响 NO 的产生.

4 参考文献

- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990;345:346-347
- Teng B, Murthy KS, Kuemmerle JF, Grider JR, Sase K, Michel T, Makhlof GM. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;275(2Pt 1):G342-351
- Kurjak M, Fritsch R, Saur D, Schusdzarra V, Allescher HD. Functional coupling between nitric oxide synthesis and VIP release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5. *J Physiol* 2001; 534 (Pt 3):827-836
- Sivarao DV, Mashimo HL, Thatte HS, Goyal RK. Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS (-/-) and hypotensive in W/W(v) mutant mice. *Gastroenterology* 2001;121:34-42
- Kusafuka T, Puri P. Altered mRNA expression of the neuronal nitric oxide synthase gene in Hirschsprung's disease. *J Peiatr Surg* 1997;32:1054-1058
- Shima Y, Mori M, Takakura N, Tanaka N, Yokoi I, Kabuto H, Yamazato T. Continuous monitoring of nitric oxide release induced by cholecystokinin from the choledochal sphincter in guinea pigs. *Digestion* 2000;61:135-139
- Chiu JH, Lui WY, Chen YL, Hong CY. Local somatothermal stimulation inhibits the motility of sphincter of Oddi in cats, rabbits and humans through nitrergic neural release of nitric oxide. *Life Sci* 1998;63:413-428
- Shima Y, Mori M, Harano M, Tsuge H, Tanaka N, Yamazato T. Nitric oxide mediates cerulein-induced relaxation of canine sphincter of Oddi. *Dig Dis Sci* 1998;43:547-553
- Millar AJ, Steinberg RM, Raad J, Rode H. Anal achalasia after pull-through operations for Hirschsprung's disease-preliminary experience with topical nitric oxide. *Eur J Pediatr Surg* 2002;12:207-211
- Saur D, Paehge H, Schusdzarra V, Allescher HD. Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2000;118:849-858
- De Giorgio R, Di Simone MP, Stanghellini V, Barbara G, Tonini M, Salvioli B, Mattioli S, Corinaldesi R. Esophageal and gastric nitric oxide synthesizing innervation in primary achalasia. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2357-2362
- Lui H, Vanderwinden JM, Ji P, De Laet MH. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of children with cardiac achalasia. *Chin Med J* 1997;110:358-361
- Faussone-Pellegrini MS, Infantino A, Matini P, Masin A, Mayer B, Lise M. Neuronal anomalies and normal muscle morphology at the hypomotile ileocecolonic region of patients affected by idiopathic chronic constipation. *Histol Histopathol* 1999;14:1119-1134
- Subramaniam R, Doig CM, Moore L. Nitric oxide synthase is absent in only a subset of cases of pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 2001;36:616-619
- Gentile C, Romeo C, Impellizzeri P, Turiaco N, Esposito M, Di Mauro D, Mondello MR. A possible role of the plasmalemmal cytoskeleton, nitric oxide synthase, and innervation in infantile hypertrophic pyloric stenosis. A confocal laser scanning microscopic study. *Pediatr Surg Int* 1998;14:45-50
- Guo R, Nada O, Suita S, Taguchi T, Masumoto K. The distribution and co-localization of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide in nerves of the colons with Hirschsprung's disease. *Virchows Arch* 1997;430:53-61
- Khattab MM, Gad MZ, Abdallah D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacol Res* 2001; 43:463-467
- 乐桥良, 文晓冬. 大鼠应激性溃疡中一氧化氮的作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:815-816
- 余贤恩, 罗绮凝. 外源性一氧化氮对豚鼠酸化乙醇性胃黏膜损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:224
- 曾锦章, 李万岱, 刘晓霞, 张振书, 张亚历, 周殿元. 蛋白酪氨酸激酶与一氧化氮合酶活性的变化在胃黏膜损伤修复中的作用和意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:354-355
- 闫长栋, 李平, 祁友键. 大鼠胃扩张致胃酸分泌中 NO 对胃黏膜血流量的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:1067-1068
- Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D' Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;267:15274-15276
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514
- Yuan QX, McRoberts JA, Lakshmanan J, Yagi H, Hyman PE. Newborn rabbit gastric smooth muscle cell culture: EGF and TGF- α are potent mitogens. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17:153-160
- Kalra M, Jost CJ, Severson SR, Miller VM. Adventitial versus intimal liposome-mediated ex vivo transfection of canine saphenous vein grafts with endothelial nitric oxide synthase gene. *J Vasc Surg* 2000;32:1190-1200
- Zhang J, Patel JM, Block ER. Molecular cloning, characterization and expression of a nitric oxide synthase from porcine pulmonary artery endothelial cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997;116:485-491
- Iwashina M, Hirata Y, Imai T, Sato K, Marumo F. Molecular cloning of endothelial, inducible nitric oxide synthase gene from rat aortic endothelial cell. *Eur J Biochem* 1996;237:668-673
- Ogura T, Yokoyama T, Fujisawa H, Kurashima Y, Esumi H. Structural diversity of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:1014-1022
- Chen YM, Qian ZM, Zhang J, Chang YZ, Duan XL. Distribution of constitutive nitric oxide synthase in the jejunum of adult rat. *World J Gastroenterol* 2002;8:537-539
- Lindstrom LM, Ekblad E. Origins and projections of nerve fibres in rat pyloric sphincter. *Auton Neurosci* 2002;97:73-82
- Konig P, Dedio J, Muller-Esterl W, Kummer W. Distribution of the novel eNOS-interacting protein NOSIP in the liver, pancreas, and gastrointestinal tract of the rat. *Gastroenterology* 2002; 123:314-24
- Peng X, Feng JB, Yan H, Zhao Y, Wang SL. Distribution of nitric oxide synthase in stomach myenteric plexus of rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:852-854
- Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol* 2001;18:63-70
- Breyer B, Jiang W, Cheng H, Zhou L, Paul R, Feng T, He TC. Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001;1:149-162
- Mohacs T, Mozes G, Sato J, Gloviczki P, Katusic Z, O'Brien T. L-arginine availability is not limiting for nitric oxide generation from recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Vasc Res* 1999;36:437-444

内皮素 - 1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用

段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭

段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭, 中国人民解放军第二军医大学
海医院消化科 上海市 200433

段义民, 男, 1969-01-09 生, 江苏省东台人, 汉族. 1992 年南通医学院本科毕
业, 2002 年第二军医大学博士研究生毕业, 主治医师, 主要从事应激性溃疡发生
机制与防治研究.

全军医学科研“十五”重大项目资助课题, No.01Z059

项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医
大学海医院消化科. yixb@sh163.net

电话: 021-25070552 传真 021-65347066

收稿日期: 2002-11-05 接受日期: 2002-11-25

Protective effects of endothelin-1 antibody on stress induced lesion of gastric mucosa in rats

Yi-Min Duan, Zhao-Shen Li, Xian-Bao Zhan, Yan-Fang Gong,
Guo-Ming Xu

Yi-Min Duan, Zhao-Shen Li, Xian-Bao Zhan, Yan-Fang Gong, Guo-Ming Xu,
Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military
Medical University, Shanghai 200433, China

Supported by the Tenth-Five-Year Plan's Military Medical Scientific
Foundation of PLA, No. 01Z059

Correspondence to: Dr. Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology,
Changhai Hospital, Second Military Medical University, 174 Changhai
Road, Shanghai 200433, China. yixb@sh163.net

Received: 2002-11-05 Accepted: 2002-11-25

Abstract

AIM: To explore the protective effects of endothelin-1 antibody (ET-1Ab) on acute gastric mucosa lesions induced by stress in rats.

METHODS: Stress ulcer induced by cold-restraint-stress (CRS) was used as model in this study, different dose ET-1Ab were administered by left femoral vein prior to stress so as to observe the effects of the drug on ET-1 levels in plasma and gastric mucosa, gastric mucosa blood flow (GMBF) and ulcer index (UI) of CRS rats.

RESULTS: (1) Compared with the normal control group, ET-1 levels of plasma and gastric mucosa and UI were increased significantly in the stress groups (116.2 ± 24.7 mv and 125.1 ± 24.2 mv vs 49.1 ± 9.7 mv, 113.8 ± 29.3 mv and 122.9 ± 19.6 mv vs 52.3 ± 10.3 mv, 28.6 ± 1.8 mv and 51.2 ± 5.9 mv vs 0, $P < 0.01$), while GMBF were decreased markedly in stress groups (227.8 ± 13.5 mv and 150.8 ± 11.5 mv vs 405.8 ± 23.3 mv, $P < 0.01$). There was significantly positive correlation between ET-1 and UI ($r = 0.96$, $P < 0.01$), and significantly negative correlation between ET-1 and GMBF ($r = -0.91$, $P < 0.01$). (2) However, compared with the single-stress groups, ET-1 levels of plasma and gastric mucosa and UI were decreased significantly in ET-1Ab-stress groups (69.2 ± 7.3 mv vs 116.2 ± 24.7 mv, 80.6 ± 12.3 mv vs 125.1 ± 24.2 mv, 58.5 ± 6.3 mv vs 113.8 ± 29.3 mv, 68.9 ± 9.6 mv vs 122.9 ± 19.6 mv, 13.2 ± 2.1 mv vs 28.6 ± 1.8 mv, 25.8 ± 3.6 mv vs

51.2 ± 5.93 mv, $P < 0.01$), GMBF were increased dramatically (329.8 ± 16.3 mv vs 227.8 ± 13.5 mv, 251.9 ± 11.3 mv vs 150.8 ± 11.5 mv, $P < 0.01$), ET-1Ab can dose-dependently reduce levels of the ET-1 and UI, and improve GMBF significantly in cold-restraint-stress.

CONCLUSION: In the course of CRS-induced ulcers, endogenous ET-1 levels of plasma and gastric mucosa were increased significantly, and there were close relationship between ET-1 levels and UI. The increased ET-1 may involve in the pathogenesis of CRS-induced ulcers in rats by its vasoconstriction and marked reduction of GMBF. ET-1Ab can dose-dependently attenuate the degree of gastric mucosa lesions induced by CRS significantly. So it may have therapeutic effect for SU.

Duan YM, Li ZS, Zhan XB, Gong YF, Xu GM. Protective effects of endothelin-1 antibody on stress induced lesion of gastric mucosa in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):990-993

摘要

目的: 探讨内皮素 - 1 抗体(ET-1Ab)对应激性胃黏膜损伤(SU)的保护作用。

方法: 建立 SD 大鼠冷束缚应激性(CRS)胃溃疡模型, 观察静脉应用 ET-1 Ab 对冷束缚应激大鼠血浆、胃黏膜组织 ET-1 含量、胃黏膜血流量(GMBF)及胃黏膜损伤指数(UI)等变化的影响。

结果: (1)与正常对照组相比, 各应激组血浆胃黏膜 ET-1 水平和 UI 明显升高(116.2 ± 4.7 mv and 125.1 ± 4.2 mv vs 49.1 ± 9.7 mv, 113.8 ± 9.3 mv and 122.9 ± 19.6 mv vs 52.3 ± 10.3 mv, 28.6 ± 1.85 mv and 51.2 ± 5.93 mv vs 0, $P < 0.01$), GMBF 明显下降(227.8 ± 13.5 mv and 150.8 ± 11.5 mv vs 405.8 ± 23.3 mv, $P < 0.01$); ET-1 水平与 UI 呈显著正相关($r = 0.96$, $P < 0.01$), 与 GMBF 呈显著负相关($r = -0.91$, $P < 0.01$)。 (2)与单纯应激组相比, ET-1Ab 应激组 ET-1 水平和 UI 明显下降(69.2 ± 7.3 mv vs 116.2 ± 24.7 mv, 80.6 ± 12.3 mv vs 125.1 ± 24.2 mv, 58.5 ± 6.3 mv vs 113.8 ± 29.3 mv, 68.9 ± 9.6 mv vs 122.9 ± 19.6 mv, 13.2 ± 2.05 mv vs 28.6 ± 1.85 mv, 25.8 ± 3.62 mv vs 51.2 ± 5.93 mv, $P < 0.01$), GMBF 明显回升(329.8 ± 16.3 mv vs 227.8 ± 13.5 mv, 251.9 ± 11.3 mv vs 150.8 ± 11.5 mv, $P < 0.01$), 且 ET-1Ab 可呈剂量依赖性地显著降低 ET-1 水平、增加 GMBF 和降低 UI。

结论: 在冷束缚应激诱发大鼠SU的过程中, 血浆胃黏膜组织ET-1水平显著升高, 并可能通过其缩血管效应, 引起GMBF显著下降, 从而导致急性胃黏膜损伤. ET-1Ab可呈剂量依赖性地显著减轻应激性胃黏膜损伤程度, 对SU具有一定的防治作用.

段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭. 内皮素-1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2003;11(7):990-993

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/990.asp>

0 引言

应激性溃疡(stress ulcer, SU), 又称急性胃黏膜损伤, 是临床危重疾病的常见而严重的并发症, 具有较高的发病率和死亡率, 其发生机制尚不清楚, 防治效果也不佳. 近年国外有研究报道内源性强缩血管生物活性多肽内皮素(endothelin ET)-1^[1]与急性胃黏膜损伤关系密切^[2-6]. 由于ET-1是通过与其特异性受体结合后发挥生物学效应的^[1], 因此, 如用ET-1生物效应拮抗剂减少或抑制ET-1与ETR的结合, 就有可能削弱ET-1生物学效应, 从而减轻与ET-1升高相关的急性胃黏膜损伤程度, 目前国外这方面的研究还较少, 而国内尚无这方面的研究, 为此, 本研究应用内皮素-1抗体(endothelin-1 antibody ET-1Ab)来观察其对应激状态下内源性ET-1、GMBF及UI的影响, 从而为临床防治SU探索新的方法.

1 材料和方法

1.1 材料 ET-1放免试剂盒及ET-1Ab(北京东亚免疫技术研究所). LDF-III型微机化激光多普勒血流仪(天津南开大学电子仪器厂). SD♂大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司).

1.2 方法

1.2.1 动物模型与分组 采用SD大鼠冷束缚应激性(CRS)胃溃疡为模型, 将SD♂健康大鼠禁食24 h, 可自由饮水, 活动不受限, 实验前1 h禁水, 称重, 乙醚轻度麻醉, 束缚四肢于自制木板上后, 待其清醒后, 置于4±1℃冷室内, 经过3 h后胃部即可出现点线状出血或直径1-2 mm表浅性圆形溃疡. 取SD♂健康大鼠36只, 体重200±20 g, 随机分为单纯应激组(12只)、1 mL ET-1Ab 应激组(12只)、2 mL ET-1Ab 应激组(12只), 每组又分为应激1 h、3 h两个时相, 每时相6只大鼠. 每次实验前预先用含1:12 500 IU 肝素钠带4号半针头的输液管行左股静脉保留插管, 于冷束缚应激开始后自左股静脉以0.5 mL·Kg⁻¹·min⁻¹的速度恒速补充生理盐水10 min, ET-1Ab 应激组在补充的盐水中按1 mL·kg⁻¹或2 mL·kg⁻¹加入滴度为1:1 000的ET-1Ab, 而单纯应激组只补充生理盐水, 另取6只同样大鼠进行同样操作但不应激、不补液, 作为正常对照组. 分别于应激1 h、3 h两时相点检测GMBF、UI及ET-1等指标.

1.2.2 ET-1 含量放免测定^[7] (a)取颈静脉血2 mL注入含10% EDTA-Na₂及抑肽酶的试管中混匀, 4℃, 3 000 rpm×10 min, 取上清; (b)取新鲜受损胃黏膜组织, 真空冷冻干燥、称重匀浆, 4℃, 3000 rpm×15 min, 取上清. 按试剂盒步骤测ET-1含量.

1.2.3 GMBF的测定^[8] SD大鼠用20%乌拉坦(5 mL·kg⁻¹)腹腔内注射麻醉, 用恒温水浴装置使胃在整个测量过程中浸浴在37℃生理平衡液内, 于剑突下正中切开腹前壁, 轻轻分离暴露胃体并固定腺胃, 于腺胃前壁近大弯侧少血管区作一长度约0.5 cm的横行切口, 于切开胃后5-20 min内经此切口插入血流计探头, 轻轻接触胃黏膜, 并与胃黏膜表面保持垂直, 待血流稳定后, 在腺胃窦大小弯、胃体大小弯取四点测定GMBF, 取其平均值, 结果以激光普勒信号电压值(mV)表示血流量的相对数值.

1.2.4 按Guth标准评定UI 斑点糜烂为1分; 糜烂长度<1 mm为2分; 1-2 mm为3分; 2-3 mm为4分; >3 mm为5分.

统计学处理 所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用方差分析, 两样本间均数比较用t检验.

2 结果

2.1 ET-1Ab对SU时血浆、胃黏膜ET-1的影响 与单纯应激组相比, 各ET-1Ab 应激组血浆、胃黏膜组织ET-1水平随着ET-1Ab使用剂量的增加呈剂量依赖性地显著下降(P<0.01). 1 mL ET-1Ab+ 应激1 h组血浆、胃黏膜ET-1水平分别下降了40.5%和48.6%, 2 mL ET-1Ab+ 应激1 h组分别下降了53.7%和56.2%; 1 mL ET-1Ab+ 应激3 h组血浆胃黏膜ET-1水平分别下降了27.5%和43.9%, 2 mL ET-1Ab+ 应激3 h组分别下降了49.3%和55.2%. ET-1水平与UI呈显著正相关(r=0.96, P<0.01, 见表1).

2.2 ET-1Ab对SU时胃黏膜GMBF的影响 与单纯应激组相比, 各ET-1Ab 应激组GMBF明显回升(P<0.01), 而且随着ET-1Ab使用剂量的增加, GMBF的回升幅度也相应增大. 1 mL ET-1Ab+ 应激1 h组GMBF回升了25.2%, 达到正常对照的81.3%, 2 mL ET-1Ab+ 应激1 h组GMBF回升了38.3%, 达到正常对照的93.5%; 1 mL ET-1Ab+ 应激3 h组GMBF回升了24.9%, 达到正常对照的62.1%, 2 mL ET-1Ab+ 应激3 h组GMBF回升了46.2%, 达到正常对照的83.6%. ET-1水平与GMBF呈显著负相关(r=-0.91, P<0.01, 见表1).

2.3 ET-1Ab对SU时胃黏膜UI的影响 与单纯应激组相比, ET-1Ab 应激组UI随着ET-1Ab使用剂量的增加呈剂量依赖性地显著减小(P<0.01). 1 mL ET-1Ab+ 应激1 h组UI下降了53.8%, 2 mL ET-1Ab+ 应激1 h组UI下降了81.8%; 1 mL ET-1Ab+ 应激3 h组UI下降了49.6%, 2 mL ET-1Ab+ 应激3 h组UI下降了79.3%. UI与ET-1水平呈显著正相关(r=0.96, P<0.01, 见表1).

表1 ET-1Ab对CRS大鼠血浆、胃黏膜ET-1、GMBF及UI的影响

组别	血浆ET-1 (mv)	胃黏膜组ET-1 (ng/g.tissue)	GMBF (mV)	UI
正常对照组	49.08±9.73	52.37±10.35	405.8±23.36	0
单纯应激1h组	116.2±24.69 ^a	113.8±29.28 ^a	227.8±13.53 ^a	28.6±1.85 ^a
1 ml ET-1Ab+应激1h组	69.18±7.32 ^b	58.52±6.38 ^b	329.8±16.32 ^b	1 3.2±2.05 ^b
2 ml ET-1Ab+应激1h组	52.56±13.75 ^b	49.81±6.18 ^b	383.2±13.98 ^b	5.20±1.48 ^b
单纯应激3h组	125.1±24.18 ^a	122.9±19.64 ^a	150.8±11.53 ^a	51.2±5.93 ^a
1 ml ET-1Ab+应激3h组	80.65±12.26 ^b	68.91±9.55 ^b	251.9±11.38 ^b	25.8±3.62 ^b
2 ml ET-1Ab+应激3h组	63.53±8.54 ^b	55.09±10.92 ^b	339.2±15.31 ^b	10.6±2.07 ^b

^aP < 0.01 vs 正常组, ^bP < 0.01 vs 单纯应激组.

3 讨论

内皮素(ET)-1是近年发现的一种具有强大缩血管作用的内源性生物活性多肽,全身多种组织器官都有ET-1的合成分泌及其受体的分布^[1].生理条件下,他在调节血管张力和局部组织微循环灌流中起着非常重要的作用^[9-12].而在许多病理情况下,多种病理应激因素可刺激机体大量合成释放ET-1,参与机体的多种病理生理过程^[13-20].

近年有研究提示ET-1与应激性溃疡关系密切,可能在应激性胃黏膜损伤中起着重要的致病作用^[21-26].ET-1抗血清是用特异的大鼠ET-1抗原静脉注入兔体内致敏,获取的特异性兔抗鼠ET-1免疫血清,他可与体内ET-1结合形成抗原-抗体复合物,显著降低血浆与组织ET-1水平,减少ET-1与其特异性受体ETR结合的数量,起到拮抗ET-1病理效应的作用.因此,我们推测若能应用特异性ET-1抗血清预处理冷束缚应激大鼠中和过多的ET-1以拮抗其生物学效应,就有可能减轻与ET-1相关的应激胃黏膜组织损伤.

本研究观察到在大鼠冷束缚应激开始后各时相,单纯应激组大鼠血浆、胃黏膜组织ET-1水平均较正常对照组明显升高且随着应激时间的延长而升高.与此同时伴有GMBF的不断降低和UI不断增加.而预用ET-1特异性抗血清处理的应激组大鼠与单纯应激组相比较,其血浆和胃黏膜组织ET-1水平则显著降低,且伴随着GMBF显著回升与胃黏膜损伤指数UI明显下降.相关性分析显示ET-1水平与UI呈显著正相关,与GMBF呈显著负相关,这些不但表明ET-1抗血清可显著降低ET-1水平,改善胃黏膜组织血液灌流(GMBF)与减轻胃黏膜组织损伤程度,而且提示显著降低GMBF可能是ET-1诱发应激性胃黏膜损伤的重要机制之一.

国外一些学者在研究乙醇及缺血-再灌注等因素诱发胃黏膜损伤时,发现ET-1特异性抗血清也有类似的作用.Kitajima et al^[27]报道缺血-再灌注诱发胃黏膜损伤时,血浆胃黏膜组织ET-1浓度明显升高.而预用ET-1单克隆抗体对抗中和ET-1,则可预防其血液动力学紊乱及显著减轻胃黏膜组织损伤程度与损伤总面

积.Szabo et al^[28]研究报道向大鼠胃灌注乙醇后,在发生胃黏膜出血性损伤之前,会快速引起ET-1随时间依赖性向体循环释放及GMBF的不断下降,随着所用预处理的ET-1抗体剂量的增大呈剂量依赖性地减轻黏膜损伤与GMBF下降的程度,表明ET-1可能参与了胃黏膜组织损伤的病理生理过程以及GMBF下降可能是其重要的作用机制之一,而特异性ET-1抗体对其血液动力学效应与损伤效应有明显的拮抗作用.

另有研究表明ET-1还可通过收缩血管导致引起组织缺血、缺氧,激发PKC,抑制K⁺-ATP通道,促进体内脂质过氧化物反应,引起氧自由基及MDA大量产生,二者对组织细胞有较强的攻击损伤作用,给予ET-1Ab特异性抗血清可明显减少氧自由基生成和显著降低组织MDA的含量,减轻损伤^[29-32].

总之,本研究提示内源性ET-1参与了应激性溃疡的病理生理过程,可能是胃黏膜组织损伤的重要致病因子,而特异性ET-1抗体可有效地减轻胃黏膜组织损伤,起到保护胃黏膜组织的作用.当然,目前制备的ET-1抗体还是多克隆抗体,其作用时间较短、效果也不甚满意,相信随着研究的深入和技术的提高,有望研究出效果满意、高度特异的ET-1单克隆抗体,为防治SU提供新的方法.

4 参考文献

- 1 Markewitz BA, Kohan DE, Michael JR. Endothelin-1 synthesis, receptors, and signal transduction in alveolar epithelium: evidence for an autocrine role. *Am J Physiol* 1995;268:L192-200
- 2 Ohta M, Yamaguchi S, Gotoh N, Tomikawa M. Pathogenesis of portal hypertensive gastropathy: a clinical and experimental review. *Surgery* 2002;131(Suppl 1):S165-170
- 3 Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Involvement of endothelin-1 in up-regulation of gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258:17-20
- 4 Duggan AE, Stack W, Hull M, Filipowicz B, Knifton A, Crome R, Weber C, Bishop A, Polak J, Hawkey CJ. Protection against aspirin-induced human gastric mucosal injury by bosentan, a new endothelin-1 receptor antagonist. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:631-635
- 5 Migoh S, Hashizume M, Tsugawa K, Tanoue K, Sugimachi K. Role of endothelin-1 in congestive gastropathy in portal hypertensive rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:142-147
- 6 Mori S, Kaneko H, Mitsuma T, Hayakawa T, Yamaguchi C, Uruma M. Implications of gastric topical bioactive peptides in ammonia-induced acute gastric mucosal lesions in rats. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:386-393
- 7 Valdivielso JM, Rivas-Cabaner L, Morales AI, Arevalo M, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F. Increased renal glomerular endothelin-1 release in gentamicin-induced nephrotoxicity. *Int J Exp Pathol* 1999;80:265-270
- 8 Adachi K, Suetsugu H, Moriyama N, Kazumori H, Kawamura A, Fujishiro H, Sato H, Okuyama T, Ishihara S, Watanabe M, Kinoshita Y. Influence of *Helicobacter pylori* infection and cetraxate on gastric mucosal blood flow during healing of endoscopic mucosal resection-induced ulcers. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1211-1216
- 9 Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999;61:391-415
- 10 Goligorsky MS, Budzikowski AS, Tsukahara H, Noiri E. Cooperation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. *Clin Exp Pharmacol*

- Physiol* 1999;26:269-271
- 11 Tsuji S, Kawano S, Tsujii M, Michida T, Masuda E, Gunawan ES, Hori M. Mucosal microcirculation and angiogenesis in gastrointestinal tract. *Nippon Rinsho* 1998;56:2247-2252
 - 12 Goldie RG. Endothelins in health and disease: an overview. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:145-148
 - 13 Rubino A, Loesch A, Burnstock G. Nitric oxide and endothelin-1 in coronary and pulmonary circulation. *Int Rev Cytol* 1999;189:59-93
 - 14 Oda M, Han JY, Nakamura M. Endothelial cell dysfunction in microvasculature: relevance to disease processes. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000;23:199-211
 - 15 Goldie RG, Fernandes LB. A possible mediator role for endothelin-1 in respiratory disease. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000;55:162-167
 - 16 Goldie RG, Henry PJ. Endothelins and asthma. *Life Sci* 1999;65:1-15
 - 17 Cannan CR, Mathew V, Lerman A. New insight into coronary endothelial dysfunction: role of endothelin. *J Lab Clin Med* 1998;131:300-305
 - 18 Ruwhof C, van der Loarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 2000;47:23-37
 - 19 Rohmeiss P, Birck R, Braun C, Kirchengast M, van der Woude F. Targets for endothelin in the diseased kidney: clues for therapeutic intervention. *Exp Nephrol* 1999;7:1-10
 - 20 Kirchengast M, Munter K. Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in cardio-vascular remodeling. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;221:312-325
 - 21 Sun Y, Xu GS, Liu WP, Xu NG. The role of NO/ET and the effect of electro acupuncture on injured gastric mucosa in rats. *Shengli Xuebao* 1999;51:206-210
 - 22 Kawano S, Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):D1-D6
 - 23 Slomiany BL, Slomiany A. Induction of endothelin-converting enzyme-1 in gastric mucosal injury by idomethacin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:377-381
 - 24 Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Up-regulation of endothelin-converting enzyme-1 in gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:801-805
 - 25 Said SA, El-Mowafy AM. Role of endogenous endothelin-1 in stress-induced gastric mucosal damage and acid secretion in rats. *Regul Pept* 1998;73:43-50
 - 26 Slomiany BL, Slomiany A. Role of endothelin-converting enzyme-1 in the suppression of constitutive nitric oxide synthase in rat gastric mucosal injury by indomethacin. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1131-1136
 - 27 Kitajima T, Tani K, Yamaguchi T, Kubota Y, Okuhira M, Mizuno T, Inoue K. Role of endogenous endothelin in gastric mucosal injury induced by hemorrhagic shock in rats. *Digestion* 1995;56:111-116
 - 28 Szabo S, Vincze A, Sandor Z, Jadus M, Gombos Z, Pedram A, Levin E, Hagar J, Iaquinto G. Vascular approach to gastroduodenal ulceration: new studies with endothelins and VEGF. *Dig Dis Sci* 1998;43(Suppl 9):40S-45S
 - 29 Armstead WM. Superoxide generation links protein kinase C activation to impaired ATP-sensitive K⁺ channel function after brain injury. *Stroke* 1999;30:153-159
 - 30 Liu B, Xiao N, Chen H, Zhou J. Effect of endothelin-1 on hepatic damage induced by endotoxin. *Chin J Traumatol* 2000;3:234-237
 - 31 Lahera V, Navarro-Cid J, Maeso R, Cachafeiro V. Participation of endothelium-derived vasoconstrictor factors in arterial hypertension. *Rev Esp Cardiol* 1999;52(Suppl 3):4-11
 - 32 Lazaratos S, Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Goto K, Nakahara A. Oxygen radicals mediate the final exacerbation of endothelin-1-induced gastric ulcer in rat. *Eur J Pharmacol* 2001;413:121-129

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务会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801).资助期限 2 年,2003 - 2004 年,资助强度每年 8 万元。

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

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用

李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭

李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科, 中国人民解放军消化病中心重点实验室 上海市 200433

李兆申, 男, 1956-10-18 生, 河北人, 汉族, 硕士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 消化内科主任, 中华消化内镜学会委员兼秘书, 上海市消化内镜学会副主任委员, 全军消化专业组副主任委员. 主要从事胰腺疾病和应激性溃疡基础与临床研究, 发表论文 100 篇.

“十五”全军医药科研基金重点项目, No.01Z059

项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科. zhsl@81890.net

电话: 021-25070552

收稿日期: 2002-08-02 接受日期: 2002-08-16

Role of the ITF in repairing of stress-induced gastric lesions

Zhao-Shen Li, Shi-Nan Nie, Xian-Bao Zhan, Yan-Fang Gong, Zhen-Xin Tu, Guo-Min Xu

Zhao-Shen Li, Shi-Nan Nie, Xian-Bao Zhan, Yan-Fang Gong, Zhen-Xin Tu, Guo-Min Xu, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Center of Gastroenterology and Key Laboratory of PLA, Shanghai, 200433, China

Supported by the Tenth-Five-Year Plan's Military Medical Scientific Foundation of PLA, No. 01Z059

Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Shanghai, 200433, China. zhsl@81890.net

Received: 2002-08-02 Accepted: 2002-08-16

Abstract

AIM: To determine the changes of ITF (intestinal trefoil peptides) expression in gastric mucosal and the effect on ulcer healing of ITF to WRS in rats.

METHODS: Wistar rats were exposed to single or multiple WRS for 4 h every other day for up to 6 days. Gastric mucosal blood flow (GMBF) was measured by LDF-3 Flow meter and the extent of gastric mucosal lesions were evaluated grossly and histologically. Expression of ITF mRNA was determined by RT-PCR. Immunohistochemistry was used to further detect the expression of ITF.

RESULTS: Single time of WRS produced numerous gastric mucosal erosions, but the number of these lesions gradually declined and GMBF restored at 2, 4, 8 h after stress; the area of gastric mucosal lesion was reduced by 64.9 % and GMBF was increased by 89.8 % at 8 h, the healing of stress-induced ulcerations was accompanied by increased expression of ITF (0.022 ± 0.001 vs 0.177 ± 0.010 $P < 0.01$), the results were demonstrated further by immunohistochemistry (0.134 ± 0.001 vs 0.253 ± 0.01 , $P < 0.01$). With repeated WRS, the adaptation to this WRS developed, the area of gastric mucosal lesions was reduced by 22.0 % after four consecutive WRS, this adaptation to WRS was accompanied by increased GMBF (94.2 %) and active cell proliferation in the neck region of gastric glands and by increased expression of ITF (0.040 ± 0.001 vs 0.372 ± 0.010

$P < 0.01$), the result were demonstrated further by immunohistochemistry (0.134 ± 0.001 vs 0.354 ± 0.070 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: ITF may participate in the early phase of epithelial repair known as restitution, but also may play an important role in the subsequent, protracted phase of glandular renewal.

Li ZS, Nie SN, Zhan XB, Gong YF, Tu ZX, Xu GM. Role of the ITF in repairing of stress-induced gastric lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):994-996

摘要

目的: 研究肠三叶因子(ITF, intestinal trefoil factor, 为三叶肽家族一员)在水浸束缚应激(WRS)大鼠胃黏膜基因表达的变化, 探讨其在应激胃黏膜损伤中的修复作用。

方法: 采用单次及单次和重复水浸束缚应激制作模型, 动态监测胃黏膜血流量(GMBF), 大体及光镜下观察黏膜损伤程度(UI)及组织学变化, 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检测ITF基因表达变化, 免疫组化染色进一步证实ITF表达。

结果: 单次应激造成胃黏膜广泛损伤, 但损伤指数在 2、4、8 h 逐渐减小, 至 8 h 降为 64.9 %, GMBF 逐渐恢复, 至 8 h 上升为正常的 89.8 %, ITF 基因表达增强(0.022 ± 0.001 vs 0.177 ± 0.010 $P < 0.01$), 免疫组化染色计分为(0.134 ± 0.001 vs 0.253 ± 0.01 , $P < 0.01$); 单次和重复应激后胃黏膜产生适应性, 胃黏膜血流量上升, 损伤逐渐减轻, 4 次应激后, 损伤指数降低为单次应激的 22.0 %, 胃黏膜血流量上升为正常的 94.2 %, 并且胃腺区细胞增生, ITF 基因表达增强(0.040 ± 0.001 vs 0.372 ± 0.01 , $P < 0.01$), 免疫组织化学染色计分为(0.134 ± 0.001 vs 0.354 ± 0.07 , $P < 0.01$)。

结论: ITF 不仅可能参与胃黏膜早期重建(上皮移行), 还有可能参与胃黏膜慢修复反应(细胞增生)。

李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭. 肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):994-996

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/994.asp>

0 引言

胃黏膜损伤主要是通过损伤后早期重建(上皮移行)以及细胞增生而修复^[1-3]. ITF (intestinal trefoil peptides) 为三叶肽家族一员, 是一类较新的、对胃黏膜有保护作用的因子, 其对胃黏膜保护作用的机制可能在于增强受损黏膜周围完好上皮细胞向损伤黏膜表面迁移覆盖或与黏液中的糖蛋白相互作用, 加强黏液凝胶层, 抵抗黏膜

表层有害物质等^[4-9]. 目前尚无有关ITF与应激胃黏膜损伤修复关系进行研究的报道, 我们研究WRS大鼠胃黏膜ITF基因表达变化, 以探讨其对胃黏膜损伤修复的重要作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ITF抗体购自意大利Asgiraud公司; RT-PCR相关试剂购自上海博彩生物有限公司采用单次水浸束缚应激大鼠胃黏膜损伤模型: 健康♂Wistar大鼠30只, 体重约200 g. 随机分正常对照组(6只)和实验组(24只). 实验组又随机按0, 2, 4, 8 h 4个时间点分为4组(1-4, $n=6$), 应激4 h后于0, 2, 4, 8 h分别测定相关指标及取材. 采用单次和重复水浸束缚应激大鼠胃黏膜损伤模型: 健康♂Wistar大鼠30只, 体重200-220 g, 实验前1 d禁食, 自由饮水, 活动不受限. 实验前1 h禁水. 随机分正常对照组(6只)和实验组(24只). 实验组大鼠又随机分为4组(I-IV, $n=6$), 采用重复水浸束缚应激(WRS)制作模型^[10], I组, 1次应激, 大鼠禁食24 h后, 乙醚麻醉束缚于应激板上, 清醒后置于温度为20℃水中, 水面平胸骨剑突水平, 4 h后取出, 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 于剑突下腹正中中线切开腹腔并游离胃, 沿胃大弯剪开胃腔并使胃黏膜展开, 生理盐水漂洗3遍后分别进行GMBF测定、UI的判定及取材; II组, 2次应激, 大鼠经1次应激后, 解除应激, 恢复正常饮食、饮水至第2天00:10时, 禁食24 h至第3天00:10时, 第2次应激, 4 h后取出, 20 g/l戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 于剑突下腹正中中线切开腹腔并游离胃, 沿胃大弯剪开胃腔并使胃黏膜展开, 生理盐水漂洗3遍后分别进行GMBF测定、UI的判定及取材; III组和IV组, 分别按上述程序进行第3次和第4次应激.

1.2 方法 LDH-3激光多谱勒血流仪开机预热30 min, 白色背景调零, 固定胃部, 在无血管区作一0.5 cm的横行切口, 插入血流计探头, 轻触黏膜面, 并为之保持垂直, 待血流稳定后, 在胃窦、胃体及大小弯取4点测定, 每点1.5 min, 取均值. 以多谱勒血流仪(mv)表示GMBF的相对值. UI的判定: 按Guth^[11]标准积分: 点状出血为1分; 线状出血, 长度<1 mm为2分, 1-2 mm为3分, 2-4 mm为4分, >4 mm为5分, 宽度>1 mm时分值×2. 在胃黏膜损伤明显处取0.5×1.0 mm组织块, 置于40 g/l中性缓冲甲醛液中固定24 h, 石蜡包埋, 行4 μm切片, HE染色, 观察黏膜组织学变化. 全胃剖开, 用1 g/l DEPC水反复冲洗胃腔至少3次, 小心剥离胃腺区黏膜, 分别放入冷凝管, 迅速放入液氮保存. 总RNA抽提按TRIzol™方法: 胃黏膜组织50-100 mg, 捣碎→加TRIzol™试剂1 ml→匀浆→氯仿0.2 ml→振荡15 s→离心(12 000 r/min)15 s→取上清液→加异丙醇0.5 mL→离心(12 000 r/min)15 s→70%乙醇洗沉淀→晾干. 取10 μg总RNA进行逆转录, 取1 μl逆转录产

物进行PCR扩增, ITF正义引物序列为:5'-ATGGAG ACCAGAGCCTTCTGGAC-3', 反义序列为:5'-AGAGGTTTGAAGCACCAGGGC-3'^[11], 退火温度为50℃, 扩增长度为221 bp, 同时加入β-actin引物作为内对照进行共同扩增反应. 在1%琼脂糖凝胶中电泳观察PCR产物并用计算机凝胶图像分析系统进行吸光度分析^[12,13]. 免疫组织化学染色: 采用ABC法, 免疫组化染色阳性判定标准: 每只大鼠腺胃标本随机取2张切片, 每张切片分别观察胃腺上部、胃腺颈部及胃腺底部染色情况, 在高倍镜下随机取5个视野经图像处理仪进行定量灰度扫描, 在每个视野内各取10个细胞, 求其阳性信号平均灰度值, 将各值取倒数计分.

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用t检验, 两变量间关系运用直线相关分析.

2 结果

UI 单次应激: 造成胃黏膜广泛损伤, 但损伤指数在2、4、8 h逐渐减小, 至8 h降为正常的64.9%, GMBF逐渐恢复, 至8 h为正常的89.8% (表1); 单次和重复应激: 胃黏膜产生适应性, 胃黏膜血流量上升, 损伤逐渐减轻, 4次应激后, 胃黏膜血流量上升为正常组的94.2%, 损伤指数降低为单次应激的22.0% (表1). 正常大鼠胃黏膜镜下见上皮完整, 腺体排列整齐, 黏膜层结构清楚. 1次应激4 h后显示出血性坏死灶呈火山口状, 几乎达黏膜肌层, 部分表皮细胞受损脱落, 黏膜下层明显充血、水肿. 重复应激后, 火山口状坏死灶明显减少、变浅, 黏膜下层充血水肿减轻, 4次应激后可见肉芽组织形成, 黏膜细胞呈增生状态, 黏膜层增厚, 腺颈区延长, 可见新生细胞形成.

表1 单次和重复应激后GMBF, UI, ITF染色强度及ITFmRNA表达变化 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

应激	组别	GMBF	UI	Mean score	ITF/β-actin
单次	对照组	424.70±7.72	0.00	0.003±0.001	0.004±0.0002
	应激组				
	1	274.66±10.0 ^b	45.32±2.41	0.134±0.001 ^b	0.022±0.01 ^b
	2	271.25±10.57 ^b	38.62±1.53 ^d	0.259±0.01 ^{bd}	0.287±0.008 ^{bd}
	3	397.21±10.81 ^{bd}	31.18±1.28 ^d	0.136±0.04 ^{bd}	0.112±0.009 ^{bd}
重复	对照组	484.01±10.97	0.00	0.003±0.001	0.004±0.0004
	应激组				
	I	321.87±8.85 ^b	47.23±1.20	0.134±0.001 ^b	0.040±0.001 ^b
	II	418.35±7.94 ^{bd}	30.54±1.12 ^d	0.194±0.05 ^{bd}	0.108±0.009 ^{bd}
	III	446.09±10.98 ^{bd}	20.75±1.54 ^d	0.281±0.015 ^{bd}	0.265±0.009 ^{bd}
IV	455.95±11.81 ^{bd}	10.39±1.18 ^d	0.354±0.07 ^{bd}	0.372±0.01 ^{bd}	

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 对照组; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 1组或I组.

2.1 免疫组织化学染色 正常时:ITF主要集中在胃腺颈

部微弱表达; 单次应激后在 0、2、4、8 h 增强, 2 h 达高峰, 免疫组化染色计分为 0.134 ± 0.001 vs 0.253 ± 0.010 $P < 0.01$ (表 1); 单次和重复应激后: ITF 在胃腺颈部黏膜增生带表达增强, 单次应激与 4 次应激后免疫组织化学染色强度计分为 0.134 ± 0.001 vs 0.354 ± 0.070 $P < 0.01$ (表 1).

2.2 RT-PCR 检测 ITF mRNA 表达 单次应激后在 0、2、4、8 h 基因表达逐渐增强 $P < 0.01$, (表 1); 单次和重复应激后, ITF 基因表达增强, 单次应激与 4 次应激后为 $(0.040 \pm 0.001$ vs 0.372 ± 0.010 $P < 0.01)$ 表 1 图 1, 2.

单次应激: GMBF 与 UI 成负相关 ($r = -0.901$, $P < 0.01$). 单次和重复应激: ITF 与 UI 成负相关 ($r = -0.965$, $P < 0.01$), GMBF 与 UI 成负相关 ($r = -0.953$, $P < 0.01$), ITF 与 GMBF 成正相关 ($r = 0.854$, $P < 0.005$).

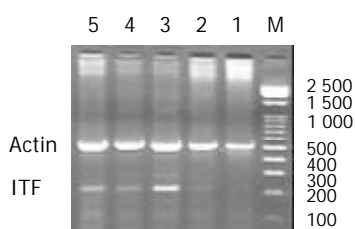


图 1 单次应激后不同时间点 ITF mRNA 表达. M DNAMarker(bp); 1 对照组; 2 0 h 组; 3 2 h 组; 4 4 h 组; 5 8 h 组.

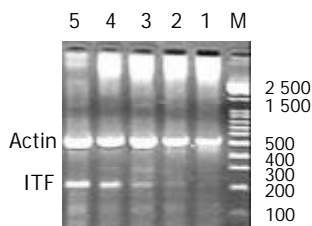


图 2 重复应激后不同时间点 ITF mRNA 表达. M DNAMarker(bp) 1 对照组; 2 I 组; 3 II 组; 4 III 组; 5 IV 组.

3 讨论

本结果提示, 正常时几乎没有表达, 但当应激后大鼠胃黏膜即有 ITF 表达, 于 2 h 达高峰. 大量证据表明, 三叶肽家族也在维持胃肠道黏膜的完整性及在加速损伤黏膜修复的过程中起重要作用. 在急性胃黏膜损伤后, 黏膜屏障被破坏, 肌体需要快速修复来保护胃黏膜, 使其免于被消化酶和胃酸消化. 这种修复在急性损伤后几分钟就开始了. 早期修复的关键过程就是细胞迁移, 以重建上皮的完整性和重组胃黏膜的完整性. 本实验中, 水浸束缚应激胃黏膜损伤中, ITF 在胃黏膜中呈时间依赖性表达. 在应激期 ITF 有过表达, 随后进一步增加, 2 h 达高峰. 短时间内, ITF 基因增强先于 EGF 和 TGF 表达, 表明其也许介入早期愈合过程并且可能激发其他生长因子的表达. 在应激胃黏膜损伤后立即有 ITF 过表达并刺激细胞移行, 这点表明 ITF 可以看作黏膜损伤的快速反应肽, 在黏膜修复的早期阶段上调表达, 可能调节急性胃黏膜损伤早期愈合即重建.

在本研究中, 单次应激造成黏膜的最大损伤, 重复应激后, 损伤逐渐减轻, GMBF 逐渐改善, 并且

在此过程中伴有黏膜细胞增生及 ITF、TGF α 基因表达增强, 说明此二者参与了适应性细胞保护. 在单次和重复水浸束缚应激大鼠胃黏膜产生适应性保护过程中, ITF 基因表达逐渐增强, 并且 ITF、基因表达增强在胃黏膜细胞增生之前, 这说明 ITF 参与了细胞增生反应. 目前, ITF 在适应性细胞保护中作用机制仍未完全阐明. ITF 为三叶肽家族一员, 其结构是 6 个半胱氨酸残基形成 3 个链内二硫桥, 似 3 片叶子一样结构, 又称 P 结构域, 现有大量证据表明三叶肽在胃黏膜的保护和修复中发挥重要作用. 当胃肠道发生溃疡时, 三叶肽表达增多, 同时在慢性溃疡附近区域存在一个特有解剖结构: 溃疡相关细胞系(UACL), 其伴有包括 ITF 在内的 3 种三叶肽等的表达. ITF 通过调节细胞增生而使胃黏膜具有防御和修复功能, 其对不同细胞系具有促有丝分裂作用. 由此推测, ITF 可能参与胃黏膜细胞有丝分裂, 使细胞增生, 从而修复胃黏膜.

总之, ITF 不仅可能参与胃黏膜早期重建(上皮移行), 还有可能参与胃黏膜慢修复反应(细胞增生).

4 参考文献

- Podolsky DK. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 1):G495-499
- Wright NA. Aspects of the biology of regeneration and repair in the human gastrointestinal tract. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998;353:925-933
- Podolsky DK. Healing the epithelium: solving the problem from two sides. *J Gastroenterol* 1997;32:122-126
- 聂时南, 李兆申, 许国铭, 屠振兴. 三叶肽与胃黏膜保护研究进展. *中华消化杂志* 2002;22:108-110
- Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, Wang TC. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* 2002;109:193-204
- Ulaganathan M, Familiari M, Yeomans ND, Giraud AS, Cook GA. Spatio-temporal expression of trefoil peptide following severe gastric ulceration in the rat implicates it in late-stage repair processes. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:506-512
- Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulosom R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000;47:792-800
- McKenzie C, Thim L, Parsons ME. Topical and intravenous administration of trefoil factors protect the gastric mucosa from ethanol-induced injury in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1033-1040
- Cook GA, Thim L, Yeomans ND, Giraud AS. Oral human spasmolytic polypeptide protects against aspirin-induced gastric injury in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:363-370
- Nie S, Li Z, Zhan X, Tu Z, Xu G, Gong Y, Man X. Role of the pS (2) in gastric mucosa adaptive cytoprotection from stress. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:172-175
- 聂时南, 李兆申, 湛先保, 许国铭, 屠振兴, 龚燕芳, 满晓燕. 乳癌相关肽及肠三叶因子在应激胃黏膜损伤早期修复作用. *解放军医学杂志* 2002;27:214
- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Elia G, Wright N, Sliwowski Z, Thim L, Hahn EG. Role of spasmolytic polypeptide in healing of stress-induced gastric lesions in rats. *Regul Pept* 1997;68:71-79
- Konturek PC, Brzozowski T, Pierzchalski P, Kwicien S, Pajdo R, Hahn EG, Konturek SJ. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:767-77

P⁵³ 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用

李庆明, 余 谦, 闵存云

李庆明, 余谦, 闵存云, 广州市中山大学中西医结合研究所
广东省广州市 510120
李庆明, 男, 1939-02-21 生, 汉族, 毕业于中山医学院, 教授, 博士生导师, 主要从事
消化系统疾病的临床及实验研究。
项目负责人: 李庆明, 510120, 广东省广州市沿江江西路 107 号, 中山大学中西医
结合研究所. drmincunyun888@yahoo.com.cn
电话: 020-81332460 传真: 020-81332853
收稿日期: 2002-04-17 接受日期: 2002-09-13

Expression of mutant P⁵³ and VEGF in
experimental gastric cancer in rats
and the effect of decoction Weikang-ning

Qing-Ming Li, Qian Yu, Cun-Yun Min

Qing-Ming Li, Qian Yu, Cun-Yun Min, The Institute of Integrated Traditional
Chinese and western medicine of Zhongshan University, Guangzhou
510120, Guangdong Province, China
Correspondence to: Qing-Ming Li, The Institute of Integrated Traditional
Chinese and Western Medicine of Zhongshan University, 107
Yianjiang Xilu, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China.
drmincunyun888@yahoo.com.cn
Received: 2002-04-17 Accepted: 2002-09-13

Abstract

AIM: To study the expression of P53 gene mutation and VEGF in rats with experimental gastric cancer and the preventing effects of decoction Weikang-ning (WKN).

METHODS: Male Wistar rats aged 2-3month (weight 120-140 g) were fed with MNNG to induce gastric adenocarcinoma. Rats were divided into control group, WKN group 1 and 2. The morphology of gastric mucous were observed by light microscope and electric microscope. Expression of mutant P53 and VEGF were studied with immunohistochemistry.

RESULTS: The malignancy phenotype of stomach epithelial cell such as heteromorphism, heteropyknosis and increased nucleus plasma ratio in rats of WKN group were slightly less severe than that in control group, also the expressed mutant P53 protein (3.4905±1.5225) and VEGF (3.519±2.204) in WKN group were decreased ($P < 0.01$) significantly.

CONCLUSION: The development of experimental gastric cancer by WKN in rats is associated with high expression of P53 and VEGF. The decoction WKN suppresses the expression P53 and VEGF and thus has the preventive and therapeutic effects on gastric cancer.

Li QM, Yu Q, Min CY. Expression of mutant P53 and VEGF in experimental gastric cancer in rats and the effect of decoction Weikang-ning. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(7):997-1000

摘要

目的: 了解P53基因突变与VEGF在大鼠实验性胃癌中的表

达及中药胃康宁的防治作用。

方法: Wistar ♂ 大白鼠, 2-3月龄, 体重 120-140 g, 用 MNNG 限期饲养法诱导大鼠发生胃腺癌, 设对照组, 胃康宁 1 组、2 组, 用光镜、电镜观察大鼠胃黏膜细胞形态, 用免疫组化法检测突变型 P53 及 VEGF 表达。

结果: 与对照组比较, 胃康宁组大鼠胃黏膜细胞异形性、核浓染、核浆比增大等恶性表型轻微, 能降低突变型 P53 蛋白表达(3.4905±1.5225), 和 VEGF 表达(3.519±2.204), ($P < 0.001$)。

结论: 以 MNNG 诱导大鼠实验性胃癌的发生与 P53 基因突变及 VEGF 高表达有关, 中药胃康宁具有良好的防治作用, 能显著抑制 P53 蛋白和 VEGF 表达。

李庆明, 余谦, 闵存云. P⁵³ 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):997-1000
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/997.asp>

0 引言

胃癌的发病率和死亡率, 在我国的恶性肿瘤中占第一位, 是严重影响人类生命健康的恶性肿瘤. 在胃癌的发生、发展过程中, 原癌基因的激活与抑癌基因的失活以及一些相关的分子对胃癌生物学行为起着重要的作用. 本文研究了 P53 突变与血管内皮细胞生长因子(VEGF) 在大鼠实验性胃癌中的表达, 及中药胃康宁的防治作用, 为探讨 P53 与 VEGF 在胃癌发生发展过程中的作用及中药胃康宁的防治效果。

1 材料和方法

1.1 材料 链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化酶免疫组化染色试剂盒(加强型)系福州迈新生物技术开发公司产品, 第一抗体来源: Broad Spectrum; 产品编号: Cat. No: Kit-9710/9720/9730. 德国 KONTRON IBAS2.5 版本全自动分析系统, 德国 ZEISS AXIOTRON 研究型显微镜, 物镜×20. 图像输入: 日本 JVCKy-F30B 3-CCD 彩色摄影仪. 实验动物由中山医科大学实验动物中心提供 ♂ Wistar 大白鼠 50 只, 2-3 月龄, 体重 120-140 g, 清洁级。

1.2 方法

1.2.1 大鼠实验性胃癌造模方法 采用甲基硝基亚硝基

胍(MNNG)限期给药饲养法, 予♂健康Wistar大白鼠每日自由饮用浓度为100 μg/ml的MNNG水溶液24 wk, 再予饮用自来水16 wk, 实验时间共计40 wk.

1.2.2 中药胃康宁配制 由党参、半枝莲、五灵脂等组成. 制成每ml含生药1g浓度的制剂, 加防腐剂苯甲酸(0.1 g/100 ml)、4℃冷藏保存, 供大鼠灌胃之用. 功效: 健脾化痰、清热解毒、理气活血、消痰散结.

1.2.3 实验分组及给药方法 (1)对照组20只, MNNG限期给药饲养法. (2)胃康宁1组15只, MNNG限期给药饲养法, 加全程40 wk每日灌用10 g生药/kg体重的胃康宁. (3)胃康宁2组15只, MNNG限期给药饲养法, 加后16 wk每日灌用10 g生药/kg体重的胃康宁.

1.2.4 取材方法 饲养期第40周末处死全部大鼠并取材. 即时另购♂健康Wistar大白鼠2只, 4月龄, 体重200 g左右, 作正常对照. 先予灌注固定, 经左心室穿刺至主动脉, 用生理盐水100 ml快冲血管床, 用含4%多聚甲醛的0.1 mol/L的磷酸缓冲液(PH7.4, 4℃)经升主动脉灌注, 时间约1 h. 剖腹取胃, 沿胃大弯切开, 生理盐水洗净, 剪除前胃, 将腺胃展平, 暴露黏膜面, 进行观察; 在有颜色异常和粟粒状结节处, 则连同周围组织行条形切割, 大小约15×2 mm, 可取多条组织, 分置两处, 置于2.5%戊二醛(PBS液配制)4℃固定1-2 h, 送电镜室行透射电镜检查; 置于4%多聚甲醛固定12 h, 再入20%蔗糖PBS液24 h, 取出, 石蜡包埋, 切片后行病理检查(HE染色)P53及VEGF检测(免疫组化法).

1.2.5 VEGF表达检测 采用免疫组化法, 染色程序, 按试剂盒说明进行. 结果判定: 以细胞质呈现明确的棕黄色颗粒状染色为阳性反应, 并以此为目标进行真彩色图像分析处理, 获得定量数据.

1.2.6 突变型P53蛋白表达检测 采用免疫组化法, 染色程序, 按试剂盒说明进行. 结果判定: 以细胞核呈现明确的棕黄色颗粒状染色为阳性反应. 定量方法同VEGF检测.

统计学处理 采用方差分析、两两比较法, 由中山大学医科大学统计学教研室采用SPSS for Windows 7.0版统计软件进行.

2 结果

2.1 大体观察所见 对照组大鼠胃黏膜面的颜色异常和粟粒状结节较为多见; 胃康宁2组黏膜面亦有颜色异常和粟粒状结节, 但较不多见; 胃康宁1组黏膜面未见有粟粒状结节, 颜色异常少见(表1).

2.2 光镜观察所见(HE染色) 正常大鼠胃黏膜上皮细胞连接完整, 腺管排列整齐; 上皮细胞圆形, 大小正常; 细胞核圆形, 染色正常; 核浆比正常. 胃康宁1组大鼠胃黏膜上皮细胞连接比较完整, 腺管排列整齐; 上皮细胞圆形, 大小正常; 细胞核圆形, 染色正常; 核浆比正常. 胃康宁2组大鼠胃黏膜上皮细胞连接比较完整, 腺管排

列比较整齐; 上皮细胞圆形, 大小接近正常; 细胞核圆形, 染色基本正常; 核浆比基本正常. 对照组大鼠胃黏膜上皮细胞连接缺如, 腺管排列紊乱; 上皮细胞大小形状不一; 细胞核异形性, 胞核浓染; 核浆比增大.

2.3 电镜观察所见 胃康宁1组大鼠胃黏膜组织中, 细胞数量少, 腺腔完整, 细胞分化良好, 偶见未分化细胞, 呈现细胞凋亡改变. 胃康宁2组大鼠胃黏膜组织中细胞量较多, 核异形性. 对照组大鼠胃黏膜组织中细胞数明显增多, 细胞小, 分化程度低, 核浓染, 核异形性, 腺腔不明显, 细胞排列不规整, 形态各异.

2.4 突变型P53蛋白表达 胃康宁1组和胃康宁2组的P53表达量均较对照组明显减少, 有非常显著性差异($P < 0.001$); 胃康宁1组的P53表达量亦较胃康宁2组明显减少, 且有显著性差异($P < 0.05$). 表明胃康宁具有显著抑制P53异常表达(图1, 表2).

表1 各组大鼠胃黏膜颜色异常、结节比较

组别	n	黏膜异常、粟粒状结节发生率(%)
胃康宁1组	12 ^a	1/12 (8) ^a
胃康宁2组	11 ^b	5/11 (45) ^b
对照组	17	12/17 (71)

^a $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表2 各组大鼠胃黏膜细胞P53蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P53蛋白(目标面积 μm ² /视场面积 μm ²)
胃康宁1组	12	2.1889±1.4908 ^a
胃康宁2组	11	3.4905±1.5225 ^b
对照组	17	6.2895±3.4046

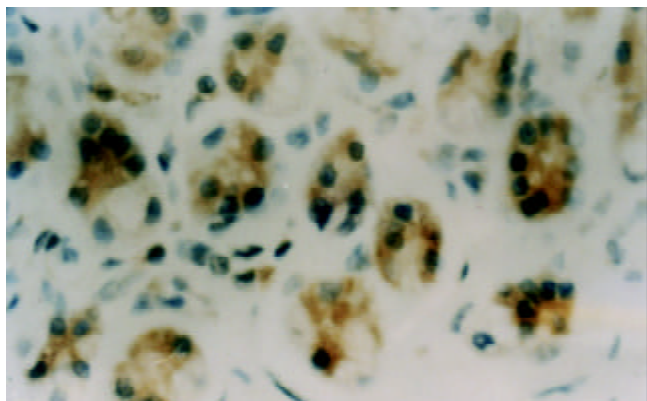
^a $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.5 VEGF表达 胃康宁1组和胃康宁2组的VEGF表达量均较对照组明显减少, 有非常显著性差异($P < 0.01$); 胃康宁1组与胃康宁2组间的VEGF表达量无显著性差异($P > 0.05$). 表明胃康宁具有显著抑制VEGF表达的效应(图2, 表3).

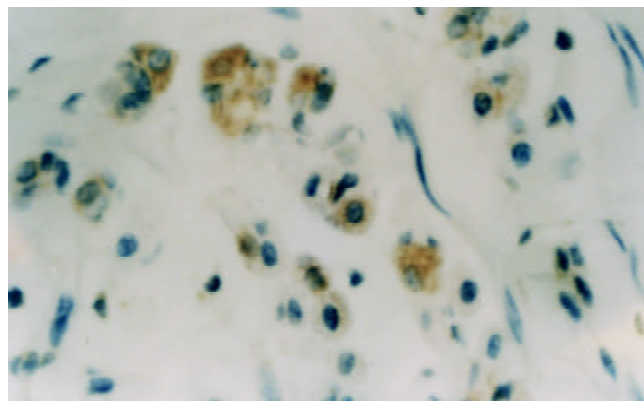
表3 各组大鼠胃黏膜细胞VEGF表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF(目标面积 μm ² /视场面积 μm ²)
胃康宁1组	12	3.3779±3.5450 ^{a,c}
胃康宁2组	11	3.5190±2.2041 ^b
对照组	17	5.7000±3.1884

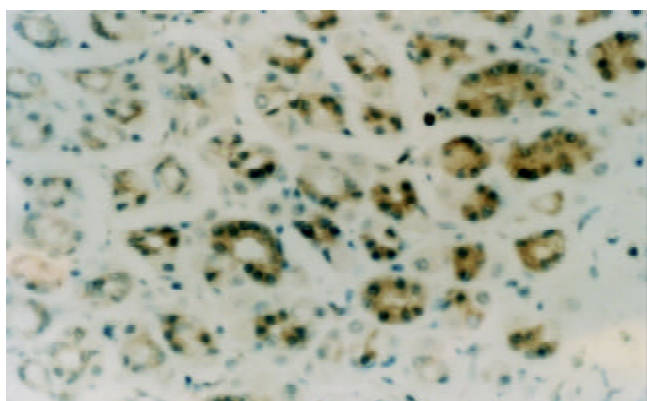
^a $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.01$ vs 胃康宁2组.



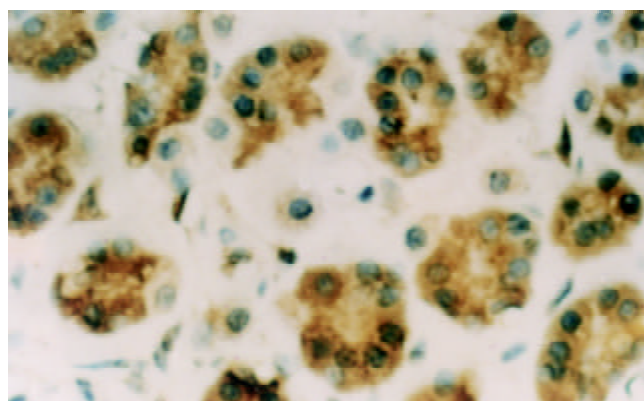
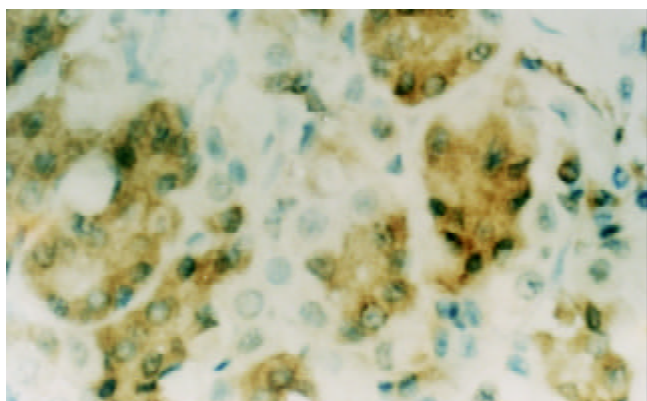
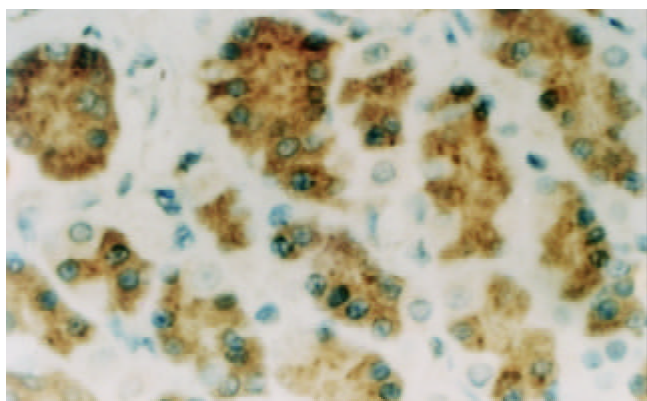
对照组 ×400



胃康宁一组 ×400



胃康宁二组 ×400

胃康宁二组 ×400
图2 VEGF 在胞质中的表达.胃康宁二组 ×400
图1 突变型 P53 蛋白在细胞核中的表达.

对照组 ×400

3 讨论

根据祖国医学理论, 胃癌的发生与气郁、痰积、脾虚、瘀毒等病理因素密切相关的认识, 采用健脾化痰、清热解毒、理气活血、消瘀散结的方法防治胃癌, 取得一定疗效, 但仍有许多问题尚需进一步研究^[1-6]. 本实验采用 MNNG 饲喂 Wistar ♂ 大鼠诱导生成胃腺癌, 经病理切片检查, 符合癌变特征^[7]. 通过本实验, 从病理检查及电镜检查表明, 胃康宁具有防治 MNNG 诱导的大鼠胃黏膜组织细胞恶性表型的作用. 同时通过免疫组化技术检测, 胃康宁对大鼠实验性胃癌突变型 P⁵³ 基因 VEGF 的表达均有明显抑制作用.

在胃癌的发生、发展过程中, 原癌基因的激活与抑癌基因的失活以及一些相关的分子对胃癌生物学行为起着重要的作用^[8-11]. P53 在多种肿瘤中有 50% 存在 P⁵³ 基因突变, 在癌的病变中也倍受重视^[12-14], 通过 PCR-SSCP 等方法, 研究发现 25 例原发性胃癌中 48% 存在 P⁵³ 基因突变. 突变的 P⁵³ 蛋白可通过“负显性效应”阻碍野生型 P⁵³ 基因的抑制生长功能, 突变型 P⁵³ 蛋白与野生型 P⁵³ 蛋白结合形成几乎没有结合 DNA 能力的寡聚蛋白复合物, 从而不能控制这些位点的基因转录, 这些位点可能包括抑制细胞或癌变的基因, 这样突变型 P⁵³ 蛋白将导致肿瘤进一步生长. 且 P53 在本病的发生、发展中与 P16, P21, nm23, hTTR 等基因及相关分子有密切的关系^[15-17]. 甚至与幽门螺杆菌的感染也有一

定的关系^[19-21]。而且用于治疗胃癌的药物对P53的表达具有调控作用^[22,23]。本研究结果显示在对照组P⁵³呈高表达,表明在致癌因素MNNG长期饲喂条件下,胃黏膜组织细胞中P⁵³基因已发生突变,产生致癌效应,使大鼠发生胃癌。

血管内皮细胞生长因子(VEGF)是一种促血管生长因子,对原位肿瘤的形成和生长以及转移瘤的形成中起着十分重要的作用。消化道肿瘤、膀胱癌、造血系统肿瘤、胶质细胞瘤等都存在VEGF mRNA及蛋白的过度表达^[24-27]。VEGF表达与胃癌的浸润转移有关^[28-30]。在肿瘤生长过程中,血浆蛋白(如纤维蛋白原和纤溶酶原)从高渗透性的血管中外渗并凝固,形成纵横交错的纤维蛋白胶滞体,纤维蛋白胶滞体为肿瘤细胞或炎症细胞和从邻近结缔组织来的再生血管提供暂时性基质,这种暂时基质最终降解并转化成胶原结缔组织,将无限地维持肿瘤的生长^[31]。血管内皮细胞的表面存在着VEGF受体,VEGF通过与VEGF受体结合而诱导血管内皮细胞的增生。还通过其他机制参与血管形成^[32]。VEGF的表达受到基因水平的调控,阻断VEGF与VEGF受体的结合及VEGF的信号转导,便可抑制VEGF的生理功能,从而抑制肿瘤的形成^[33]。此外,VEGF与P⁵³突变有密切关系,P⁵³基因突变可以下调抑制血管增生的凝血酶反应素-1(TSP-1)和上调促进血管增生的VEGF,因而成为调控肿瘤血管生长的重要因素^[34]。Kondo et al^[35]也发现突变型P⁵³可诱导VEGF表达。本研究结果在对照组(造模组)突变型P⁵³、VEGF呈高表达,显示了P⁵³基因突变与VEGF在胃癌发生、发展过程中的重要作用。而在用药组(1组与2组)P⁵³、VEGF均呈低表达,表明胃康宁可阻止P⁵³基因突变和抑制VEGF而防治胃癌的发展浸润过程。

4 参考文献

- 1 劳绍贤,陈更新. 胃癌癌前病变的中医研究. 世界华人消化杂志 2002; 10:1117-1120
- 2 Guo WJ, Yu EX. Evaluation of combined therapy with chemoembolization and irradiation for largehepatocellular carcinoma. *Br J Radiol* 2000;73:1091-1097
- 3 赵群,李勇,王力利,焦志凯,刘冀红,马志学,刘品一,于跃明,范立侨. 参芪扶正注射液对胃癌患者手术及化疗时免疫功能的影响. 中国中西医结合杂志 2001;21:424-426
- 4 陈飞松,何蜀兵,李春梅,刘晋生,郭培元,危北海,施波,傅招娣,雷小虹. 中药芪龙方抑制实验性胃肿瘤的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:898-899
- 5 周学文. 中医药治疗胃癌癌前病变的临床研究现状与展望. 世界华人消化杂志 1999;7:277-279
- 6 王冠庭. 晚期胃癌中西医结合治疗的思路与体会. 世界华人消化杂志 2000;8:786-788
- 7 邓大君,朱少侠,陈强,张汝斌. MNNG 诱发新生大鼠腺胃癌模型的建立及其在胃癌发病机制研究上的应用. 中华病理学杂志 1994; 23:293-295
- 8 Wang YK, Ji XL, Ma NX. nm23 expression in gastric carcinoma and its relationship withlymphoproliferation. *World J Gastroenterol* 1999;5:87-89
- 9 赵怡,张学庸,史宪杰,胡沛臻,张传山,马福成. 胃癌组织 P16, P53 蛋白和增生细胞核抗原的表达意义. 世界华人消化杂志 1999;7:246-248
- 10 秦环龙,林擎天,张惠箴. 胃癌多基因和癌胚抗原同步检测的临床意义. 世界华人消化杂志 1999;7:794-795
- 11 王旭东,房殿春,刘为纹. 胃黏膜肠化及异型增生和胃癌组织中多基因异常. 世界华人消化杂志 2000;8:855-859
- 12 李晓清,郝丽萍,张小丽,龚飞跃,郭惠学,伍尤皇. 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
- 13 金焰,傅松滨. 肿瘤抑制基因 P⁵³ 基因与肿瘤关系以及基因治疗的研究进展. 国外医学遗传学分册 2001;201-206.
- 14 许昌泰,闫小君. P53 抗癌基因和消化系肿瘤. 世界华人消化杂志 1999;7:77-79
- 15 费素娟,陈玉林,林志发,陈淑敏,刘广珍. 胃癌及癌前病变 RasP21, P53 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:465-466
- 16 李贵新,李国庆,赵常在,徐功立. 胃癌组织端粒酶 hTERT 与抑癌基因 P⁵³ 和 P¹⁶ 表达的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:591-593
- 17 王仰坤,马乃绪,娄海玲,李涌,王丽,潘红,张志波. 胃癌 nm23 和 P53 蛋白表达及癌浸润转移的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:34-36
- 18 Sasano H, Date F, Imatania A, Asaki S, Nagura H. Double immunostaining of c-erbB-2 and P53 in human stomach cancer cells. *Human Pathol* 1993;24:584-589
- 19 郭长青,王玉萍,刘国永,马壮旺,丁贯一,李继昌. 胃黏膜癌变过程中的幽门螺杆菌感染与 p53, c-erbB-2 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:313-315
- 20 高歌,周长玉,林仲玉. 胃癌与 Hp 感染及 c-myc P53 基因表达的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:941-943
- 21 钟慧闽,宋健,姚萍,尹成才. 幽门螺杆菌阳性胃癌 P53 和 Fas 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:456-457
- 22 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
- 23 吴金鸾,周晓峰,姜文霞,王君利,杨凡,蔡宣松,张志刚. 肿瘤化疗药物对胃癌细胞 Bcl-2, p53 和 Ki-67 表达的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:589
- 24 Brown L, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995;26:86-91
- 25 马晓明,汪永录,潘伯荣. VEGF 研究进展. 世界华人消化杂志 1999; 7:695-696
- 26 刘东屏,王炳元,姜若兰. 胃癌组织内血管内皮生长因子及其受体 Flt, KDRm RNA 的表达. 中华消化杂志 2000;20:252-254
- 27 李坚,西仓健,渡边英伸. 早期高分化型胃癌的组织学分类与 P⁵³ 基因的关系研究. 中华消化杂志 2002;22:523-525
- 28 陶厚权,林言箴,王瑞年,尹浩然. 血管内皮生长因子表达在胃癌浸润转移中的作用. 中华消化杂志 1998;16:287-289
- 29 李庆明,余谦,曾敬,吴伟康. 胃康宁对大鼠胃癌血管内皮生长因子表达的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:359-360
- 30 宋震亚,闻树群,徐荣臻,钱可大,单江. 管内皮生长因子的表达与胃癌浸润和转移的关系. 中华消化杂志 2002;22:344-346
- 31 李健,牛正先,王立东. 血管内皮生长因子(VEGF)与肿瘤微环境. 国外医学临床生物化学与检验学分册 1997;18:231
- 32 Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 199;138: 213-221
- 33 Hu DE, Fan TP. Suppression of VEGF-induced angiogenesis by the protein tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A. *Br J Pharmacol* 1995;114:262-268
- 34 Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997;14:1495-1502
- 35 Kondo Y, Aarii S, Furutani M, Isigami S, Mori A, Onodera H, Chiba T, Imamura M. Implication of vascular endothelial growth factor and P⁵³ status for angiogenesis in noninvasive colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88:1820-1827

乙型和丙型肝炎病毒蛋白反式激活作用机制及其意义的研究进展

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
国家自然科学基金项目, No. C39970674, C03011402, C39900130, C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关项目, No.01MB135
项目负责人: 成军, 10039, 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
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1001.asp>

编者按 乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染不仅引起急性、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关。这两种肝炎病毒致病机制的研究进展很快, 涉及许多方面。肝炎病毒对于感染肝细胞的影响非常复杂和多样化, 其中包括肝炎病毒蛋白对于感染肝细胞基因表达谱的影响。HBV 基因编码的羧基末端截短型表面抗原中蛋白(MHBst)、X 蛋白(HBxAg), HCV 基因组编码的核心(core)蛋白、非结构蛋白3(NS3)蛋白、非结构蛋白5A(NS5A)等都是具有显著反式调节作用的病毒蛋白质。这些病毒蛋白对于肝细胞基因表达谱的影响, 对研究肝炎病毒的致病机制具有重要意义。

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

无论是直接还是间接形式, 肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因表达谱的影响是肝炎病毒感染导致各种肝脏病变的基本机制, 因此, 对于肝炎病毒蛋白的反式激活作用机制研究显得非常重要。近年来差异显示技术的出现和发展, 大大促进了慢性病毒性肝炎及其相关疾病机制的研究进展, 从目前的研究结果来看, DNA 芯片(DNA chip)、抑制性消减杂交(SSH, suppression subtractive hybridization)是研究肝炎病毒蛋白反式激活作用靶基因的有效技术类型。

中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 在成军博士、教授、主任医师的领导下, 经过4 a 左右的努力, 逐步建立起抑制性消减杂交、任意引物差异显示逆转录聚合酶链反应、微矩阵技术等, 对于肝炎病毒蛋白反式调节的基因进行了系统研究, 获得了一系列的研究结果, 对于认识肝炎病毒感染肝细胞之后, 对于肝细胞基因表达谱的改变及研究具有十分重要的意义。

1	乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子I结构及调节研究.....	1002
2	乙肝病毒表面抗原基因启动子II的结构及调节研究.....	1004
3	乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究.....	1006
4	乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究.....	1008
5	丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究.....	1011
6	丙型肝炎病毒复制子的研究.....	1014
7	丙型肝炎病毒NS5A蛋白的反式激活作用研究.....	1018
8	丙型肝炎病毒5' - 非翻译区的结构与功能研究.....	1020
9	乙型和丙型肝炎病毒蛋白对14-3-3蛋白信号转导的影响.....	1023
10	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.....	1027

乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究

李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟

李强, 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
程明亮, 贵阳医学院附属医院传染科 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
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1002-1004
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1002.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染导致全球性健康问题. 世界人口约6%是病毒携带者, HBV也是导致肝硬化和肝癌的危险因素. HBV要持续感染人体, 必须要有持续的病毒复制, HBV基因表达精确调节对病毒复制起关键作用. 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、S1、S2、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), 所有其他启动子缺乏TATA盒. 两个增强子和负调控元件进一步控制HBV RNA合成, 所有转录调控元件插入蛋白编码的基因区. SP I作为指导2.4 kb mRNA转录的启动子序列, 在HBV复制中具有十分重要的作用.

1 HBV SP I 启动子的结构

HBV的S基因有两个串联的启动子SP I和SP II. SPI (2 219-2 780 nt)在HBV基因组5'至前S1区, 含有典型TATA盒(TATA box)的序列^[1], 并含有特异性肝细胞核因子1(hepatocyte nuclear factor 1, HNF1)的结合位点. HNF1结合位点与TATA盒之间相隔45 bp, 中间还有一个八聚体结合蛋白1结合位点. HNF3结合位点位于HNF1与TATA结合蛋白之间^[2]. 转录因子蛋白Sp1结合位点与TATA盒结合蛋白位点重合^[2]. 而且SP I启动子也与其他转录因子相互作用而增加2.4 kb mRNA转录产生. HNF1结合位点主要出现于某些仅在肝细胞中专一表达基因的启动子区. HNF1的结合是SP I启动子在分化的肝癌细胞株中进行高水平转录的必要条件. 另外, SP I的腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)核苷酸丰富区中还有一个AFP-1(一种可与甲胎蛋白基因的增强子及启动子结合的核因子)结合位点, 也可能与肝细胞特异性的转录有关.

2 HBV SP I 启动子的调节蛋白

启动子及其基因序列本身并没有活性, 只有结合转录

因子蛋白后才有功能. 转录因子中核受体超家族成员在HBV转录过程中具有十分重要的作用, Raney et al^[3]研究了HNF4、视黄酸X受体(RXR)、过氧化物酶增强子激活受体(PPAR)等在分化型HepG2细胞系中对于HBV结构中的4段启动子活性的调节作用, 发现CP和HBsAg大蛋白启动子(SP I)受到HNF4的反式激活调节作用, 而增强子 I (ENH I)/X基因, 核心蛋白和HBsAg大蛋白基因启动子则受到RXR和PPAR的反式激活.

Lee et al^[4]建立了p53抑制HBV复制的HepG2细胞模型, 这一模型证实了p53下调HBV所有4种启动子序列的表达活性. 他是通过直接与TATA结合蛋白复合物或CCAAT结合因子作用而发挥抑制功能. 利用报告基因, 用转染实验分析HBV启动子的活性表明XP和CP的活性比SP I和SP II高^[5,6], 其原因还不清楚. ENH II能在一定位置和方向上以独立的方式刺激两个表面蛋白基因启动子和X基因启动子的转录活性. ENH I对表面抗原mRNA转录影响有限^[7]. 这可能与他的位置有关.

3 HBV SP I 调节

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基因组中的每个调节元件, 包括4种启动子, 2种增强子(Enh), 包装信号, 糖皮质激素应答元件(GRE)等, 与细胞或病毒产生的调节因子结合后, 分别调节(加强或抑制)不同基因表达; 而不同基因可受同一调节元件控制. 这些调节元件在基因组中的相对位置, 提示可以协同方式, 控制HBV基因的表达. 细胞RNA聚合酶II和转录因子结合于启动子序列, 启动RNA的合成.

反式激活的多种细胞因子(NF1、C/EBP、AP1、HNF1等)结合在增强子的特定部位, 反式激活Enh增强转录的活性. Enh序列上的这些特定的保守部位与其细胞因子相互作用, 才可能有效激活基因的启动子. 细胞核因子NF1对激活S基因的转录很重要.

Enh I的活性对HBsAg的表达影响小, 而Enh II活性对于HBsAg的表达具有显著的影响^[26]. Enh II对分化的肝细胞和肝癌细胞具有显著的特异性, 可增强SP1、SP2、CP和X启动子的转录, 肝细胞核内有多种因子与Enh II的两个元件特异性的结合, 顺式激活前S1的启动子SP I. 在慢性HBV感染中, 病毒与宿主细胞染色体整合时常导致Enh II的缺失, 从而改变了外膜蛋白的相对量, 大蛋白明显减少.

多聚腺苷酸(PolyA)加尾信号及糖皮质激素反应元件均属于HBV的顺式作用元件, PolyA加尾信号是转录终止及加PolyA尾所必须的序列, GRE序列可与激活受体结合, 从而提高特定基因的转录水平, GRE表现出增强子的基本特征. 在转基因小鼠中表达HBsAg被6种类固醇和糖皮质激素调节, 经地塞米松处理后, ♂转基因小鼠对HBsAg的表达水平高于♀.

乙型肝炎病毒X抗原(HBxAg)能反式激活许多病毒和细

胞基因, 通过结合和修饰包括 AP1、AP2、ATF2、CREB、TBP、TF2H、TF2B 等转录因子的功能起作用^[8,9,17-20], HBxAg 刺激所有 HBV 启动子到一个相似程度(2-3.5 倍)^[6,10], S1 启动子也不例外. Sp1 转录因子与 SP I 的 Sp1 结合位点结合后, 反式激活 SP I, 但其单独发挥作用小, 而是以协同方式发挥作用^[11]. TATA 盒结合转录因子 TF II D, TF II D 结合 RNA 聚合酶 II, 即在启动子下游的约 30 bp 处开始转录. Raney et al^[21]研究表明转录因子 HNF1 和 HNF3 对 SP I 的转录调节具有重要作用, 他们作用的位置在肝脏而不在其他组织. 这两种因子协同作用可能抑制 2.4 kb mRNA 的转录. 在 PolyA 加尾信号、GRE、ENH I、ENH II 和 HBX 及其他的细胞因子作用下顺式或反式激活 SP I, SP I 开始发挥调节功能.SP I 调节 2.4 kb 的 mRNA 转录, 编码大蛋白. 2.4 kb 的 mRNA 开始于 2 812 nt, 其上游 20 bp 是 SP I 的 TATA 盒, 准确控制转录的开始. SP II 调节 2.1 kb mRNA, 编码中、主蛋白, 两种启动子都具有同等的活性, 但是在 HBV 感染细胞中, 2.4 kb mRNA 的表达量明显低于 2.1 kb mRNA^[22-24], 因而细胞内主蛋白的量明显高于大蛋白. 由于大蛋白的增加易导致病毒包膜蛋白在细胞内蓄积, 引起细胞病变效应. 因 HBV 各种包膜蛋白的这种比例不仅有利于感染性 HBV 颗粒成熟于释放, 而且有利于宿主细胞的生存, 使二者能共生共存^[16,25]. 因此, 三种外膜蛋白的产量有正常比例, 大蛋白过量时, 将顺式干扰 SP II, 从而降低基因的转录水平. Lu et al^[12]研究表明 SP II 含 CCAAT 序列, 是一种调节蛋白正常比率的重要因素, 正调节 S 转录, 促使主蛋白产量增加, 负调节前 -S1 转录, 使大蛋白的产量减少, 而维持大/中蛋白 < 1/5 的正常比率. 参与 HBV 基因组转录调节的还有多种反应激活蛋白, 包括来自病毒基因组 X 区和前 -S/S 区的表达产物, 也包括来自宿主细胞的各种转录调节因子. 在对宿主细胞的反应作用因子中, 既有肝细胞特异性的调节蛋白 (如 HNF1, C/EBP, 其 mRNA 主要出现于肝组织, 并具有特定的结构域), 也有在各种细胞存在的细胞因子; 既有序列特异性的 DNA 结合蛋白, 也有通过蛋白质-蛋白质相互作用而发挥功能的调节因子.

4 S 基因启动子变异的影响

Xu et al^[14]从 1 例慢性肝炎患者血清中分离到 S 基因启动子缺失变异株, 转染肝癌细胞后, 大蛋白过度表达, 而中、主蛋白表达减少, 因而病毒及亚病毒颗粒的分泌都受到抑制, 肝细胞内大蛋白堆积, 认为可能是慢性肝炎肝细胞毛玻璃样变性的原因. 他们进一步研究发现, 过度表达的大蛋白在肝细胞内质网通过激活 grp⁷⁸ 和 grp⁹⁴ 启动子, 改变宿主细胞的生理功能^[15]. 转基因小鼠模型已经证实, 若大蛋白过度表达, 在肝细胞内堆积, 将导致肝细胞内质网肿胀, 肝细胞变性. 因此, 在感染过程中, 改变大、中、小蛋白的比例将影响疾病的进程.

总之, 有效的 HBV 复制要求有精确调节转录的 HBV 序列. C、S1、S2、X 启动子调节 mRNA 的产量. 两个增强子增加启动子的活性. 肝丰富的转录因子如 HNF-1、HNF-3 和 HNF-4 认为是病毒嗜肝性的决定因素. 因此, SP I 不是单独的起作用, 而是与其他的启动子、增强子和转录因子相互作用, 构成 HBV 转录的平衡系统. 有目的的控制 S1 启动子的启动将打破这种平衡, 是阻断 HBV 复制的有趣治疗模式.

5 参考文献

- Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:566-570
- Raney AK, Zhang P, McLachlan A. Regulation of transcription from the hepatitis B virus large surface antigen promoter by hepatocyte nuclear factor 3. *J Virol* 1995;69:3265-3272
- Raney AK, Johnson JL, Palmer CN, McLachlan A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol* 1997;71:1058-1071
- Lee H, Kim HT, Yun Y. Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression. *J Biol Chem* 1998;273:19786-19791
- Wang WX, Li M, Wu X, Wang Y, Li ZP. HNF1 is critical for the liver-specific function of HBV enhancer II. *Res Virol* 1998;149:99-108
- Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Masubara K, Koshy R. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 1993;195:305-314
- Yuh CH, Ting LP. The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function. *J Virol* 1990;64:4281-4287
- 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
- Qadri I, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1003-1007
- 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
- Raney AK, McLachlan A. Characterization of the hepatitis B virus large surface antigen promoter Sp1 binding site. *Virology* 1995;208:399-404
- 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
- Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- Xu Z, Yen TS. Intracellular retention of surface protein by a hepatitis B virus mutant that releases virion particles. *J Virol* 1996;70:133-140
- Xu Z, Jensen G, Yen TS. Activation of 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
- Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* 1999;29:1236-1247
- 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
- Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1562-1569

- 19 Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- 20 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
- 21 Raney AK, Mclachlan A. Characterization of the hepatitis B virus major surface antigen promoter hepatocyte nuclear factor 3 binding site. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 11):3029-3038
- 22 Araki K, Miyazaki J, Hino O, Tomita N, Chisaka O, Matsubara K, Yamamura K. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:207-211
- 23 Cattaneo R, Will H, Schaller H. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J* 1984;3:2191-2196
- 24 Farza H, Hadchouel M, Scotto J, Tiollais P, Babinet C, Pourcel C. Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol* 1988;62:4144-4152
- 25 Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1059-1063
- 26 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

乙肝病毒表面抗原基因启动子II的结构及调节研究

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@genetheray.com.cn
 电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
 收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙肝病毒表面抗原基因启动子II的结构及调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):1004-1006
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1004.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)为含有一段单股区的双链环状DNA病毒, 属嗜肝DNA病毒科, 其基因组结构紧密, 可分为结构基因序列和调节基因序列两部分, 二者可具有相互重叠的特点. HBV基因的负链核苷酸序列中, 至少有4个开放读码框(open reading frame, ORF), 包括编码外膜蛋白的S基因区, 编码核衣壳蛋白的C基因区, 编码聚合酶的P基因区和调节病毒基因转录水平的X基因区, 4种ORF分别有各自的启动子. HBV的外膜蛋白能使病毒由感染的细胞分泌, 并能附着和侵入新的细胞; 同时其也是引起宿主保护性应答的免疫原表位^[1-6]. 因此, 作为指导S基因组RNA转录的SP启动子序列, 在HBV的生活周期中, 具有较为重要的作用.

1 HBV SP-II启动子的结构特点

启动子(promotor)又称启动基因, 是DNA分子上可与RNA聚合酶特异结合, 而使转录开始的一段DNA序列, 位于转录起始点上游, 由RNA聚合酶结合部位及控制转录的调节组件构成. HBV至少有4个启动子, 转录出3.5 kb、2.4 kb、2.1 kb和0.7 kb mRNA等, 这4条RNA均有一个共同的多聚腺苷酸(PolyA)尾, 在此终止转录. S基因有两个串联的启动子, SP-I启动子(2219-2780 nt)调节2.4 kb的mRNA转录, 编码大蛋白; SP-II启动子(2809-3152 nt)调节2.1 kb的mRNA转录, 编码中蛋白和主蛋白. SPII启动子不含典型的TATA盒, 但含不典型的TATA样序列(-25~-32 nt), 有启动子的特异活性, 可与胞核提取物特异结合. SP-II启动子与猴病毒40(SV40)晚期启动子相类似, 富含鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)核苷酸, 对其进行精细的突变分析表明, 位于RNA转录起始位点上游200个核苷酸内的SP-II启动子可分为A至G 7个区段, 其均能通过序列特异性的DNA结合蛋白相互作用而影响转录水平, 其中-188~-68远端的A、B和C区是正调控区, 如果同时去除A、B和C区可使转录水平下降3倍, 但仅有B和C区均可保持较高水平; 位于-6~-49的D区是SPII启动子的必需元件, 与SV40复制起点有一定程度的同源性; E-G区位于主要转录起始位点的45个核苷酸内, 与SV40主要晚期启动子有序列同源性, E区可抑制F区对转录的负调节, 并可补偿G区的突变对转录的影响, 而删除F区后, G区可补偿E区的缺失对转录的影响. 总之, SPII启动子至少有6个负责正调节的转录因子结合位点(A-E、G)和一个负调节的转录因子结合位点(F)^[7-10].

2 HBV SP-II启动子的调节

S基因的三种蛋白的主要功能是以一定的比例在内质网内与核心颗粒一起装配成成熟的病毒颗粒, 再分泌到细胞外. 中、主蛋白在没有其他病毒颗粒时, 可以小球型或丝状的亚病毒颗粒形式分泌, 而大蛋白则不能单独分泌. 当大蛋白与其他表面蛋白一起表达时, 病毒颗粒是否能组装并分泌取决于大蛋白的数量; 当大蛋白数量相对少时, 病毒颗粒成熟并分泌; 而当大蛋白数量多时, 抑制病毒颗粒的组装与分泌. 因此, 在HBV感染中, 大蛋白的含量明显低于中蛋白和主蛋白, 这是通过两个独立的启动子SP-I及SP-II来调节的; 上游是SP-I启动子, 主要控制大蛋白的转录与翻译, 下游的SP-II启动子主要控制中、主蛋白的转录与翻译. 通常前-S1 mRNA的量远少于S mRNA, 因此大蛋白的量通常不足以阻止病毒成熟和分泌. 由于大蛋白的增加易导致病毒包膜蛋白在宿主内蓄积, 引起细胞病变效应, 因此, HBV膜蛋白的这种比例不仅有利于感染性HBV颗粒的成熟与释放, 而且也有利于宿主细胞的生存.

SP-II启动子中含CCAAT短序列, 是一种调节外膜蛋白正常比率的重要因素. CCAAT序列既能增强SP-II

- 19 Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- 20 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
- 21 Raney AK, Mclachlan A. Characterization of the hepatitis B virus major surface antigen promoter hepatocyte nuclear factor 3 binding site. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 11):3029-3038
- 22 Araki K, Miyazaki J, Hino O, Tomita N, Chisaka O, Matsubara K, Yamamura K. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:207-211
- 23 Cattaneo R, Will H, Schaller H. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J* 1984;3:2191-2196
- 24 Farza H, Hadchouel M, Scotto J, Tiollais P, Babinet C, Pourcel C. Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol* 1988;62:4144-4152
- 25 Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1059-1063
- 26 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

乙肝病毒表面抗原基因启动子II的结构及调节研究

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@genetheray.com.cn
 电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
 收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙肝病毒表面抗原基因启动子II的结构及调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):1004-1006
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1004.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)为含有一段单股区的双链环状DNA病毒, 属嗜肝DNA病毒科, 其基因组结构紧密, 可分为结构基因序列和调节基因序列两部分, 二者可具有相互重叠的特点. HBV基因的负链核苷酸序列中, 至少有4个开放读码框(open reading frame, ORF), 包括编码外膜蛋白的S基因区, 编码核衣壳蛋白的C基因区, 编码聚合酶的P基因区和调节病毒基因转录水平的X基因区, 4种ORF分别有各自的启动子. HBV的外膜蛋白能使病毒由感染的细胞分泌, 并能附着和侵入新的细胞; 同时其也是引起宿主保护性应答的免疫原表位^[1-6]. 因此, 作为指导S基因组RNA转录的SP启动子序列, 在HBV的生活周期中, 具有较为重要的作用.

1 HBV SP-II启动子的结构特点

启动子(promotor)又称启动基因, 是DNA分子上可与RNA聚合酶特异结合, 而使转录开始的一段DNA序列, 位于转录起始点上游, 由RNA聚合酶结合部位及控制转录的调节组件构成. HBV至少有4个启动子, 转录出3.5 kb、2.4 kb、2.1 kb和0.7 kb mRNA等, 这4条RNA均有一个共同的多聚腺苷酸(PolyA)尾, 在此终止转录. S基因有两个串联的启动子, SP-I启动子(2219-2780 nt)调节2.4 kb的mRNA转录, 编码大蛋白; SP-II启动子(2809-3152 nt)调节2.1 kb的mRNA转录, 编码中蛋白和主蛋白. SP-II启动子不含典型的TATA盒, 但含不典型的TATA样序列(-25~-32 nt), 有启动子的特异活性, 可与胞核提取物特异结合. SP-II启动子与猴病毒40(SV40)晚期启动子相类似, 富含鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)核苷酸, 对其进行精细的突变分析表明, 位于RNA转录起始位点上游200个核苷酸内的SP-II启动子可分为A至G 7个区段, 其均能通过序列特异性的DNA结合蛋白相互作用而影响转录水平, 其中-188~-68远端的A、B和C区是正调控区, 如果同时去除A、B和C区可使转录水平下降3倍, 但仅有B和C区均可保持较高水平; 位于-6~-49的D区是SP-II启动子的必需元件, 与SV40复制起点有一定程度的同源性; E-G区位于主要转录起始位点的45个核苷酸内, 与SV40主要晚期启动子有同源序列, E区可抑制F区对转录的负调节, 并可补偿G区的突变对转录的影响, 而删除F区后, G区可补偿E区的缺失对转录的影响. 总之, SP-II启动子至少有6个负责正调节的转录因子结合位点(A-E、G)和一个负调节的转录因子结合位点(F)^[7-10].

2 HBV SP-II启动子的调节

S基因的三种蛋白的主要功能是以一定的比例在内质网内与核心颗粒一起装配成成熟的病毒颗粒, 再分泌到细胞外. 中、主蛋白在没有其他病毒颗粒时, 可以小球型或丝状的亚病毒颗粒形式分泌, 而大蛋白则不能单独分泌. 当大蛋白与其他表面蛋白一起表达时, 病毒颗粒是否能组装并分泌取决于大蛋白的数量; 当大蛋白数量相对少时, 病毒颗粒成熟并分泌; 而当大蛋白数量多时, 抑制病毒颗粒的组装与分泌. 因此, 在HBV感染中, 大蛋白的含量明显低于中蛋白和主蛋白, 这是通过两个独立的启动子SP-I及SP-II来调节的; 上游是SP-I启动子, 主要控制大蛋白的转录与翻译, 下游的SP-II启动子主要控制中、主蛋白的转录与翻译. 通常前-S1 mRNA的量远少于S mRNA, 因此大蛋白的量通常不足以阻止病毒成熟和分泌. 由于大蛋白的增加易导致病毒包膜蛋白在宿主内蓄积, 引起细胞病变效应, 因此, HBV膜蛋白的这种比例不仅有利于感染性HBV颗粒的成熟与释放, 而且也有利于宿主细胞的生存.

SP-II启动子中含CCAAT短序列, 是一种调节外膜蛋白正常比率的重要因素. CCAAT序列既能增强SP-II

启动子的活性, 又能阻断 2.4 kb mRNA 转录延伸作用, 致使 2.4 kb mRNA 表达受限制. Lu et al^[11]发现在 SP-II 启动子内的 CCAAT 元件不仅能增加 S 基因的转录, 而且能降低前 -S1 基因的转录各 5 倍, 从而维持大/主蛋白 <1/5 的正常比例, 因此, 在 CCAAT 元件发生突变时, 大蛋白产生过量, 可抑制毒粒排出, 将导致细胞内表面蛋白分泌减少而大量堆积, 从而影响 HBV 的装配. 所以, CCAAT 元件在病毒的生活史中对维持 S/前 -S1 基因转录的比例起到关键的作用. SP-II 启动子发生缺失变异时, 大蛋白将过度表达, 而中、主蛋白表达减少, 因而病毒及亚病毒颗粒的分泌受到抑制, 但对病毒复制能力无影响, 肝细胞内大蛋白及复制中间产物 cccDNA 等堆积对肝细胞有细胞毒作用, 能增强肝细胞对炎症细胞因子的敏感性, 使肝细胞受损, 可能是慢性乙型肝炎肝细胞毛玻璃样变性的原因之一^[12,13]. 进一步研究发现, 过度表达的大蛋白在肝细胞内质网通过激活 grp78 和 grp94 启动子, 改变宿主细胞的生理功能. 转基因小鼠模型也已经证实, 若大蛋白过度表达, 在肝细胞堆积, 将导致肝细胞内质网肿胀、肝细胞变性. 另一些研究观察了大、中、主蛋白比例变化与肝损害之间的关系, 发现在急性肝炎恢复期的患者, 存在正常比例的大、中、主蛋白; 而慢性肝炎患者的大蛋白比例增高, 中蛋白合成减少. 因此, 在感染过程中改变大、中、主蛋白的比例将影响疾病的过程.

Bock et al^[14-16]从前 -S 区突变去研究 SP-II 启动子的转录调控后发现, 当前 S2 区发生 CCAAT 盒点突变 (MUT1)、CCAAT 盒的 3' 第 6 bp 缺失 (MUT2) 及 CCAAT 盒的 3' 第 153 bp 缺失 (MUT3) 变异时, SP-II 启动子功能下降约 30-75%, 并且发现, SP-II 启动子及 MUT3 能被 CCAAT 盒结合因子 (CBF) 调控, 而 MUT1 及 MUT2 则不被 CBF 调控, 可见 CBF 是 SP-II 启动子发挥作用所需, CCAAT 盒和另一未知区域所介导的启动子的功能必需通过 CBF 而起作用. 当发生 MUT1 和 MUT2 或 MUT3 时, 大蛋白将贮留在细胞内质网中, 核心蛋白将贮留在胞核内, MUT3 突变时, 出现有煎蛋样和螺旋丝状物质的畸形病毒颗粒; 并且还发现前 -S 区的不同区域决定着病毒在细胞内的定位和细胞外的表现, 前 -S 区变异可能与 HBV 相关肝病的进展和预后有关. Ha-Lee et al^[17]研究发现, SP-II 启动子的突变, 使基因表达失衡, 是慢性乙肝患者持续感染得以维持的一种途径. 有研究证实位于前 S-ORF 内的 2 995-3 177 nt 的缺失突变减弱了前 -S 的免疫原性, 但仍存在与肝细胞的结合位点, 不但保留了病毒感染肝细胞的能力, 还能使病毒避开宿主的免疫攻击, 导致 HBV 的持续携带状态.

Kajiya et al^[18]在慢性乙肝病毒感染过程中研究发现, 当机体的免疫反应强大时, HBV 病毒基因突变由通常的核心启动子 (CP) 突变 (T(1 762)A(1 764)) 及前 -S1 区缺失变为核心启动子 (CP) 突变及 SP-II 启动子区发生缺失变异; 将其 PCR 产物转染入人肝细胞瘤 HuH-7 细胞, 发现细

胞内病毒复制频率增加, 但 HBsAg 和 HBeAg 分泌减少, 细胞内不含包膜的核心颗粒增多, 提示核心启动子 (CP) 突变及 SP-II 启动子区缺失可能协同参与病情的发展.

乙型肝炎病毒的基因表达受许多转录因子的调控, 参与 HBV 基因组转录调节的有多种反式调节蛋白, 这些调节蛋白既包括来自病毒基因组的表达产物, 也包括来自宿主细胞的各种调节转录因子. SP-II 启动子通过其 -189~+1 间的序列调控元件与 NF1、SP1 和 NF-Y 等转录因子结合来调控前 -S2/S 基因的表达. Raney et al^[19]研究发现肝细胞核因子 HNF3 与 SP-II 启动子的 -231~-240 结合后, 前 -S2/S 基因的转录受到抑制. 转录激活蛋白 Sp1 可与 SP-II 启动子 B、D、E、F 区结合. Li et al^[20]研究发现转录因子 Sp1 能正负调控 S 基因的转录, 其有三个结合位点, Sp1-1 和 Sp1-2 在核心启动子内, Sp1-3 在增强子 EhnII 内. Sp1-1 不影响 S 基因的转录, Sp1-2 负调控 S 基因, 除去 Sp1-2 后, Sp1-1 则正调控 S 基因, Sp1-3 正调控 S 基因, 当其发生突变时, 则抑制基因表达, 然而, 这种抑制作用在 Sp1-1 和 Sp1-2 也发生突变时消失, Sp1 是如何具体调控 S 基因的转录, 有待进一步研究. SP-II 启动子不含有 TATA 盒, 其调控前 -S2/S 基因转录的机制也还不完全清楚, Bogomolski-Yahalom et al^[21]研究发现在 SP-II 启动子的 -25~-32 bp 的核苷酸序列有启动子的特异活性, 类似于 TATA 盒的功能, 含有 TATA 盒结合蛋白 (TBP) 结合位点, 可与胞核提取物特异结合; -13~-16bp 的核苷酸序列为 SP-II 启动子的起始子 (initiator, inr). 总之, 上述两种序列在前 -S2/S 基因转录调控中起到重要作用. 有资料表明增强子 Enh1/Enh2 均能提高 SP-II 启动子的转录水平, 但这方面的报道较少.

总之, 基因表达调控是在多级水平上进行的, 就目前的认识, 转录水平的调控是基因的重要控制方式, 基因的转录起始是基因表达的基本调控点, 而这一阶段的重要事件是 RNA 聚合酶与基因启动子的相互作用, 故对基因启动子的结构及调节研究十分重要. S 基因编码的主蛋白是目前常用乙型肝炎疫苗的主要中和位点, 并且 S 及前 -S 基因组与 HBV 病毒的成熟、分泌及感染性有关. 目前, 对 HBV SP 启动子的结构及调节的了解还比较少, 大大限制了我们对乙肝病毒及其相关疾病的认识, 有待进一步的研究.

3 参考文献

- 1 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
- 2 郭晏海. 与 HBV 进入细胞有关的细胞膜分子. 国外医学病毒学分册 2001;8:182-185
- 3 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
- 4 Sonveaux N, Thines D, Ruyschaert JM. Characterization of the HBsAg particle lipid membrane. *Res Virol* 1995;146:43-51
- 5 Mangold CM, Unckell F, Werr M, Streeck RE. Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles. *Arch Virol* 1997;142:2257-2267

- 6 Xu Z, Bruss V, Yen TS. Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. *J Virol* 1997;71:5487-5494
- 7 成军,杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1997:25-43
- 8 金奇. 医学分子病毒学. 第1版. 北京:科学出版社, 2001:334-335
- 9 Alka S, Hemlata D, Vaishali C, Shahid J, Kumar PS, Hepatitis B virus surface(S) transactivator with DNA-binding properties. *J Med Virol* 2000;61:1-10
- 10 De Meyer S, Depla E, Maertens G, Soumillion A, Yap SH. Characterization of small hepatitis B surface antigen epitopes involved in binding to human annexin V. *J Viral Hepat* 1999;6: 277-285
- 11 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
- 12 季伟,王慧芬. 乙型肝炎病毒转录后调节机制的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:120-124
- 13 吴炜,李兰娟. HBV前S基因变异及其临床意义. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:200-202
- 14 Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* 1999;29:1236-1247
- 15 Bock CT, Tillmann HL, Manns MP, Trautwein C. The pre-S region determines the intracellular localization and appearance of hepatitis B virus. *Hepatology* 1999; 30:517-525
- 16 Bock CT, Tillmann HL, Maschek HJ, Manns MP, Trautwein C. A preS mutation isolated from a patient with chronic hepatitis B infection leads to virus retention and misassembly. *Gastroenterology* 1997;113:1976-1982
- 17 Ha-Lee YM, Lee J, Pyun H, Kim Y, Sohn J, Cho YJ, Kim Y. Sequence variations of hepatitis B virus promoter regions in persistently infected patients. *Arch Virol* 2001;146:279-292
- 18 Kajiya Y, Hamasaki K, Nakata K, Nakagawa Y, Miyazoe S, Takeda Y, Ohkubo K, Ichikawa T, Nakao K, Kato Y, Eguchi K. Full-length sequence and functional analysis of hepatitis B virus genome in a virus carrier: a case report suggesting the impact of pre-S and core promoter mutations on the progression of the disease. *J Viral Hepat* 2002;9:149-156
- 19 Raney AK, McLachlan A. Characterization of the hepatitis B virus major surface antigen promoter hepatocyte nuclear factor 3 binding site. *J Gen Virol* 1997;78:3029-3038
- 20 Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the SP1 transcription factor. *J Virol* 2001;75: 8400-8406
- 21 Bogomolski-Yahalom V, Klein A, Greenblat I, Haviv Y, Tur-Kaspa R. The TATA-less promoter of hepatitis B virus S gene contains a TBP binding site and an active initiator. *Virus Res* 1997;49:1-7

乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究

杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军

杨艳杰,成军,陈东风,刘妍,杨倩,王建军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
 陈东风,中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
 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@genetheray.com.cn
 电话:010-66933392 传真:010-63801283
 收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-16

杨艳杰,成军,陈东风,刘妍,杨倩,王建军. 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1006-1008

<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/1006.asp>

0 引言

乙型肝炎是一种严重威胁人类健康的疾病,呈全球性分布,目前全世界有3.5亿人感染乙型肝炎病毒(HBV),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癌,至今仍缺乏有效控制^[1-5].造成这一局面的原因很多,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意义.本文仅就乙型肝炎病毒核心启动子(CP)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3.2 kb的部分双链DNA.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 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和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.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(regulatory element),包括4种启动子、2种增强子、包装信号 ϵ 、糖皮质激素应答元件等^[6].

2 乙肝核心启动子(CP)的结构及调节

CP在1 591和1 822nt(从EcoR I位点),包括至少232 bp^[7],结构及功能都十分复杂.与增强子II部分重叠的1 687 nt(Hinc II)下游核苷酸序列对于启动子的活性是非常必要的. CP与X基因的3'末端(1 837-nt)、C基因前-C区的5'末端(1 814 nt)重叠;增强子II(1 687-1 775 nt)和顺向重复序列(DR, direct repeat, 1 826-1 836 nt)完全在CP区域内;前基因组mRNA(1 785-nt)和前基因组-C/P mRNA(1 820-nt)都由此处开始. HBV的C基因调节序列区(C基因前-C区上游约200 bp)包括多个元件,有直接重复序列DR1/DR2、负链缺口、增强子II和C基因启动子(CP).

CP区在1 643-1 849 nt,结构和功能较复杂. CP与X基因远端和C基因的前-C区有部分重叠;DR I和增强子II在其区域内. CP由核心上游调节序列(CURS)和基本启动子(BCP)两部分构成,前者是后者的强激发者. CURS中含2个重复序列(1 668-1 684 nt),是肝细胞核

- 6 Xu Z, Bruss V, Yen TS. Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. *J Virol* 1997;71:5487-5494
- 7 成军,杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1997:25-43
- 8 金奇. 医学分子病毒学. 第1版. 北京:科学出版社, 2001:334-335
- 9 Alka S, Hemlata D, Vaishali C, Shahid J, Kumar PS, Hepatitis B virus surface(S) transactivator with DNA-binding properties. *J Med Virol* 2000;61:1-10
- 10 De Meyer S, Depla E, Maertens G, Soumillion A, Yap SH. Characterization of small hepatitis B surface antigen epitopes involved in binding to human annexin V. *J Viral Hepat* 1999;6: 277-285
- 11 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
- 12 季伟,王慧芬. 乙型肝炎病毒转录后调节机制的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:120-124
- 13 吴炜,李兰娟. HBV前S基因变异及其临床意义. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:200-202
- 14 Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* 1999;29:1236-1247
- 15 Bock CT, Tillmann HL, Manns MP, Trautwein C. The pre-S region determines the intracellular localization and appearance of hepatitis B virus. *Hepatology* 1999; 30:517-525
- 16 Bock CT, Tillmann HL, Maschek HJ, Manns MP, Trautwein C. A preS mutation isolated from a patient with chronic hepatitis B infection leads to virus retention and misassembly. *Gastroenterology* 1997;113:1976-1982
- 17 Ha-Lee YM, Lee J, Pyun H, Kim Y, Sohn J, Cho YJ, Kim Y. Sequence variations of hepatitis B virus promoter regions in persistently infected patients. *Arch Virol* 2001;146:279-292
- 18 Kajiya Y, Hamasaki K, Nakata K, Nakagawa Y, Miyazoe S, Takeda Y, Ohkubo K, Ichikawa T, Nakao K, Kato Y, Eguchi K. Full-length sequence and functional analysis of hepatitis B virus genome in a virus carrier: a case report suggesting the impact of pre-S and core promoter mutations on the progression of the disease. *J Viral Hepat* 2002;9:149-156
- 19 Raney AK, McLachlan A. Characterization of the hepatitis B virus major surface antigen promoter hepatocyte nuclear factor 3 binding site. *J Gen Virol* 1997;78:3029-3038
- 20 Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the SP1 transcription factor. *J Virol* 2001;75: 8400-8406
- 21 Bogomolski-Yahalom V, Klein A, Greenblat I, Haviv Y, Tur-Kaspa R. The TATA-less promoter of hepatitis B virus S gene contains a TBP binding site and an active initiator. *Virus Res* 1997;49:1-7

乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究

杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军

杨艳杰,成军,陈东风,刘妍,杨倩,王建军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
 陈东风,中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
 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@genetheray.com.cn
 电话:010-66933392 传真:010-63801283
 收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-16

杨艳杰,成军,陈东风,刘妍,杨倩,王建军. 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1006-1008

<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/1006.asp>

0 引言

乙型肝炎是一种严重威胁人类健康的疾病,呈全球性分布,目前全世界有3.5亿人感染乙型肝炎病毒(HBV),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癌,至今仍缺乏有效控制^[1-5].造成这一局面的原因很多,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意义.本文仅就乙型肝炎病毒核心启动子(CP)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3.2 kb的部分双链DNA.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 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和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.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(regulatory element),包括4种启动子、2种增强子、包装信号 ϵ 、糖皮质激素应答元件等^[6].

2 乙肝核心启动子(CP)的结构及调节

CP在1 591和1 822nt(从EcoR I位点),包括至少232 bp^[7],结构及功能都十分复杂.与增强子II部分重叠的1 687 nt(Hinc II)下游核苷酸序列对于启动子的活性是非常必要的. CP与X基因的3'末端(1 837-nt)、C基因前-C区的5'末端(1 814 nt)重叠;增强子II(1 687-1 775 nt)和顺向重复序列(DR, direct repeat, 1 826-1 836 nt)完全在CP区域内;前基因组mRNA(1 785-nt)和前基因组-C/P mRNA(1 820-nt)都由此处开始. HBV的C基因调节序列区(C基因前-C区上游约200 bp)包括多个元件,有直接重复序列DR1/DR2、负链缺口、增强子II和C基因启动子(CP).

CP区在1 643-1 849 nt,结构和功能较复杂. CP与X基因远端和C基因的前-C区有部分重叠;DR I和增强子II在其区域内. CP由核心上游调节序列(CURS)和基本启动子(BCP)两部分构成,前者是后者的强激发者. CURS中含2个重复序列(1 668-1 684 nt),是肝细胞核

因子的结合部位. 在 CP 上游还有一个顺式抑制元件(cis-acting repressing element, NRe), 负调节 CP 活性. BCP 在 1 742-1 849 nt 区段, 包含 DR I 区、前 -C 和 C 基因的 2 种 mRNA 的起点; BCP 区段中有 4 个 TATA 盒样序列(TA), 其对于前 C mRNA 和前基因组 RNA 在体内的精确转录的起始是很重要的.

CP 调节 3.5 kb mRNA 的合成, 编码 HBeAg 前体和前基因组 C/P 蛋白, C 基因附近区段是 HBV 复制的关键性部位, 有多种调节序列. CP 和增强子 II 调节核壳蛋白的合成. CP 与 HBV 的肝细胞特异表达有关, 如以一种在大多数细胞中都有功能的金属硫蛋白(metallothionein) 启动子代替 CP, HBV DNA 即可在一种人的非肝细胞系 HeLa 细胞中表达. Lopez-Cabrera et al^[7]指出从老鼠肝细胞核提取物纯化的 CCAAT/ 增强子结合蛋白(C/enhancer binding protein, C/EBP), 是一个肝脏特异性的核因子, 在 CP 上至少结合了 5 个位点, 而其中的 3 个位点与增强子 II 重叠. C/EBP 在一定程度上激活了 CP 低浓度的表达, 但在高浓度反而抑制其表达. 肝细胞核因子 1 (hepatocyte nuclear factor I, HNF 1) 具有肝特异性, 能够激活许多肝特异性基因的转录活性. Wang et al^[8]研究了 HNF 1 对增强子 II 的影响, 他们指出 HNF1 可以激活 HeLa 细胞中增强子 II 的活性而这个细胞并不表达 HNF1, 并且抗检测的 HNF1 抑制其在 HepG2 细胞中的表达. 已鉴定 1 718-1 736 nt 区域是 HNF1 活性的靶位点. 这个区域与 HNF3 结合位点重叠, HNF3 是另一个通过增强子 II 调节 CP 活性的肝富集因子^[9]. HNF4 在增强子 I /X 基因启动子区有 1 个结合位点, 另 2 个结合位点则位于 CP 区内^[10]. 尽管 HNF4 与前面位点结合, 但其对病毒的转录无明显影响, 而另外两个位于 BCP 的位点都独立介导 HNF4 依赖的转录活性^[11].

3 C 基因启动子的突变及其生物学意义

乙肝的 X 基因在 1 643-1 850 nt, 增强子 II 在 1 627-1 774 nt 大部分重叠. 这一区段是病毒复制的重要调节区, 是转录、反转录和正链合成的起点, 也是多种细胞因子的结合部位. 这一区段的变异较易对病毒转录、复制等生物学特性产生影响.

CP 区变异并非独立的突变位点, 常是多位点变异的组合. BCP 上的双变异 1 762 nt 的 A2→T 和 nt1 764 的 G→A 在慢性 HBV 感染中较常见, 在肝衰竭的患者 1 638 nt T→C、1 673 nt C→T、1 727 nt A→T、1 730 nt C→G 变异出现的也较多. 变异涉及前 -C mRNA(1 790 ± 1 nt) 起始位点上游 28 bp AT 富集区的 TTAAA 序列(1 758-1 762 nt), 而前基因组 RNA 起始位点(1 818 nt) 上游 23 bp 的 ATAAATT 序列(1 789-1 795 nt) 仍然完整. 用于前 -C 和前基因组 RNA 合成的启动子元件不同, 是分开调节的. BCP 控制前 -C 和 C RNA 的转录. 前 -C RNA 编码分泌的 HBeAg; 而 C RNA 编码核心蛋白、DNAp 和前基因组 RNA. 变异株合成 HBeAg 的水平降低, 合成 HBcAg

无影响, 而病毒复制反可增强, 核心颗粒也比野毒株多 2-4 倍^[12]. Kidd-Ljunggren et al^[13] 从不同基因型的 59 株 HBV 和不同 HBeAg/ 抗 HBe 状态的患者分析, 前 -C 和前基因组 RNA 的起始密码和 TATA 元件高度保守, CP 区的绝大多数缺失会导致转译读框迁移和终止, 截短 X 蛋白的 C 末端. CP 中 1 762-1 764 nt 变异抑制 HBeAg 产生而病毒产生增强. 1 762 nt 及 / 或 1 764 nt 变异常伴随 1 751-1 755 nt 的点突变. 对 HBeAg 表达的抑制作用: Buckwold et al^[14] 研究发现肝内富集的转录因子可结合于 DNA 覆盖 1 762 nt 和 1 764 nt, 变异的 BCP 可能改变这种结合, 降低前 -C RNA 的转录, 最终使 HBeAg 平均降低 70%. 这一双变异抑制, 并不终止 HBeAg 的表现型. 前 -C 基因表达减少但不影响前基因组 RNA 的合成. 增强前基因组 RNA 的包装, 子代病毒产生增加. Gunther et al^[15] 发现, HBV 1 762 nt 和 1 764 nt 变异株与活动性肝炎、移植后的严重肝病、肝细胞癌相关, 联合 1 653 nt 变异、与急性暴发性过程相关. 这些变异降低前 -C mRNA 水平(低 55 %) 和 HBeAg 分泌, 但对前基因组 /C 和前 -S/S mRNA、细胞内核心、聚合酶和前 -S/S2 蛋白和 S 抗原分泌无显著影响. 在细胞内和培养液中的子代病毒 DNA 量稍增加. 对病毒复制的调节作用: 一方面, HBV/CP 的转录活性可被炎症因子调节. 肿瘤坏死因子 TNF α、IFN γ 和 IFN α 都可降低病毒的转录活性 40%. Romero et al^[16] 证实 HBV DNA 含有与转录蛋白相一致的元件, 其结合活性可由炎症细胞因子调节. TNF α、IFN γ 和 IFN α 各降低报告构件虫萤光素酶活性 40%, TNF α 和 IFN γ 合用抑制程度倍增. 为维持 TNF α 效应必须保留 C/P 转录开始部位上游 330 bp, 以 TNF α 处理转染 HBV DNA 的 HepG2 细胞, 在细胞内核心颗粒中的复制型 HBV 降低 60%. 这些细胞因子的抑制作用, 提示一种非细胞溶解机制在感染肝细胞中由抗原非特异免疫应答部分调节 HBV 的复制. 另一方面, BCP 变异导致高水平复制, 这一变异株显示为前基因组 RNA 增强的表现型. HBV 复制只能在核心颗粒内, 是在前基因组 RNA、HBcAg 和 DNAp 之间相互作用而装配成的. BCP 变异使前基因组 RNA 转录仅稍有增强(2-3 倍), 而病毒包装则有很大增强(>10 倍), BCP 变异因包装功能增强而提高复制水平. Baumert et al^[17] 曾在暴发性肝炎相关的一株 HBV 的核心启动子中鉴定出 2 处变异(1 768 nt C 变 T 和 1 770 nt T 变 A), 因前基因组 RNA 进核心颗粒的病毒包装增加使复制提高. 这两处变异增加核心蛋白合成 15 倍, 从而增加病毒包装; 而前基因组 RNA 的转录只增加 2 倍, 反转录的聚合酶也只增加 2 倍, 复制增强也只在核心蛋白增加时. 这些结果提示 HBV/CP 在转录和转录后水平调节核心蛋白表达.

另一解释是 CP 区变异产生了肝细胞核因子(HNF-1) 的结合位点, 因这一转录因子的介导, 使前 -C mRNA 水平下降, 从而使 HBeAg 减少; 而 C mRNA 和前基因组 RNA 水平则增高, 因而病毒复制增加^[18]. Chan et al^[19] 研究表明, 慢性 HBV 感染 45 例患者 HBeAg/ 抗 -HBe 转换后 92 % 有

CP 或前 C 变异, 其中 42 % 仅 CP、38 % 仅终止密码子、12 % 同时有 2 种变异. 血清 HBeAg/抗-HBe 转换后 73 % 的患者持续血清转氨酶正常, 仅 8 % 有多次增高. 1 858 nt 是 C 的基因型感染 CP 变异较常见(91 % : 27 %, $P < 0.01$); 而前 -C 终止密码子仅见于 1 858 nt, 是 T 的基因型(87 % : 0 $P < 0.01$). CP 变异选择妨碍发生前 C 终止密码子的基因型.

HBV 在覆盖 CP 的区域利用其基因组的经济性是非常明显的, 跨越 CP 区域(1 591-1 849 nt)的 DNA 一定数量的重要功能. 首先, 他包含了在体内具有双重功能的增强子 II: 其激活下游位点的 S 及 X 基因启动子活性和上游位点的 CP 启动子活性. 其次, 在这个区域内的 BCP 调控前 -C mRNA 和前基因组 RNA 的转录. 而且, CP 的 3' 末端与编码 HBeAg 的前 C/C ORF 的 5' 末端相互重叠, DR1 也包括在此区域内. 再者, CP 区与编码 X 蛋白的 X ORF 序列重叠, 而 X 蛋白的 C 末端以证明具有反式激活作用. 因此一些在 CP 内的 DNA 基因序列突变可以影响病毒的复制、HBeAg 的生成以及 X 蛋白的氨基酸序. CP 区基因序列的保守性对于维持病毒的活跃复制是非常关键的, 而且他的变异与病毒在宿主体内持续表达导致乙型肝炎慢性感染、最终引起肝细胞癌的发生是密不可分的^[20].

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 1 896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 6 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2001:25-33
- 7 Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology* 1991;183:825-829
- 8 Wang WX, Li M, Wu X, Wang Y, Li ZP. HNF1 is critical for the liver-specific function of HBV enhancer II. *Res Virol* 1998;149:99-108
- 9 Johnson JL, Raney AK, McLachlan A. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology* 1995;208:147-158
- 10 Raney AK, Johnson JL, Palmer CN, McLachlan A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol* 1997;71:1058-1071
- 11 YU X, Mertz JE. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoter of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J Virol* 1997;71:9366-9374
- 12 Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997; 233:374-381
- 13 Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH. Hepatitis B virus X gene 1 751 to 1 764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J Virol* 1997;78:1469-1478
- 14 Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-5851
- 15 Gunther S, Piwon N, Will H. Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1 653)→T,A(1 762)→T and G(1 764)→A mutations in the core promoter. *J Gen Virol* 1998;79:375-380
- 16 Romero R, Lavine JE. Cytokine inhibition of the hepatitis B virus core promoter. *Hepatology* 1996;23:17-23
- 17 Baumert TF, Marrone A, Vergalla J, Liang TJ. Naturally occurring mutations define a novel function of the hepatitis B virus core promoter in core protein expression. *J Virol* 1998;72:6785-6795
- 18 Pult I, Chouard T, Wieland S, Klemenz R, Yaniv M, Blum HE. A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology* 1997;25:1507-1509
- 19 Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis Be antigen seroconversion. *Hepatology* 1999;29:976-984
- 20 Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1999;6:415-427

乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究

王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰

王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 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@genetheray.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰. 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1008-1011

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1008.asp>

0 引言

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. 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(preS/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. 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^[1-4]. 其中增强子的作用主要是调控 HBV 的转录和复制.

1 HBV 增强子的结构

增强子是指能使他连锁的基因转录频率明显增加的 DNA

CP 或前 C 变异, 其中 42 % 仅 CP、38 % 仅终止密码子、12 % 同时有 2 种变异. 血清 HBeAg/ 抗 -HBe 转换后 73 % 的患者持续血清转氨酶正常, 仅 8 % 有多次增高. 1 858 nt 是 C 的基因型感染 CP 变异较常见(91 % : 27 %, $P < 0.01$); 而前 -C 终止密码子仅见于 1 858 nt, 是 T 的基因型(87 % : 0 $P < 0.01$). CP 变异选择妨碍发生前 C 终止密码子的基因型.

HBV 在覆盖 CP 的区域利用其基因组的经济性是非常明显的, 跨越 CP 区域(1 591-1 849 nt)的 DNA 一定数量的重要功能. 首先, 他包含了在体内具有双重功能的增强子 II: 其激活下游位点的 S 及 X 基因启动子活性和上游位点的 CP 启动子活性. 其次, 在这个区域内的 BCP 调控前 -C mRNA 和前基因组 RNA 的转录. 而且, CP 的 3' 末端与编码 HBeAg 的前 C/C ORF 的 5' 末端相互重叠, DR1 也包括在此区域内. 再者, CP 区与编码 X 蛋白的 X ORF 序列重叠, 而 X 蛋白的 C 末端以证明具有反式激活作用. 因此一些在 CP 内的 DNA 基因序列突变可以影响病毒的复制、HBeAg 的生成以及 X 蛋白的氨基酸序. CP 区基因序列的保守性对于维持病毒的活跃复制是非常关键的, 而且他的变异与病毒在宿主体内持续表达导致乙型肝炎慢性感染、最终引起肝细胞癌的发生是密不可分的^[20].

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 1 896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 6 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2001:25-33
- 7 Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology* 1991;183:825-829
- 8 Wang WX, Li M, Wu X, Wang Y, Li ZP. HNF1 is critical for the liver-specific function of HBV enhancer II. *Res Virol* 1998;149:99-108
- 9 Johnson JL, Raney AK, McLachlan A. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology* 1995;208:147-158
- 10 Raney AK, Johnson JL, Palmer CN, McLachlan A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol* 1997;71:1058-1071
- 11 YU X, Mertz JE. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoter of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J Virol* 1997;71:9366-9374
- 12 Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997; 233:374-381
- 13 Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH. Hepatitis B virus X gene 1 751 to 1 764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J Virol* 1997;78:1469-1478
- 14 Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-5851
- 15 Gunther S, Piwon N, Will H. Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1 653)→T,A(1 762)→T and G(1 764)→A mutations in the core promoter. *J Gen Virol* 1998;79:375-380
- 16 Romero R, Lavine JE. Cytokine inhibition of the hepatitis B virus core promoter. *Hepatology* 1996;23:17-23
- 17 Baumert TF, Marrone A, Vergalla J, Liang TJ. Naturally occurring mutations define a novel function of the hepatitis B virus core promoter in core protein expression. *J Virol* 1998;72:6785-6795
- 18 Pult I, Chouard T, Wieland S, Klemenz R, Yaniv M, Blum HE. A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology* 1997;25:1507-1509
- 19 Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis Be antigen seroconversion. *Hepatology* 1999;29:976-984
- 20 Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1999;6:415-427

乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究

王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰

王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 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@genetheray.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰. 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1008-1011

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1008.asp>

0 引言

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. 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(preS/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. 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^[1-4]. 其中增强子的作用主要是调控 HBV 的转录和复制.

1 HBV 增强子的结构

增强子是指能使他连锁的基因转录频率明显增加的 DNA

序列, 其增强作用相对不依赖于他的位置、方向以及目标启动子的距离, 无基因专一性, 可在不同基因组合中表现增强效应. 其功能主要是通过调节蛋白相互作用刺激特定的一个或一组基因的基础转录活性. 增强子常由一个或多个连续或不连续的DNA序列元件组成, 并与特异的蛋白质相互作用. 这些DNA结合蛋白可由病毒本身编码, 也可由宿主细胞编码. HBV的两个增强子分别为Enh I和Enh II.

Enh I在S基因和X基因之间, 大约在1 070-1 234 nt前后加減100 bp的区段, 实际只需50个核苷酸的短小序列, 即可保持其主要功能. Enh I定位在P基因中, 末端与X基因启动子重叠. 可增强C、SP I、SP II和X启动子的转录, 但效率不同, 如对下游的C启动子比X启动子的增强作用高60倍. Enh I对启动子的作用不是直接的, 而是通过与Enh II的协同作用^[5]. Enh II大约在1 627-1 774 nt, 定位在X基因中, 末端含CP, 可分为Enh II -A和Enh II -B两部分. A部分是正调节元件, 主要参与Enh II的肝细胞专一性, 而B片段是Enh II的活性单位, 前者必需与后者协同作用才有活性. B部分有60-70%的Enh II活性, 又可分为B1(1 687-1 705 nt)、B2(1 706-1 736 nt)和B3(1 737-1 774 nt)三个亚区. 前两部分是主要功能区, B2是主要转录因子的结合位点^[6].

2 HBV增强子的调控研究

许多因子通过调控HBV Enh活性进而调控HBV在体内的转录与复制, 其机制主要是直接作用于Enh上的相应的结合位点, 也有一些因子作用机制主要是通过反式激活作用. HBV Enh自身基因结构的突变对HBV Enh的活性也有一定影响. HBV Enh的调控研究对于了解HBV在体内转录及复制调控机制, HBV感染的致病机制和抗病毒药物的研发有重要意义.

2.1 可上调HBV增强子的因子 Waris et al^[7]研究发现, 信号转导子及转录激活子(STAT)蛋白家族中的STAT3和HNF-3的相互作用可引起HBV Enh I功能激活. STAT-3与许多转录调控因子有关并调控与细胞因子有关的基因表达. 虽然其功能与他的核苷酸序列有关, 近来发现其在发生了DNA缺失后可与其他转录因子发生相互作用. STAT-3结合位点定位于HBV Enh I核心区域. 白介素6(IL-6)和表皮生长因子可刺激HBV Enh I的DNA-STAT-3相互作用, 导致HBV Enh I表现完全的激活作用和病毒基因的表达. 应用瞬时转染的方法, 上述作用得到证实. 还有人发现IL-6通过单信号转导的方式, 间接通过他的转录因子NF-IL-6上调Enh I活性^[8]. Wang et al^[9]研究还发现HNF1与Enh II B2位点结合, 可以上调Enh II活性.

Raney et al^[10]研究发现过氧化物酶体增生物(PPAR)可通过HBV基因组Enh I区域的核激素受体识别位点直接增强病毒的转录作用. 实验发现: 一种转基因小鼠的

HBV核酸启动子突变(A1 764T加G1 766A)的可以抑制视黄醛受体 α (RXR- α)和PPAR- α 异二聚体结合近端的核激素受体识别序列. 在这些发生突变的转基因鼠中, PPAR使肝内病毒转录和复制的增加并没有受病毒核酸启动子的突变影响. 这表明过PPAR可通过HBV基因组Enh I区域的核激素受体识别位点直接以PPAR- α 方式增强病毒的转录作用.

SP1有两个结合位点在核心启动子, 一个在他的调控元件上游, 也被叫做Enh II增强子. Li et al^[11]研究发现, 在Enh II增强子的SP1结合位点(SP1-3)可以正向调节所有HBV基因的表达. 当他通过突变被去掉后, 所有HBV基因的表达被抑制. 然而, 如果在核心启动子的两个SP1位点也被去除了, Sp1-3突变对S基因和X基因的抑制作用将消失. 这些结果提示SP1既可以作为HBV基因表达的阳性调节因子, 也可以作为阴性调节因子. 这种二重作用对于调节HBV基因的表达非常重要. Ishida et al^[12]研究发现, 多重转录因子HLF, FTF, 可调控HBV Enh II, 激活HBV的转录作用. HBV Enh II活性必需的重要的区域为1 640-1 663 nt. 应用酵母单杂交技术从人肝cDNA文库筛选与本区域相关的因子HLF, FTF, 所有这些因子与1 640 -1 663 nt序列有亲和性. 关于这些因子调控转录方面的研究显示HLF和FTF对1 640-1 663 nt有刺激活性. 在瞬时转染HBV表达载体体系, FTF可同时激活转录3.5 kb的RNA和2.4/2.1 kb的RNA. HLF仅转录. 5 kb的RNA. 应用引物延伸分析, HLF强烈刺激前基因组RNA的合成, 较前C区RNA明显. FTF刺激Enh II活性, 而HLF激活仅调节核心启动子的核心上游调节序列, 对前基因组RNA的合成有决定性的作用.

一些因子通过反式激活作用也可以上调增强子活性. Lee et al^[13]研究发现, 通过人肝细胞Enh I的E因子的AP1位点, 人乳头瘤病毒16型EP6蛋白(HPV-16 E6)和HBV X蛋白对HBV前基因组有反式激活作用. 提示HPV-16可以增强HBV和其他启动子含有AP1位点的癌基因的转录活性. HBx反式激活Enh I对全基因组或亚基因组启动子控制下的转录; 而Enh I又增强了反式激活的易感性. Kwon et al^[14]研究发现, HBV核心蛋白通过核因子 κ B(NF- κ B)结合位点(GGGACGTACT, 核酸序列1 408-1 417)激活HBV Enh II. 通过反式激活作用激活Enh II/前基因组启动子, 促进HBV DNA转化的还有HBV X蛋白和CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)^[15].

2.2 可下调HBV增强子的因子 Sun et al^[16]研究发现一种阴性调节因子(NRE)定位于HBV核心启动子调节序列的上游和Enh II, 并抑制这两个部分的转录和复制. 通过表达克隆化得到阴性调节蛋白(NREBP), 发现内源性的NREBP定位于人肿瘤细胞HuH-7细胞的细胞核. NREBP蛋白抗体可以特异性的阻断NRE活性, 提示NREBP为与NRE序列关联的内源性蛋白. 通过PCR辅助结合位点的方法, 发现NREBP的共有序列为GA(G/T)AN(C/G)(A/

G)CC. NREBP的过表达通过NRE可增强对HBV核心启动子的抑制作用。

Lee et al^[17,18]研究发现p53抑制HBV Enh/X启动子活性。同时还通过抑制Enh II抑制核心启动子转录活性。HBx可对抗这种作用。Lai et al^[19]研究发现E4BP4通过结合位点阻断的机制抑制Enh II/CP活性,进而抑制HBV DNA的转录。

某些抗病毒、免疫抑制药物通过抑制HBV增强子起到抑制HBV复制和转录的作用。IFN- α 通过抑制Enh I活性抑制HBV表达^[20], IFN- α 诱导转录因子, 干扰素基因因子3 (ISGF3)和干扰素调节因子1 (IRF-1)通过与基因启动子为“AGTTTCNNTTTCNC”的干扰素激活反应元件(ISRE)结合激活干扰素诱导基因的表达。Nakao et al^[21]研究发现p48 (ISGF3- β)参与IFN- α 诱导的抑制HBV Enh I活性。HBV Enh I有ISRE类似序列“AGGCTTTCACCTTCTC”。从HuH-7细胞提取结合了这个序列的提取物用IFN- α 处理后仅包含p48。在细胞感染中, IFN- α 抑制HBV Enh I活性, 过表达的p48提高这种抑制作用。HBV Enh I的这种ISRE类似序列的突变或缺失都可以降低IFN- α 的抑制作用。HBV Enh I的SRE类似序列与p48蛋白相互作用, 介导IFN- α 诱导的对增强子活性的抑制作用。然而, Schulte-Frohlinde et al^[22]研究发现IFN诱导的抑制作用不依赖于HBV-Enh I的存在而是由于ISRE类似序列的作用。Lee et al^[23]研究发现, T细胞核因子(NFAT1-C)通过其的应答位点GGAGA和使HBx-driven失去转录活性抑制HBV Enh II/CP活性。敏感的NFAT1免疫抑制药物环孢素A(CsA)是在免疫反应中细胞因子和病毒基因的转录调节因子。通过分析一系列缺失突变和异种启动子的检测, 发现CsA敏感的NFAT1-C通过NFAT1-C的应答位点(GGAGA, nt 1603-1618)和以剂量依赖方式使HBx失去转录活性抑制Enh II/CP的转录活性。这些结果表明CsA敏感性NFAT1-C可以通过抑制HBV Enh II/CP转录活性来控制HBV感染细胞的活动。

David-Cordonnier et al^[24]发现: c-Myb蛋白与HBV Enh EP相关并且与NF-M协同调控转录。EP因子为HBV增强子中的活性结构, 他的一个15 bp的位点由于受其他功能位点如E位点调控而非常重要。EP因子可能包括两个结合c-myb基因家族产物的位点。DNase I阻遏物实验提示只有一个结合位点有保护作用。通过造血细胞(K562)和肝细胞系(HepG2)的CAT测定发现c-Myb基因可下调HBV Enh的转录活性。c-Myb和可以识别HBV Enh E因子的C/EBP β 的同源物质NF-M的共同表达对HBV Enh有协同的抑制作用, 并且他们每一个对感染HBV的HepG2和K562细胞系的转录单独都有抑制作用。

2.3 基因突变引起HBV增强子活性的改变 HBV Enh某些位点的基因突变可引起增强子活性的改变。Xie et al^[25]研究了HBV Enh II B1因子位点专一突变对病毒转录和复制的影响。HBV Enh II有高度的肝脏专一性并且对调

节所有HBV基因的转录有重要作用。HBV Enh II主要的功能位点B1FB1F结合位点缺失时, 在E II-CAT报告质粒中HBV Enh II的活性显著降低。此外, B1因子的点突变使B1F结合失败可明显降低起始与HBV核心启动子的病毒基因的转录, 结果导致HBV e抗原、前基因组RNA和病毒复制的模板DNA产量减少。因此, B1F与其在E II区域上的靶序列的相互作用对HBV的复制和转录十分重要。

Honda et al^[26]研究检测了与引起严重肝损害的有关区域的突变。在严重的HBV感染病例中, 大约50%的核苷酸变异定位于在全长1741-1777 (Enh II/CP启动子区域的14.2%)区域内, 30%的X蛋白的氨基酸变异定位于包含122-132 (X蛋白的7.1%)密码子的区域。除了在前C区和C区的变异之外, 在Enh II/CP启动子和X蛋白区域的变异对严重的HBV感染的发病机制有关。Honda et al^[27]研究亦得到了类似的结果。

3 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 Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 1987;56:651-693
- 4 Moolla N, Kew M, Arbuthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J Viral Hepat* 2002;9:323-331
- 5 Fu L, Wu X, Kong YY, Wang Y. Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 1996;28:590-599
- 6 Wu X, Zhu L, Li ZP, Koshy R, Wang Y. Functional organization of enhancer (ENII) of hepatitis B virus. *Virology* 1992;191:490-494
- 7 Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002;76:2721-2729
- 8 Ohno H, Kaneko S, Kobayashi K, Murakami S. Human hepatitis B virus enhancer 1 is responsive to human interleukin-6. *J Med Virol* 1997;52:413-418
- 9 Wang WX, Li M, Wu X, Wang Y, Li ZP. HNF1 is critical for the liver-specific function of HBV enhancer II. *Res Virol* 1998;149:99-108
- 10 Raney AK, Kline EF, Tang H, McLachlan A. Transcription and replication of a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is regulated in vivo by peroxisome proliferators. *Virology* 2001;289:239-251
- 11 Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- 12 Ishida H, Ueda K, Ohkawa K, Kanazawa Y, Hosui A, Nakanishi F, Mita E, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II. *J Virol* 2000;74:1241-1251
- 13 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
- 14 Kwon JA, Rho HM. Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site. *Biochem Cell Biol* 2002;80:445-455
- 15 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
- 16 Sun CT, Lo WY, Wang IH, Lo YH, Shiou SR, Lai CK, Ting LP. Transcription repression of human hepatitis B virus genes by negative regulatory element-binding protein/SON. *J Biol Chem* 2001;276:24059-24067
 - 17 Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* 2000;19:468-471
 - 18 Lee H, Kim HT, Yun Y. Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression. *J Biol Chem* 1998;273:19786-19791
 - 19 Lai CK, Ting LP. Transcriptional repression of human hepatitis B virus genes by a bZIP family member, E4BP4. *J Virol* 1999;73:3197-3209
 - 20 Alcantara FF, Tang H, McLachlan A. Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer I region of the hepatitis B virus genome. *Nucleic Acids Res* 2002;30:2068-2075
 - 21 Nakao K, Nakata K, Yamashita M, Tamada Y, Hamasaki K, Ishikawa H, Kato Y, Eguchi K, Ishii N. p48 (ISGF-3gamma) is involved in interferon-alpha-induced suppression of hepatitis B virus enhancer-1 activity. *J Biol Chem* 1999;274:28075-28078
 - 22 Schulte-Frohlinde E, Seidler B, Burkard I, Freilinger T, Lersch C, Erfle V, Foster GR, Classen M. Different activities of type I interferons on hepatitis B virus core promoter regulated transcription. *Cytokine* 2002;17:214-220
 - 23 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
 - 24 David-Cordonnier MH, Hamdane M, D' Halluin JC. c-Myb protein binds to the EP element of the HBV enhancer and regulates transcription in synergy with NF-M. *Biochim Biophys Acta* 1999;1446:82-92
 - 25 Xie Y, Li M, Wang Y, Hofschneider PH, Weiss L. Site-specific mutation of the hepatitis B virus enhancer II B1 element: effect on virus transcription and replication. *J Gen Virol* 2001;82:531-535
 - 26 Honda A, Yokosuka O, Suzuki K, Saisho H. Detection of mutations in hepatitis B virus enhancer 2/core promoter and X protein regions in patients with fatal hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2000;62:167-176
 - 27 Honda A, Yokosuka O, Ehata T, Tagawa M, Imazeki F, Saisho H. Detection of mutations in the enhancer 2/core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection: comparison with mutations in precore and core regions in relation to clinical status. *J Med Virol* 1999;57:337-344

丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究

杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

杨艳杰, 成军, 钟彦伟, 张忠东, 李强, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
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@genetheray.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):1011-1014

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1011.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是1989年应用分子生物学技术克隆

成功的一个RNA病毒, 属黄病毒科, 可引起慢性肝炎、肝硬化及肝细胞肝癌, 目前有1.7亿人感染, 干扰素联合利巴韦林是其治疗方案, 但是疗效不佳^[1-9]. 目前世界各国都在积极研究其发病机制, 探索新的治疗措施. 但由于HCV的宿主范围较窄, 只能在人及黑猩猩中繁殖, 为研究带来一定困难. HCV是怎样与宿主细胞相互作用的, 世界上进行了广泛的研究. 现在一致认为病毒进入到肝细胞后, 肝炎病毒蛋白在肝细胞内不是孤立存在, 病毒基因组在肝细胞内有两种调节方式; 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, 以表达产物的间接方式参与另外一些基因功能调节, 可以对基因组内部的基因, 甚至对其他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分子生物学机制之一^[6-8]. 特别是HCV各蛋白组分(C、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a和NS5b)与人体蛋白之间的相互作用, 为HCV所致疾病的发病机制提供了线索.

1 丙型肝炎病毒基因组基本结构

HCV基因组是一单股正链RNA, 全长大约由9 400核苷酸(nucleotide, nt)组成, 含有一个大的开放读码框架(open reading frame, ORF), ORF几乎跨越HCV基因组, 可编码一大约3 010个氨基酸残基(aa)的病毒前体蛋白(precursor polyprotein). HCV基因组5' -末端为非编码区(untranslating region, 5' -UTR), 位于ORF的上游, 含有3~4个小的ORF. HCV基因组的3' -末端为3'非编码区(3' -UTR), 位于ORF的下游, 可含有多聚(A)或多聚(U)尾. 5' -UTR和3' -UTR在病毒的复制和稳定病毒的生物学形状等方面起重要作用. 根据所编码蛋白的结构和功能, 可将基因组分为结构基因(structural gene)和非结构基因(nonstructural gene). 结构基因分为核心区(core region)和包膜基因(envelope gene), 分别编码病毒的核心蛋白和包膜蛋白, 这些蛋白参与病毒颗粒的组装, 故又称结构蛋白. 非结构(NS)基因包括NS2、NS3、NS4和NS5基因, 分别编码NS2-5等4种蛋白, 这些蛋白不构成病毒颗粒的结构成分, 主要与病毒的复制有关, 如作为信号酶、螺旋酶和RNA聚合酶等, 故又称为非结构蛋白或功能蛋白. 不同国家和地区分离的HCV株其基因结构有一定的差别. HCV基因组结构与人类黄病毒属和动物瘟病毒属中某些病毒如日本脑炎病毒、登革热病毒和牛腹泻病毒等基因组有许多共同特征, 这些共同特征对于了解HCV分子生物学特性很有帮助. 这些共同特征包括: (1)病毒基因组长度相似, 复制时都先编码一个大的病毒前体蛋白, 然后在病毒和宿主的蛋白酶的作用下

- promoter. *J Biol Chem* 1999;274:2858-2865
- 16 Sun CT, Lo WY, Wang IH, Lo YH, Shiou SR, Lai CK, Ting LP. Transcription repression of human hepatitis B virus genes by negative regulatory element-binding protein/SON. *J Biol Chem* 2001;276:24059-24067
 - 17 Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* 2000;19:468-471
 - 18 Lee H, Kim HT, Yun Y. Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression. *J Biol Chem* 1998;273:19786-19791
 - 19 Lai CK, Ting LP. Transcriptional repression of human hepatitis B virus genes by a bZIP family member, E4BP4. *J Virol* 1999;73:3197-3209
 - 20 Alcantara FF, Tang H, McLachlan A. Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer I region of the hepatitis B virus genome. *Nucleic Acids Res* 2002;30:2068-2075
 - 21 Nakao K, Nakata K, Yamashita M, Tamada Y, Hamasaki K, Ishikawa H, Kato Y, Eguchi K, Ishii N. p48 (ISGF-3gamma) is involved in interferon-alpha-induced suppression of hepatitis B virus enhancer-1 activity. *J Biol Chem* 1999;274:28075-28078
 - 22 Schulte-Frohlinde E, Seidler B, Burkard I, Freilinger T, Lersch C, Erfle V, Foster GR, Classen M. Different activities of type I interferons on hepatitis B virus core promoter regulated transcription. *Cytokine* 2002;17:214-220
 - 23 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
 - 24 David-Cordonnier MH, Hamdane M, D' Halluin JC. c-Myb protein binds to the EP element of the HBV enhancer and regulates transcription in synergy with NF-M. *Biochim Biophys Acta* 1999;1446:82-92
 - 25 Xie Y, Li M, Wang Y, Hofschneider PH, Weiss L. Site-specific mutation of the hepatitis B virus enhancer II B1 element: effect on virus transcription and replication. *J Gen Virol* 2001;82:531-535
 - 26 Honda A, Yokosuka O, Suzuki K, Saisho H. Detection of mutations in hepatitis B virus enhancer 2/core promoter and X protein regions in patients with fatal hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2000;62:167-176
 - 27 Honda A, Yokosuka O, Ehata T, Tagawa M, Imazeki F, Saisho H. Detection of mutations in the enhancer 2/core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection: comparison with mutations in precore and core regions in relation to clinical status. *J Med Virol* 1999;57:337-344

丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究

杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

杨艳杰, 成军, 钟彦伟, 张忠东, 李强, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
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@genetheray.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):1011-1014

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1011.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是1989年应用分子生物学技术克隆

成功的一个RNA病毒, 属黄病毒科, 可引起慢性肝炎、肝硬化及肝细胞肝癌, 目前有1.7亿人感染, 干扰素联合利巴韦林是其治疗方案, 但是疗效不佳^[1-9]. 目前世界各国都在积极研究其发病机制, 探索新的治疗措施. 但由于HCV的宿主范围较窄, 只能在人及黑猩猩中繁殖, 为研究带来一定困难. HCV是怎样与宿主细胞相互作用的, 世界上进行了广泛的研究. 现在一致认为病毒进入到肝细胞后, 肝炎病毒蛋白在肝细胞内不是孤立存在, 病毒基因组在肝细胞内有两种调节方式; 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, 以表达产物的间接方式参与另外一些基因功能调节, 可以对基因组内部的基因, 甚至对其他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分子生物学机制之一^[6-8]. 特别是HCV各蛋白组分(C、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a和NS5b)与人体蛋白之间的相互作用, 为HCV所致疾病的发病机制提供了线索.

1 丙型肝炎病毒基因组基本结构

HCV基因组是一单股正链RNA, 全长大约由9 400核苷酸(nucleotide, nt)组成, 含有一个大的开放读码框架(open reading frame, ORF), ORF几乎跨越HCV基因组, 可编码一大约3 010个氨基酸残基(aa)的病毒前体蛋白(precursor polyprotein). HCV基因组5' -末端为非编码区(untranslating region, 5' -UTR), 位于ORF的上游, 含有3~4个小的ORF. HCV基因组的3' -末端为3'非编码区(3' -UTR), 位于ORF的下游, 可含有多聚(A)或多聚(U)尾. 5' -UTR和3' -UTR在病毒的复制和稳定病毒的生物学形状等方面起重要作用. 根据所编码蛋白的结构和功能, 可将基因组分为结构基因(structural gene)和非结构基因(nonstructural gene). 结构基因分为核心区(core region)和包膜基因(envelope gene), 分别编码病毒的核心蛋白和包膜蛋白, 这些蛋白参与病毒颗粒的组装, 故又称结构蛋白. 非结构(NS)基因包括NS2、NS3、NS4和NS5基因, 分别编码NS2-5等4种蛋白, 这些蛋白不构成病毒颗粒的结构成分, 主要与病毒的复制有关, 如作为信号酶、螺旋酶和RNA聚合酶等, 故又称为非结构蛋白或功能蛋白. 不同国家和地区分离的HCV株其基因结构有一定的差别. HCV基因组结构与人类黄病毒属和动物瘟病毒属中某些病毒如日本脑炎病毒、登革热病毒和牛腹泻病毒等基因组有许多共同特征, 这些共同特征对于了解HCV分子生物学特性很有帮助. 这些共同特征包括: (1)病毒基因组长度相似, 复制时都先编码一个大的病毒前体蛋白, 然后在病毒和宿主的蛋白酶的作用下

分解成单一病毒蛋白; (2)NS3 和 NS5 蛋白中某些部位氨基酸序列有高度同源性. 如第 1 230-1 500 位有能与 NTP 结合的螺旋酶残基, 第 2 703-2 739 位含 Gly-Asp-Asp 基元, 这在病毒编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶方面具有高度保守性; (3)病毒蛋白的疏水性相似, 由此可以研究病毒蛋白的抗原性及其可能在宿主细胞内的存在部位.

2 HCV 核心蛋白结构及其对基因的调节作用

HCV 核心区基因位于 HCV 基因组 1-573 nt 位点, 编码核衣壳蛋白(又称之为核心蛋白或 C 蛋白). C 蛋白由 191 个氨基酸残基组成, 分子量为 21 kD, 其中含有许多脯氨酸、精氨酸和赖氨酸残基, 因而表现为嗜碱性. 完整重组 C 蛋白称 p22, 本身缺乏 N-糖基化位点, 其 C 端 20 个氨基酸具有高度疏水性, 可能是作为信号序列(signal sequence). p22 在参与病毒组装前, 需要进一步加工和修饰, 能较好地保证检测感染者血清中相应的抗体.

近年来研究发现, C 蛋白具有对多种基因的调控作用. HCV 和 HBV 重叠感染的一个重要特征是出现病毒干扰现象, 即导致乙型肝炎病毒(HBV)病毒血清标志物的消失或病毒复制水平的下降. 为探讨这一现象的发生机制, 有研究者构建了全长和部分长度的 HCV 结构区(C、E1 和 E2/NS1)基因表达载体, 然后与 HBV 表达载体共转染人肝癌细胞系 HuH-7 细胞. 结果发现, HBsAg 和 HBeAg 表达量均明显减少, 释放入培养细胞上清液的病毒颗粒也明显减少. 如果用完整的或编码 N 端 122 aa 的 C 区基因替代上述 HCV 结构区, 可以得到类似的结果, 表明 HCV C 基因及其表达与 HBV 基因组的复制和表达明显相关. 提取细胞核中的 RNA 所做的 Northern 印迹实验显示, HBV 前基因组 RNA 的产生也同时减少, 提示这种抑制作用可能发生在转录水平以及前基因组 RNA 衣壳化(encapsidation), 其进入胞核内的时间(第 6 天)恰好与 HBV 出现复制和表达减少的时间相吻合, 因而得出结论, 上述抑制作用是由 HCV C 基因的表达产物 -C 蛋白所致, C 蛋白可能是一种基因调节蛋白的说法也由此而生.

C 蛋白的磷酸化 - 去磷酸化是实现 HBV 复制抑制的重要条件. 对 C 蛋白的磷酸化过程进行了研究发现, 其磷酸化是由蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 催化完成, 磷酸化位点位于 C 蛋白 99 位和 116 位 aa, 如果采用点突变方法, 将这两个丝氨酸换成丙氨酸, 丧失了对 HBV 的抑制作用, 说明 C 蛋白对 HBV 的抑制受磷酸激酶 A 和磷酸激酶 C 的控制. C 蛋白对 HBV 复制的抑制作用的确切机制尚不清楚. 有研究观察到 C 蛋白能够结合 HBV 复制中间体, 因而推测可能通过影响 HBV 的翻译和装配实现抑制 HBV 复制效应.

此外研究发现, C 蛋白具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能, 对细胞信号转导途径, 尤其是 NF- κ B(nuclear factor- κ -gene binding)即 κ 基因结合核因子、激活蛋白 1 (activator protein-1,

AP-1)和血清效应元件 (serum reponse element, SRE)相关途径具有明显的增强作用, 影响相关的靶基, 如 c-myc、c-fos、c-jun 等基因, 劳氏肉瘤病毒长末端序列(long terminal repeat, LTR)、猴空泡病毒 40 早期启动子和 p53 基因启动子的功能^[10,11]. Giambartolomei et al^[12] 认为, 感染 HCV 的肝细胞发生肿瘤的机制是由于在稳定表达 C 蛋白的细胞系中干扰了肝细胞的正常信号转导过程. Lee et al^[13] 研究证实 HCV 核心在胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor II, IGF-II)的转录过程中充当着反式激活子的作用. HCV 核心蛋白通过 Sp1 和 Egr1 这 2 个顺式作用元件作用于 IGF-II 的启动子 4(P4)使内源性的 IGF-II 表达增强, 因 Sp1 和 Egr1 均可以结合到 IGF-II P4 上并能最大限度的调节其活性. 而且, HCV 核心刺激 SP1 和 Egr1 磷酸化, 并通过 HCV 核心的转染上调 SP1 和 Egr1 结合 DNA 的活性. 用 HCV 核心转染 HepG2 细胞可刺激蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)膜异位, 用钙磷酸蛋白 C (calphostin C, PKC 抑制剂)处理 HCV 核心转染的细胞, 可阻止 SP1 和 Egr1 诱导的 DNA 结合活性, 最终阻止 IGF-II 基因的反式激活转录在肝细胞癌发生过程中, 增强的 SP1 和 Egr1 磷酸化形式的 DNA 结合活性对于调节 IGF-II 基因表达和促进细胞分化或许是一个很重要的机制. 这个研究结果表明, HCV 核心蛋白通过 PKC 信号传导通路在 IGF-II 的转录中作为一个正调节因子, 而且 SP1 和 Egr1 是其在 IGF-II 转录调节过程的直接靶位, 这些对于 HCV 所致肝细胞癌的致病机制起着非常重要作用.

3 HCV 核心蛋白对蛋白的反式调节作用

HCV 核心蛋白与人体作用复杂, 有反式激活细胞基因表达的作用. 表达 HCV 核心蛋白的肝肿瘤细胞可以引起细胞脂肪变性, 转基因小鼠出现肿瘤, 因此 HCV 核心蛋白在肝脏疾病中起重要作用. 为了弄清其作用机制, 进行了很多研究, 其中蛋白之间的相互作用研究比较广泛.

HCV 核心蛋白与淋巴毒素 β 受体胞质尾部相互作用, Matsumoto 和 Chen et al^[14,15] 用酵母双杂交技术对人肝 cDNA 文库进行筛选, 一半以上的克隆都是淋巴毒素 β 受体(LT- β R)胞质域, 是肿瘤坏死因子受体家族的一个成员. 他们的结合被谷胱甘肽 S 转移酶(GST)融和蛋白结合实验和蛋白印迹分析所证实. 结合定位在这个受体的胞质尾部的 58 aa 区, 在核心蛋白上定位在 36-91 aa (蛋白亲水区). 在哺乳动物细胞中核心蛋白与膜 LT- β R 结合. 因为这个受体生发中心的形成以及外周淋巴样器官的发育调节, 淋巴结发育凋亡信号, HCV 核心蛋白与 LT- β R 结合, 表明这个蛋白可能有免疫调节功能, 可能解释病毒持续感染和发病机制. Owsianka et al^[16] 进一步证实 HCV 核心蛋白可与 LT- β R 结合, 在一些细胞中, 通过此通路核心蛋白起到调节作用. LT- β R/LT- α 1, β 2 受体 - 配体相互作用的已知作用是外周淋巴样器官和触发细胞裂解活性以及 NF- κ B 活性, 他们的发现

提示 HCV 核心蛋白增强 LT- β R 生物功能, 引起 HCV 感染细胞的发病。

核心蛋白与异源核糖核蛋白K (hnRNP K)结合. Hsieh et al^[16]鉴定出 hnRNP K 可以与核心蛋白相互作用, 这个蛋白证实是转录因子. 这两个蛋白可以部分共定位在核内. 核心蛋白结合 hnRNP K 的位置在 25-91 aa 区, 是氨基端的亲水区. hnRNP K 的核心蛋白结合域定位在 250-392 aa, 含有 3 个脯氨酸丰富区. 再者, HCV 核心蛋白可以释放 hnRNP K 对胸腺嘧啶激酶基因启动子的抑制活性. 这两个蛋白的特异性结合可能破坏了 hnRNP K 多重功能, 部分地解释了 HCV 发病机制。

HCV 核心蛋白与细胞推定的 RNA 解旋酶相互作用, You et al^[17]为了了解 HCV 核心蛋白的反式激活机制, 克隆了一个 cDNA 编码的 DEAD 盒家族中推定的 RNA 解旋酶称为 CAP-Rf, 与别的 RNA 解旋酶(如 DBX 和 DBY 鼠 mDEAD3 和 PL10, 这个家族的蛋白一般涉及翻译、剪切, 发育和细胞生长)具有 95% 同源性. HCV 核心蛋白的全长成熟形式和 C 末端截短形式均可以和这个蛋白结合. HCV 结合区域定位在氨基端的 40 aa 区及 CAP-Rf 的 C 末端, 这个区域包括 RNA 结合和 ATP 水解功能. 免疫印迹或免疫荧光分析表明内源性 CAP-Rf 主要定位在核中, 在细胞质中较少; 与 FLAG 标签融合后与 HCV 核心蛋白既在核内又在胞质中共定位. 与别的 RNA 解旋酶相似, 这个细胞 RNA 解旋酶具有核苷三磷酸酶-脱氧核苷三磷酸酶活性, 但这个活性可以被各种形式的同源多聚核苷所抑制, 被核心蛋白所加强. 再者在人肝肿瘤细胞系 Huh-7 中瞬时表达 HCV 核心蛋白增强了 CAP-Rf 反式激活活性. 总的来说 CAP-Rf 所涉及基因表达的调节及 HCV 核心蛋白启动 CAP-Rf 反式激活能力可能是通过复合体形式和 CAP-Rf ATPase 活性调节, 这些发现表明 HCV 已经进化了一种特殊机制, 通过其核壳蛋白涉及 RNA 代谢, 这个特征说明了核心蛋白对宿主细胞的多重作用。

HCV 核心蛋白与人 DEAD 盒蛋白 DDX3 相互作用, Owsianka et al^[18]用酵母双杂交克隆了推定的 RNA 解旋酶 C 末端 253 aa, DEAD 盒蛋白命名为 DDX3. 细菌表达 GST-DDX3 融合蛋白能特异地拉住体外翻译的放射标记的 HCV 核心蛋白. 用多克隆抗血清免疫荧光染色 HeLa 细胞显示 DDX3 融合蛋白主要位于核壳而胞质中较少. 用表达 HCV 的结构蛋白(core, E1, E2)的痘苗病毒感染细胞后 DDX3 和核心蛋白共定位在细胞质的核周区的特定区域. 结合区在核心蛋白的 C 末端 RS 样域. 人 DDX3 是推定的 RNA 解旋酶, 是一种高度保守的 DEAD 盒亚族 - 包括鼠 PL10 排列, 非洲爪蟾的 An3 和酵母的 Ded1 的一个成员. 他们在 RNA 代谢或基因表达中的作用是未知的。

Mamiya et al^[19]同样证明了 HCV 核心蛋白与 DEAD 盒的一 RNA 解旋酶结合. 用同样的方法分离到 DEAD 盒蛋白 DBX. DBX 和鼠 PL10(ATP 依赖的 RNA 解旋酶)的氨基酸序列高度一致. 体外实验也证明了他们的相互作用. 哺

乳动物细胞表达发现 HCV 核心蛋白和 DBX 被共同定位在内浆网. 酿酒酵母突变株中 DBX 可以互补 Ded1p (主要的 DEAD 盒 RNA 解旋酶功能)的功能. HCV 核心蛋白可以抑制 DBX 补充的突变酵母生长, 但是不会抑制 Ded1 表达的酵母生长. HCV 核心蛋白也抑制带帽的但不抑制不带帽的 RNA 的体外翻译. 结果表明了核心蛋白和这个宿主细胞蛋白相互作用涉及 RNA 代谢, 所以 HCV 可能抑制 mRNA 翻译机制。

Sabile et al^[20]发现 HCV 核心蛋白可以调节细胞的脂肪代谢, 用酵母双杂交的方法发现病毒的核心蛋白可以和载脂蛋白 A II 结合. 结合域在核心蛋白 C 末端. 又在建立好的细胞模型 - 氟贝特引起 HepG2 细胞 apoA II 表达的升高. 在用降脂药物非诺贝酸(fenofibric acid)处理后, 发现 apoA II 和核心蛋白的分泌平行升高. 这个效应可用贝布雷非德菌素 A(brefeldin A)所消除, 表明非诺贝酸干预细胞脂代谢后直接影响 HCV 核心蛋白的表达型. HCV 核心蛋白与 14-3-3 蛋白相互作用激活激酶 Raf-1. Aoki et al^[21]鉴定了 14-3-3 蛋白家族的一个成员与 HCV 核心蛋白相互作用, 14-3-3 蛋白以磷酸丝氨酸依赖方式结合 HCV 核心蛋白. 导入 HCV 核心蛋白可以使得 HepG2 中和酵母遗传分析中的 Raf-1 激酶活性明显. 结果表明了 HCV 核心蛋白通过和 14-3-3 蛋白相互作用表现出一种新型的 Raf-1 激酶激活蛋白特性, 可能对肝细胞的生长起调节作用。

Cho et al^[22]报告, C 蛋白可通过上调细胞周期蛋白 E 而促进细胞增生. 用 C 蛋白转染 Rat-1 细胞系后, 其 pRb 水平下降, 而 E2F-1 上调, 细胞的生长率升高, 并对凋亡敏感^[23]. 补体受体 gC1qR 和 HCV 核心蛋白相互作用抑制 T-淋巴细胞增生. Kittlesen et al^[24]采用酵母双杂交方法用核心蛋白筛选人 T 细胞文库鉴定出编码 gC1q 受体基因(gC1qR). C1q 是 gC1qR 的配体涉及宿主的早期感染防御. 与 C1q 一样, HCV 核心能够抑制 T 细胞增生应答. 在 T 细胞增生分析中这个核心诱导的抗 T 细胞增生可以被加入抗 gC1qR Ab 扭转. 进一步生化分析核心蛋白和 gC1qR 相互作用指出 HCV 核心蛋白结合到 gC1qR 的 188-259 aa 区, 这个位置与结合 C1q 的区域不同. HCV 核心蛋白可以抑制 T 细胞应答可能对于 HCV 在人类中持续感染有重要意义^[25].

国内有人^[26]通过共转染实验证实 HCV 核心蛋白与截短型的 HBV 表面抗原中蛋白具有协同的反式激活作用. 临床上部分患者有 HBV 和 HCV 的重叠感染, 这两种病毒蛋白可同时表达于肝细胞中, 因此可能与两种肝炎病毒重叠感染的不同临床特征有一定关系. 国内也有研究者^[27]发现 HCV 核心蛋白还可以和一些未知功能的基因的相互作用值得进一步研究。

总之, HCV 基因组编码的核心蛋白除了与 HCV RNA 结合, 保护 HCV RNA 免受 RNA 酶的消化作用, 维持 HCV RNA 的稳定性外, 还具有一系列不同的生物学调节作用^[25,27,28]. HCV 核心蛋白作为一种反式激活蛋白,

对于感染的肝细胞中基因表达谱产生影响,同时, HCV核心蛋白自身结合形成同二聚体结构,也可以与肝细胞中其他类型的蛋白之间进行结合,形成异二聚体或多聚体结构,对于肝细胞中的信号转导产生严重干扰.通过这些生物学作用,对于肝细胞的凋亡、细胞周期进行调节,从而参与HCV感染的发病机制^[29]. HCV感染除了引起急性和慢性病毒性肝炎、肝细胞癌、肝纤维化、还包括肝脏脂肪变、B细胞淋巴瘤、冷球蛋白血症等,这些病理改变的分子生物学机制,目前我们还知之甚少,需要进行细致深入的探索,以阐明HCV感染与这些病理改变之间的相互关系^[30].

4 参考文献

- 1 He YW, Liu W, Zen LL, Xiong KL, Luo DD. Effect of interferon in combination with ribavirin on the plus and minus strand of HCV RNA in patients with chronic hepatitis C. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:179-181
- 2 Wei L, Wang Y, Chen HS, Tao QM. Sequencing of hepatitis C virus cDNA with polymerase chain reaction directed sequencing. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:12-15
- 3 Zhang SL, Liang XS, Lin SM, Qiu PC. Relation between viremia level and liver disease in patients with chronic HCV infection. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:115-117
- 4 Tang ZY, Qi JY, Shen HX, Yang DL, Hao LJ. Short-and long-term effect of interferon therapy in chronic hepatitis C. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:77
- 5 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- 6 Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS (3) protein on p53 protein expression in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46
- 7 Wietzke-braun P, Meier V, Braun F, Ramadori G. Combination of "low-dose" ribavirin and interferon alfa-2a therapy followed by interferon alfa-2a monotherapy in chronic HCV-infected non-responders and relapsers after interferon alfa-2a monotherapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:222-227
- 8 Maier KP. Iron, HCV and the liver. *China J New Gastroenterol* 1997;3:61-63
- 9 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
- 10 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
- 11 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- 12 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
- 13 Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology* 2001;283:167-177
- 14 Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbalenya AE, Lo SY, Ou JH, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:1301-1309
- 15 Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:9417-9426
- 16 Hsieh TY, Matsumoto M, Chou HC, Schneider R, Hwang SB, Lee AS, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J Biol Chem* 1998; 273:17651-17659
- 17 You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999;73:2841-2853
- 18 Owsianka AM, Patel AH. Hepatitis C virus core protein interacts with a human -DEAD box protein DDX3. *Virology* 1999; 257:330-340
- 19 Mamiya N, Worman HJ. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* 1999;274:15751-15756
- 20 Sabile A, Perlemuter G, Bono F, Kohara K, Demaugre F, Kohara M, Matsuura Y, Miyamura T, Brechot C, Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 1999;30:1064-1076
- 21 Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74:1736-1741
- 22 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
- 23 Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:59-66
- 24 Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-1249
- 25 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,洪源,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 26 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-355
- 27 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,李莉. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26: 880-883
- 28 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译极其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 29 刘妍,成军. HCV 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
- 30 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

丙型肝炎病毒复制子的研究

纪冬,成军,王建军

纪冬,成军,王建军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
项目负责: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@genetheray.com.cn
电话:010-66933392 传真:010-63801283
收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-16

纪冬,成军,王建军. 丙型肝炎病毒复制子的研究. 世界华人消化杂志 2003;11 (7):1014-1017

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1014.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的感染是急、慢性肝病的主要致病因素之一,他的感染通常是亚临床的,或只出现轻微的症状,但大约80%的患者难以清除病

对于感染的肝细胞中基因表达谱产生影响,同时, HCV核心蛋白自身结合形成同二聚体结构,也可以与肝细胞中其他类型的蛋白之间进行结合,形成异二聚体或多聚体结构,对于肝细胞中的信号转导产生严重干扰.通过这些生物学作用,对于肝细胞的凋亡、细胞周期进行调节,从而参与HCV感染的发病机制^[29]. HCV感染除了引起急性和慢性病毒性肝炎、肝细胞癌、肝纤维化、还包括肝脏脂肪变、B细胞淋巴瘤、冷球蛋白血症等,这些病理改变的分子生物学机制,目前我们还知之甚少,需要进行细致深入的探索,以阐明HCV感染与这些病理改变之间的相互关系^[30].

4 参考文献

- 1 He YW, Liu W, Zen LL, Xiong KL, Luo DD. Effect of interferon in combination with ribavirin on the plus and minus strand of HCV RNA in patients with chronic hepatitis C. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:179-181
- 2 Wei L, Wang Y, Chen HS, Tao QM. Sequencing of hepatitis C virus cDNA with polymerase chain reaction directed sequencing. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:12-15
- 3 Zhang SL, Liang XS, Lin SM, Qiu PC. Relation between viremia level and liver disease in patients with chronic HCV infection. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2:115-117
- 4 Tang ZY, Qi JY, Shen HX, Yang DL, Hao LJ. Short-and long-term effect of interferon therapy in chronic hepatitis C. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:77
- 5 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- 6 Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS (3) protein on p53 protein expression in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46
- 7 Wietzke-braun P, Meier V, Braun F, Ramadori G. Combination of "low-dose" ribavirin and interferon alfa-2a therapy followed by interferon alfa-2a monotherapy in chronic HCV-infected non-responders and relapsers after interferon alfa-2a monotherapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:222-227
- 8 Maier KP. Iron, HCV and the liver. *China J New Gastroenterol* 1997;3:61-63
- 9 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
- 10 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
- 11 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- 12 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
- 13 Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology* 2001;283:167-177
- 14 Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbalenya AE, Lo SY, Ou JH, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:1301-1309
- 15 Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:9417-9426
- 16 Hsieh TY, Matsumoto M, Chou HC, Schneider R, Hwang SB, Lee AS, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J Biol Chem* 1998; 273:17651-17659
- 17 You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999;73:2841-2853
- 18 Owsianka AM, Patel AH. Hepatitis C virus core protein interacts with a human -DEAD box protein DDX3. *Virology* 1999; 257:330-340
- 19 Mamiya N, Worman HJ. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* 1999;274:15751-15756
- 20 Sabile A, Perlemuter G, Bono F, Kohara K, Demaugre F, Kohara M, Matsuura Y, Miyamura T, Brechot C, Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 1999;30:1064-1076
- 21 Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74:1736-1741
- 22 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
- 23 Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:59-66
- 24 Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-1249
- 25 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,洪源,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 26 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-355
- 27 刘妍,成军,王刚,李克,段惠娟,李莉. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26: 880-883
- 28 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译极其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 29 刘妍,成军. HCV 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
- 30 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

丙型肝炎病毒复制子的研究

纪冬,成军,王建军

纪冬,成军,王建军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
项目负责: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@genetheray.com.cn
电话:010-66933392 传真:010-63801283
收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-16

纪冬,成军,王建军. 丙型肝炎病毒复制子的研究. 世界华人消化杂志 2003;11 (7):1014-1017

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1014.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的感染是急、慢性肝病的主要致病因素之一,他的感染通常是亚临床的,或只出现轻微的症状,但大约80%的患者难以清除病

毒, 发展为慢性感染, 从而更易演变为肝硬化和肝细胞肝癌, 目前世界范围都大约有 1.7 亿人口感染了 HCV^[1], 由于其高流行性、隐匿的病程和持续感染的诊断不足使得其成为严重的医学和社会经济学问题. 病毒基因组约在 10 a 以前就被鉴定出来, 并且引起了对 HCV 基因结构、病毒蛋白结构和生化特征的研究. 但由于 HCV 基因组表现出显著的序列变异, 尤其是在 E2 包膜蛋白编码区的高变区, 并且在全球范围内, HCV 的基因型多达 30 个^[2]. HCV 在体外自主复制水平极低, 且其唯一的可感染动物为黑猩猩, 故缺少有效的细胞培养系统和经济的小动物模型来研究 HCV 复制及其致病机制, 使得对于病毒生活周期和抗病毒药物的研究进展缓慢. 研究者们进行了大量的尝试来克服这个困难, 直到 1999 年, 才有了突破性的进展: 建立了一个有效的细胞培养模型 - 复制子(replicon)系统, 这个系统的基础是: 使用基因工程构建的亚基因组的 HCV RNA 在转染的人肝癌细胞系 Huh-7 细胞中可以自主复制^[3-5]. 本文对于 HCV 细胞培养系统及其应用进行阐述.

1 丙型肝炎病毒

HCV 为单股正链 RNA 病毒, 属于黄病毒属. HCV 基因组全长约 9.6 kb, 含有: (1) 一个大的开放阅读框(ORF), 编码约 3 010 氨基酸长的多聚蛋白前体, 这个蛋白前体通过宿主和病毒蛋白酶的裂解作用产生至少 10 个蛋白, 排列如下: 氨基端(NH₂)- 核心蛋白(core)- 包膜蛋白 1 (envelope, E1)-E2-p7- 非结构蛋白 2(nonstructural protein 2, NS2)-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B- 羧基端(COOH)^[6]. 这些病毒蛋白并不仅在病毒复制中起作用, 也影响宿主细胞内多种功能. (2) 基因组 5' - 端为 5' - 非翻译区(NTR), 全长 341 个核苷酸(nt)^[7], 位于 ORF 的上游, 在 5' - NTR 中存在一个内部核糖体进入位点(IRES), 他是一种最复杂的顺式激活元件, 指导核糖体 40 S 亚基与 ORF 的起始密码子 AUG 相结合, 从而指导 ORF 的翻译, 最近一些研究表明其还具有调节 HCV RNA 复制的作用^[8]. (3) ORF 下游是 3' - NTR: 其长度是可变的, 包括三个结构: 一个短的约 40 个 nt 的可变序列, 其后有终止密码子, 他对于 HCV 基因组的复制并不是必需的^[9]; 大约 30-150 nt 的多聚 poly(U/UC) 序列; 大约 98 nt 的高度保守的“X 尾”异源多聚序列, 其 3' - 末端有一个 46 nt 的序列可形成稳定的茎 - 环(stem-loop) 结构, 他对于体内及细胞培养系统的 RNA 复制来说是必需的. NS5B 蛋白为 RNA 依赖的 RNA 多聚酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP), 由于其缺少校读功能, 使得 HCV RNA 突变率高达每年 5×10^{-3} / 位点, 从而导致一个相当大的准种池(pool of quasispecies)^[10].

HCV 不是逆转录病毒, 其复制过程并不与人类免疫缺陷病毒(HIV)那样先逆转录为 DNA. HCV 复制的简单过程可以描述为: (1) 黏附和穿入宿主细胞; (2) 释放病毒正链 RNA; (3) ORF 的翻译和多聚蛋白的加工; (4) 包含了至少

NS3-5B, 很有可能还有细胞内蛋白的复制酶复合物的装配; (5) 通过中间产物(负链 RNA) 产生正链 RNA 子代; (6) 新的病毒颗粒的形成, 通常通过胞质内质网的出芽来获得其包膜蛋白; (7) 病毒子代的释放, 可能是通过高尔基体进行运输. 所有这些步骤都发生于胞质内, 并且在胞质内可以发现 HCV 蛋白与细胞内膜紧密相关^[11].

2 丙型肝炎病毒复制子

丙型肝炎复制子系统是由德国美因兹 Johannes-Gutenberg 大学的病毒研究所的 Bartenschlager et al 建立的. Bartenschlager 及其小组^[12]于 1999 年从感染患者的肝脏组织中分离出 HCV 基因组, 并对其克隆进行重新构建, 剪切掉一部分片段, 又增加了新的片段, 包括一个抗生素耐受基因, 并将其转染入人肝癌细胞系 Huh-7 中, 通过在含有硫酸新霉素(G418)的培养基中培养后, 可以获得 G418 耐受的细胞克隆, 这些细胞克隆可以持续的表达 HCV 复制子 RNA, 从而建立了有效复制的 HCV 细胞培养系统, 但其复制效率较低, 平均 10^6 个细胞中只有一个是合乎要求的. 美国华盛顿大学医学院分子微生物学系的 Blight 和纽约 Rockefeller 大学丙型肝炎研究中心的 Rice et al 在此基础上改进了这个系统, 寻找能够使复制子更加有效复制的突变株, 他们发现了称为 S1179I 的变异株, 感染了存在此种突变的复制子宿主细胞 10 个中就有 1 个可以产生足够多的病毒蛋白, 使得研究者在短时间内进行基因研究, 而不用依赖于繁琐的细胞选择技术^[13].

复制子的基本结构包含: (1) 带有 HCV 5' - NTR 和部分编码核心蛋白区域(核苷酸 342 到 377/389); (2) 新霉素磷酸转移酶基因(neo^R), 他的表达可以产生对 G418 的耐受; (3) 来自于鼠脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES(E-I), 他指导 HCV 非结构蛋白的翻译; (4) HCV RNA 非结构蛋白编码区(NS2/NS3 到 NS5B); (5) 3' - NTR^[14]. 其中位于 5' - NTR 的 HCV IRES 指导的第一个顺反子(neo^R)的翻译, EMCV IRES 指导的第二个顺反子(NS3-5B)的翻译. HCV IRES 上游的序列对于 RNA 复制来说是必需的; HCV 5' - NTR 头 125 个核苷酸对于 RNA 复制来说已经足够, 但这种复制子的增生会受到严重损害; 高水平的 RNA 复制需要位于 IRES 内的序列^[15]. 在 NS5A 区的干扰素敏感决定区(ISDR)和蛋白激酶 R(PKR)结合位点附近的一个小结构域内可产生多种适应性突变, 从而增加复制子的复制效率^[16].

丙型肝炎复制子的基本功能是其可在 Huh-7 细胞系中可以自主复制, 产生较高水平的 HCV RNA, 并且由于复制子中携带有耐新霉素的基因, 故其可以在含有新霉素的培养系统中被选择出来. 许多研究者发现了可以使复制效率更加有效的适应性突变株, 特别是在 NS5B 区的单个氨基酸的置换, 使得复制子的克隆形成能力增加了至少 1 000 倍. Ikeda et al^[17]报道了来自于 HCV-N 序列的复制子并不需要适应性突变就可以具有较高的克隆形成能力, 其原因是这种序列较其他的 ISDR 区多了 4 个

氨基酸的插入. 这些系统的 RNA 含量高, 甚至可以使用 Northern 印迹法或使用 ^3H - 尿嘧啶的代谢性放射标记法进行检测, 使得研究者有足够多的条件来对 HCV 进行分子病毒学的研究^[18,19].

Pietschmann et al^[20]报道了含有复制子的细胞的特点: (1)在含有复制子的细胞内缺少细胞毒性效应. HCV RNA 的复制依赖于细胞的生长, 而且没有超微结构的改变或是生长属性的改变, 提示了 HCV RNA 以及病毒 NS3-5B 蛋白并无细胞毒性, 肝脏的损伤是由抗病毒的免疫反应所引起的. (2)HCV 复制子在 G418 存在的条件下的稳定性. 复制子可以在连续的选择压力条件下稳定在细胞内传代, 而当一定的时间过去后, 即使去除选择性条件, HCV 复制子 RNA 也可以达到一个很明显的水平, 这些结果说明含有 HCV 复制子的细胞可以很好的反应出体内病毒的持续感染. (3)细胞生长对 HCV RNA 复制的影响. 宿主的细胞因子活性和数量对于 RNA 复制、翻译是必须的.

3 丙型肝炎病毒复制子的应用

3.1 复制子对于研究 HCV 复制过程的应用 HCV RNA 复制的详细机制尚不清楚, 由于复制子的出现, 使得许多研究得以进行, 获得了大量有价值的资料, 并且丰富了对于 HCV RNA 的了解. HCV 感染宿主细胞后, 可以引起宿主细胞的抗病毒反应, 部分是通过病毒双链 RNA (dsRNA) 复制产物的积蓄所引起的. dsRNA 提供了激活特异性转录因子(包括 NF κ B, IRF-1 和 IRF-3)的直接信号, 这就刺激了宿主抗病毒和抗增生基因的产生及表达. IFN γ 、IRF-1 的激活被认为通过一个 PKR 依赖的途径进行的^[21], PKR 确实是一个上游的 IRF-1 激活信号的转导体, 在感染期间, PKR 启动了一个 dsRNA 介导的信号层叠并且导致了 IRF-1 的磷酸化以及 IRF-1 的 DNA 结合功能的激活. 激活的 IRF-1 在干扰素刺激反应启动子元件(IFN-stimulated response promoter element, ISRE)内与 IRF-E 结合并参与了细胞基因(间接刺激适应性免疫反应来抑制病毒复制)的反应. 不同的研究显示 IRF-1 的 DNA 结合活性和反式激活功能是由 PKR 为信号, 磷酸化直接指导的, 如 Hiscott et al^[22]证实了在 IRF-1 中的两串调节性磷酸化位点也影响其反式激活功能, Rahat et al^[23]阐述了磷酸化介导了 IRF-1 的 DNA 结合活性及其对 HLA-DR α 的反式激活活性.

值得注意的, E2 蛋白的表达, 曾被描述为一个 PKR 抑制子, 其实并不影响 IRF-1 的激活. 与这个发现相一致的是, 发现了 E2 并不阻断体内细胞的 dsRNA 介导的 PKR 的激活. 这可能是由于 E2 在内质网内腔的持续存在或者 E2 不同的糖基化抑制了其于 PKR 的相互作用, 或者说 E2 可以调节 PKR 而独立于 dsRNA 和 IRF-1^[24]. dsRNA 信号的阻断定位于病毒 NS5A 蛋白, NS5A 蛋白是丝氨酸残基在一种未知的细胞激酶作用下磷酸化的产物. NS5A 磷酸化至少有两种确定的形式, p56(基础磷酸化形式)和 p58(超磷酸化形式). NS5A 可以与干扰素介导的、

dsRNA 激活的 PKR 相互作用, 从而调整 IFN 刺激的抗病毒反应, 他在 HCV 复制期间使 PKR 局部化并抑制 PKR 对于 dsRNA 的激活. 在 NS5A 的 PKR 结合域内或邻近的突变解除了对于 IRF-1 调节途径的抑制, 导致了 IRF-1 依赖的抗病毒效应器基因的反应和与之伴随的 HCV RNA 复制效率的下降. 提示了 NS5A 通过阻止 IRF-1 的激活以及破坏宿主抗病毒途径影响了 HCV 的持续感染. 在 NS5A 区明显集中的突变提示了 NS5A 对于体外 HCV 复制的建立是非常重要的. 一个可能性就是 NS5A 介导了宿主蛋白抑制 HCV 复制的互相作用. 在 NS5A 区的突变也许中断了这种互相作用, 破坏 IRF-1 的激活, 并且通过 PKR 影响宿主基因表达, 因此使得 HCV 得以持续复制.

HCV RNA 复制可以触发细胞内基因的表达和激活启动子, 这依赖于 IRF-1 和 NS5A, 尽管 NS5A 抑制 PKR, 也可以抑制 IRF-1 依赖的基因表达(包括 IFN α 和 IFN β 基因). 最近的研究表明 IRF-1 与 IRF-3 和 IRF-7 互相协作来对一定范围内的抗病毒反应进行的调节, 创造更加合适的细胞环境来保持 HCV 的复制.

3.2 复制子对于研究、发展抗病毒药物的应用 对于 HCV 感染, 唯一的抗病毒方案为干扰素或与利巴韦林联合使用, 但是其持续显效率并不高, 在前者为 10-20%, 后者为 30-40%, 对于不显效的患者, 尚无替代的疗法. 而 HCV 复制子系统的出现对于发展和评估抗病毒药物也非常有用^[25]. 首先, 众所周知, 抗病毒治疗的初始靶位点是: (1)病毒蛋白 NS2/3 和 NS3(与 NS4A)的处理过程; (2)使用 NS3 解旋酶和 NS5B RDRP 的病毒 RNA 的复制过程; (3)病毒调节元件, 如 5' -UTR 和 3' -UTR^[26]. 其中绝大部分可以在复制子中编码, 并且他们对于复制也是必需的. (a)复制子可以在细胞中稳定的复制. (b)细胞可以适应不同的培养形式, 如 96 孔板等. (c)通过使用一个高度的细胞培养适应性复制子, 可以建立细胞系, 并使之携带选择性的 HCV RNA 亚基因组(带有可以很容易检测到的标记基因).

由于 HCV 存在较大的变异, 以及由此引起的耐药, 所以针对不同靶位点的联合抗病毒治疗是非常重要的. 目前大量的研究都是可以使用复制子系统来进行的. Guo et al^[27]报道了亚基因复制子对于 IFN α 敏感, 并且可以将其半衰期减少为 12 h. Frese et al^[28,29]证实了 IFN α 对于 HCV 复制的抑制并不依赖于 MxA 蛋白(MxA 蛋白为高度保守的、大的 GTP 酶, 人 MxA 蛋白在某些病毒中具有抗正、负链 RNA 的作用), 并研究了 IFN γ 对于病毒蛋白合成及 RNA 复制的抑制作用, 他们发现: (1)IFN γ 抑制 HCV 蛋白的积聚. (2)IFN γ 抑制 HCV RNA 的积聚. (3)IFN γ 对于 HCV 复制子的抑制并不是通过后来的 I 型 IFN 的产生所介导的. (4)HCV 复制子耐受一氧化氮(NO)浓度的增加. (5)HCV 复制子的抑制并不是由色氨酸的消耗所介导的. 从而得出结论: IFN γ 对于 HCV 的控制有着重要的作用. NK 细胞、细胞毒性 T 细胞和其他的免疫细胞清除 HCV 并不仅仅是通过直接清除感染的肝细胞, 也通

过产生 IFN γ 来发挥抗病毒作用. 这个结论使得抗病毒治疗出现了新的途径.

虽然在此方面有了许多进展, 但系统的一些属性必须考虑: (1) 既然 HCV RNA 的复制与宿主细胞的增生相耦联, 抑制宿主细胞生长的复合物也会减少复制子 RNA 的水平. 因此, 只有当细胞毒性或细胞抑制的效应被排除后, 才可以得出其特异性抑制 HCV 复制的结论. (2) 并不能排除结构蛋白对复合物抗病毒效果或对抗病毒耐受的影响. 通过亚基因组的复制子的药物筛选实验的抑制性药物也应该对具有自主复制能力的全长 HCV 基因组的细胞系有效. 尽管使用这样细胞系的初始筛选是可以的, 但当使用全长 HCV 基因组时需要更加高的生物安全性也使得这种药物筛选方法有了限制. (3) 细胞培养适应性突变也可以改变蛋白的生物化学属性使之对抗病毒药的敏感性产生变化. 研究者发现了在大约 20 种携带复制子的不同的细胞系都带有一个不同的细胞培养适应性突变. 因此为了寻找抑制 NS5B RDRP, 可以使用不仅是在 NS5B 区适应性突变的细胞系来进行实验^[30].

4 丙型肝炎病毒复制子的前景

HCV 复制子系统的产生研究者有了很好的 HCV 研究工具, 但尽管有这个进步, 对于细胞培养系统的进一步优化还需要大量的工作. 例如, 直到现在, 只有 Huh-7 细胞支持 HCV RNA 的复制, 而对于其他的细胞系的感染, 包括 HCV 可以感染的细胞(如 HepG2 或 PH5CH)等的尝试都失败了. 这也许与 Huh-7 宿主细胞因素的构成不同于其他细胞系有关. 另一个困难是, 虽然目前已可以将全长 HCV 基因组构建入复制子系统中, 但 HCV 复制子系统所产生的 HCV RNA 均不具有感染性, 因此现在的 HCV 复制子系统只能用于研究 HCV 复制的机制, 而不能用于研究其如何来感染宿主细胞的机制. 最后, 我们需要的仍然是一个可以有效的产生感染性 HCV 的系统和一个可以得到的细胞系. 虽然现在我们还不能预言还需多长时间才能得到这样的系统, 但是最近几年的研究还可以使我们很乐观的认为这将出现在不远的将来.

5 参考文献

- 1 Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999; 285:26-30
- 2 Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159
- 3 Cheney IW, Naim S, Lai VC, Dempsey S, Bellows D, Walker MP, Shim JH, Horscroft N, Hong Z, Zhong W. Mutations in NS5B polymerase of hepatitis C virus: impacts on in vitro enzymatic activity and viral RNA replication in the subgenomic replicon cell culture. *Virology* 2002;297:298-306
- 4 Greive SJ, Webb RI, Mackenzie JM, Gowans EJ. Expression of the hepatitis C virus structural proteins in mammalian cells induces morphology similar to that in natural infection. *J Viral Hepat* 2002;9:9-17
- 5 De Tomassi A, Pizzuti M, Graziani R, Sbardellati A, Altamura S, Paonessa G, Traboni C. Cell clones selected from the Huh7 human hepatoma cell line support efficient replication of a subgenomic GB virus B replicon. *J Virol* 2002;76:7736-7746
- 6 Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic

- replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* 2002;76:7453-7459
- 7 Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- 8 Zhao WD, Wimmer E. Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: new structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 2001;75:3719-3730
- 9 Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-5338
- 10 Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 2000;74:2046-2051
- 11 Mottola G, Cardinali G, Ceccacci A, Trozzi C, Bartholomew L, Torrisi MR, Pedrazzini E, Bonatti S, Migliaccio G. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* 2002;293:31-43
- 12 Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-113
- 13 Marshall E. Hepatitis C: New 'replicon' yields viral proteins. *Science* 2000;290:1870-1871
- 14 Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974
- 15 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- 16 Lanford RE, Bigger C. Advances in model systems for hepatitis C virus research. *Virology* 2002;293:1-9
- 17 Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 2002;76:2997-3006
- 18 Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 2001;75:4614-4624
- 19 Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001;75:1437-1449
- 20 Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001;75:1252-1264
- 21 Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, Wang C, Pflugheber J, Chen ZJ, Gale M Jr. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol* 2002;15:29-40
- 22 Hiscott J, Lin R. A role for casein kinase II phosphorylation in the regulation of IRF-1 transcriptional activity. *Mol Cell Biochem* 1999;191:169-180
- 23 Rahat MA, Chernichovski I, Lahat N. Increased binding of IFN regulating factor 1 mediates the synergistic induction of CIITA by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in human thyroid carcinoma cells. *Int Immunol* 2001;13:1423-1432
- 24 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R Jr, Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4650-4655
- 25 Randall G, Rice CM. Hepatitis C virus cell culture replication systems: their potential use for the development of antiviral therapies. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:743-747
- 26 Locarnini SA, Bartholomeusz A. Advances in hepatitis C: What is coming in the next 5 years? *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:442-447
- 27 Guo JT, Bichko VV, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 2001;75:8516-8523
- 28 Frese M, Pietschmann T, Moradpour D, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol* 2001; 82:723-733
- 29 Frese M, Schwarzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002;35:694-703
- 30 Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001;52:1-17

丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 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
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@genetheray.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1018-1020
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1018.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种单股正链 RNA 病毒, 编码一种多蛋白分子, 在病毒和宿主细胞蛋白酶的裂解作用下, 至少裂解为 3 种结构蛋白(C、E1 和 E2)和 6 种非结构蛋白(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)^[1,2]. NS5A 是非结构蛋白的一种, 哺乳动物细胞表达的 NS5A 蛋白以两种形式存在, 分子量分别为 56 kD 和 58 kD. HCV NS5A 是 HCV 基因组编码的一种最为重要的具有多种生物学活性的非结构蛋白质^[3-5], 是 HCV 基因组编码的一种具有反式激活作用等多种生物学活性的非结构蛋白质. 其基因序列的变异, 决定部分 HCV 病毒株对于 IFN- α 治疗的疗效应答. HCV NS5A 蛋白还具有结合双链 RNA 激酶(PKR)的生物学活性, 对于 HCV 感染的靶细胞的细胞周期与细胞凋亡的分子生物学调节机制密切相关^[6].

1 NS5A 反式激活作用位点

反式激活作用(transactivation)是基因组中一部分基因片段通过其转录或翻译产物(通常为编码蛋白), 激活另一部分基因片段的转录调节序列, 上调基因的表达. 近年研究发现, NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征. 但是其参与细胞转录调节的机制仍不清楚^[7-9]. 一般来说, 转录的反式激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 定位于细胞内质网(ER), 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号转导途径.

最近的研究表明缺失 N- 末端 146 个氨基酸残基和 DNA 结合区域在 GAL4(一种酵母细胞转录激活因子)的 HCV NS5A 蛋白可强烈的激活酵母和哺乳动物细胞的转录活性. 结合到 GAL4 DNA 结合区域的全长的 HCV NS5A 蛋白并没有激活转录的作用, NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 位氨基酸残基之间^[10]. NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区(2 143-2 184, 2 220-2 273 氨基酸残基)和一个脯氨酸

富集区(2 282-2 327 氨基酸残基), 被认为是 NS5A 的转录活性区域^[11]. 酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与 NS5A 的反式激活活性相关, 两个酸性氨基酸区是 NS5A 的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区 2 的一些氨基酸的突变可明显影响 NS5A 的转录激活作用, 但是这些突变更更多的是引起蛋白的二级结构的改变^[12]. 脯氨酸富集区被认为对 NS5A 的转录激活作用只有一定的加强作用, 相对而言并不重要.

蛋白 N- 末段的功能了解的很少, 据推测 N- 末段的功能区域可与 C- 末段的酸性区域形成分子内的结合位点, 并可以掩盖酸性氨基酸区域的转录激活作用. 在 HCV 感染细胞, NS5A 与其他细胞或病毒蛋白的相互作用可能会改变这种结构并使酸性氨基酸区域发挥转录激活作用^[11], 这种假设仍处在实验阶段. 尽管已有明确证据显示 NS5A 蛋白全长定位于细胞质内, 在细胞核内仍可以检测到 NS5A 的 N- 末段的定位信号^[13], 这就提示这部分结构可进入细胞核内并成为转录激活因子的一部分.

Satoh et al^[14]检测了各种不同的 N- 或 C- 端片段在细胞内瞬时转染后的表达及分析他们的亚细胞定位. N- 末端定位于细胞核, 并且 NS5A N- 末端的 27 个氨基酸序列有足够的能力使正常的核蛋白滞留在细胞质内. 这些发现说明 NS5A 的细胞质定位首先是由分子的 N- 末端决定的. 另外在瞬时表达细胞中, NS5A 蛋白存在蛋白的分解处理过程. 在这些细胞中, 裂解片段发生在 NS5A 的一些 C- 和 N- 末端. 细胞内的这些片段可被凋亡调节素激活, 被天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK 抑制, 提示天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶类蛋白水解酶对 NS5A 的裂解有一定作用. 基于 NS5A 变异分析的结果, 可以预测一个缺失了 NS5A C- 末端和 N- 末端, 长 155 到 389 个氨基酸残基的片段, 包含这些氨基酸序列的多肽产物定位于细胞核. 此外, 只有在共同产生蛋白激酶 A(PKA)的 α 催化亚单位时, 一种包含 Gal4 DNA 结合区的融合蛋白与这种片段融合, 才表现转录活性, 提示这种片段的转录活性受 PKA 调控. 这些结果说明 NS5A 的这种天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶类蛋白水解酶裂解产物对感染 HCV 的宿主细胞基因的转录活动起调控作用.

2 NS5A 反式激活作用因子

Gong et al^[15]研究发现, NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用. NS5A 在细胞质内通过氧化应激作用激活 NF- κ B 和 STAT-3 转录因子. NS5A 引起细胞内钙离子的紊乱. Ca^{2+} 作为第二信使激发线粒体内的活性氧簇的水平, 使 NF- κ B 和 STAT-3 易位入细胞核内. 有证据表明 STAT-3 的激活部分有 NS5A 的作用. 在抗氧化剂[pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC)]或者 Ca^{2+} 拮抗剂(EGTA-AM, TMB-8)作用

下, NS5A 诱导的 NF- κ B 和 STAT-3 的反式激活作用消失了. 这些结果说明了 NS5A 可引起细胞内与病毒感染相关的病理改变的发病机制.

Ghosh et al^[16]研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1 的表达, 已知 p21WAF1 是细胞周期调节中的一种主要的抑制作用蛋白类型, HCV NS5A 对于 p21WAF1 表达的抑制, 实际上就是对于细胞周期的促进作用. HCV NS5A 对于细胞周期的调节作用还表现在激活人肝癌细胞中增生的细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. 研究证实, 将 HCV NS5A 导入到小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 中, 可以导致其贴壁非依赖性生长以及获得在裸小鼠体内形成肿瘤病灶的能力. 这些都是 HCV NS5A 通过反式激活作用对于靶细胞中细胞周期调节机制干扰的结果, 可能是 HCV 感染致肝细胞恶性转化的重要机制之一.

Lan et al^[17]研究了 HCV NS5A 在 HCV 的致癌转换中起重要作用. 由于肿瘤抑制因子 p53 对阻止细胞的致瘤性转化有重要作用, 故研究了 HCV NS5A 对 p53 功能影响. 应用体内和体外免疫共沉淀和共聚焦显微镜来研究 HCV NS5A 和 p53 的相互作用. HCV NS5A 与 p53 在细胞核周区域直接结合. 通过报告基因分析, HCV NS5A 抑制 p53 引起的对复制的反式激活作用. 应用 FLAG- 和 FLAG-NS5A Hep3B 稳定细胞系, 发现 HCV NS5A 可下调 p53 活化的 Hep3B 细胞引起内源性的 p21/waf1 的表达. 在伴有 p53 的 NS5A 稳定转染和瞬时转染的 Hep3B 细胞系中, 应用流式细胞分析检测 NS5A 对 p53 介导的细胞凋亡的作用. NS5A 可解除 p53 介导的细胞凋亡的作用, 并且这种抑制作用与 NS5A 与 p53 结合能力的有关. 另外, HCV NS5A 在细胞内和与 p53 激活有重要作用的 hTAF(II)32 有相互作用并在细胞内的定位相同. 这些结果显示 HCV NS5A 在细胞质与 p53 和 hTAF(II)32 有相互作用并部分抑制其功能, 并且抑制 p53 介导的对转录的反式激活作用和细胞凋亡作用, 可能对 HCV 感染的致癌作用有重要意义.

Polyak et al^[18]研究发现, NS5A 在人细胞内的表达诱导白介素 8(IL-8) mRNA 和蛋白的产生, 并且这种效用与在体外检测到的抑制 IFN 的抗病毒作用有关. NS5A 诱导由 IL-8 启动子诱导的报告基因的复制, 并且 IL-8 启动子的最初的 133 bp 是 NS5A 反式激活作用所必须的最小范围. NS5A- δ N110 和 NS5A- δ N222 刺激 IL-8 启动子的产生比 NS5A 全蛋白水平更高. 另外, IL-8 启动子的诱发突变提示 NF- κ B 和 AP-1 对 NS5A- δ N222 反式激活肿瘤坏死因子 α 有重要意义, 并且 NF-IL-6 抑制这种作用. 还有研究发现 NS5A 可以通过抑制细胞内 IFN 诱导的 PKR 蛋白激酶的活性对抗 IFN 的抗病毒作用^[19,20]. 上述说明 NS5A 可通过多种机制抑制 IFN 的抗病毒作用, 并提供了 NS5A 蛋白复制作用的生物学效应的第一手证据. 在 HCV 感染时, 病毒蛋白可能诱导趋化因子的产生并对 HCV 对抗病毒药的抵抗作用和致病

机制有作用.

总之, NS5A 是 HCV 基因组编码的一种具有反式激活作用等多种生物学活性的非结构蛋白质. NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 位氨基酸残基之间. 通过反式激活作用, NS5A 可激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 抑制细胞周期调节基因 p21WAF1 的表达, 抑制 p53 介导的对转录的反式激活作用和细胞凋亡作用, 通过多种机制抑制 IFN 的抗病毒作用, 对于 HCV 感染的靶细胞的细胞周期与细胞凋亡的分子生物学调节机制密切相关, 决定部分 HCV 病毒株对于 INF- α 治疗的疗效应答, 对于 HCV 在宿主体内的存活及宿主细胞的癌变有重要意义.

3 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, 1997:42-46
- 2 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 3 成军. 丙型肝炎病毒干扰素敏感决定区的研究进展. 国外医学. 流行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 4 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 5 成军, 钟彦伟, 施双双, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验和临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 6 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 7 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 8 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
- 9 Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells* 1997;7:661-667
- 10 Tanimoto A, Ide Y, Arima N, Sasaguri Y, Padmanabhan R. The amino terminal deletion mutants of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:360-364
- 11 Pawlotsky JM, Germanidis G. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 1999;6:343-356
- 12 Fukuma T, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Mutations in the interferon-sensitivity determining region of hepatitis C virus and transcriptional activity of the nonstructural region 5A protein. *Hepatology* 1998;28:1147-1153
- 13 Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 1996;182:203-211
- 14 Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270:476-487
- 15 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 9599-9604
- 16 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 17 Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang

- YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:4801-4811
- 18 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
- 19 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001; 284:1-12
- 20 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001 ;59:1271-1276

丙型肝炎病毒5' - 非翻译区的结构与功能研究

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
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@genetheray.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 丙型肝炎病毒5' - 非翻译区的结构与功能研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1020-1022

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1020.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科肝炎病毒类. 在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌^[1,2]. 从不同患者中分离的病毒表现出明显的序列差异, 从同一患者分离的病毒呈现出准种的特点. 然而5' - 非翻译区(5' -NTR, 5' -nontranslated RNA)在HCV不同基因型却相对保守和稳定, 这种序列保守的特点可能在病毒基因组的复制和翻译中起着重要的作用^[3,4].

1 5' - 非翻译区的结构特点

HCV为单股正链RNA, 全长大约9 500核苷酸(nt), 含有一个大的开放读码框架(ORF, open reading frame), 位于ORF上游的是5' -NTR^[5]. 1991年, Han et al^[6]采用引物延长与PCR相结合的方法克隆了HCV 5' -NTR的完整序列, 得到的序列长341 nt, 这一结果亦得到了其他人的证实. 但是, 也有短的HCV 5' -NTR序列的报道, 为319或324 nt^[7,8]. 这些短的5' -NTR可能是HCV基因组在体内被切割或基因变异的结果.

HCV整个基因组与黄病毒属病毒极为相似, 但HCV

5' -NTR结构却类似痘病毒属病毒, 而与黄病毒属病毒明显不同^[9]. 与痘病毒属病毒一样, HCV 5' -NTR有3-5个小的ORF. 有关这些小的ORF是否被翻译和有何功能, 目前尚不清楚, Yoo et al^[10]认为这些小的ORF可能是HCV病毒蛋白前体翻译的一种负性调节结构. Rijnbrand et al^[11]研究发现5' -NTR中含有3-5个AUG三联子, 其中一些AUG在HCV基因组中较为保守, 这5个三联子分别位于13、32、85、96、215 nt. 利用核苷酸诱变方法研究AUG在HCV翻译中的作用, 结果表明13、32、215的AUG变异对蛋白的翻译无明显影响, 而85 nt或96 nt的变异会严重影响内部核糖体进入位点(IRES, internal ribosomal entry site)功能, 并且发现核糖体只能识别342 nt的AUG作为蛋白翻译的起始密码子.

Bukh et al^[12]在HCV 5' -NTR中发现了三个高度保守的结构域, 分别位于3-65、178-199、246-263 nt, 后两个区域与病毒的进化有关, 前一个区域毗邻启动多蛋白翻译的真实启动子AUG, Bukh et al认为, 这个结构域对于HCV RNA多蛋白体的翻译至关重要, 这一假设在以后的体内、外翻译实验中陆续得到了证实. 虽然5' -NTR序列保守稳定, 但也发现了一些位于该区的变异. 5' -NTR有限的序列变异基本位于155-170 nt和117-132 nt, 从而形成两个基元(motif). HCV 5' -NTR发生的核苷酸变异多为互补突变, 两个基元随机发生1-3 nt共突变的机率很小, 说明5' -NTR序列变异不是随机发生的^[13,14].

Brown et al^[15]采用计算机模拟折叠程序对5' -NTR保守区进行处理, 计算热力学自由能, 建立了HCV 5' -NTR的二级结构模型, 该结构模型被双链及单链的RNase敏感实验所证实, 即双链及单链RNase可以分别在HCV 5' -NTR的双链区及单链区切割HCV RNA. 根据HCV 5' -NTR二级结构的特征, 可分为4个RNA结构域^[16-18]: 结构域I呈发夹状, 位于5-20 nt, 目前认为结构域I的缺失可增强RNA的翻译, 表明其可能具有翻译调节作用; 结构域II是一个大的茎-环结构, 对于其功能仍存在争议, 但大数学者认为结构域II可增强RNA的翻译表达. 结构域III所含核苷酸最多, 结构也最复杂, 由一个长的不规则螺旋结构和多个分枝状茎-环结构组成, 结构域III是蛋白翻译的核心部位, 结构高度保守, 参与形成对蛋白翻译有重要作用的RNA假结; 结构域IV的5' -端是一段短的单链区, 3' -端的小茎环结构与真实启动密码子AUG相连, 部分学者认为结构域IV的稳定能够提高翻译效率.

2 5' - 非翻译区的功能

2.1 翻译启动功能 HCV RNA多蛋白前体的翻译启动方式与小RNA病毒相似, 是采用一种不同于一般病毒的独特方式: 核糖体着陆启动病毒多蛋白的翻译. 该领域最早的研究工作是由Tsukiyama-kohara et al^[19]开展的. 为探讨HCV RNA的翻译启动方式, 构建了含有两个表达基

- YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002; 21:4801-4811
- 18 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
- 19 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001; 284:1-12
- 20 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001 ;59:1271-1276

丙型肝炎病毒5' - 非翻译区的结构与功能研究

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
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@genetheray.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 丙型肝炎病毒5' - 非翻译区的结构与功能研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(7):1020-1022

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1020.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科肝炎病毒类. 在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌^[1,2]. 从不同患者中分离的病毒表现出明显的序列差异, 从同一患者分离的病毒呈现出准种的特点. 然而5' - 非翻译区(5' -NTR, 5' -nontranslated RNA)在HCV不同基因型却相对保守和稳定, 这种序列保守的特点可能在病毒基因组的复制和翻译中起着重要的作用^[3,4].

1 5' - 非翻译区的结构特点

HCV为单股正链RNA, 全长大约9 500核苷酸(nt), 含有一个大的开放读码框架(ORF, open reading frame), 位于ORF上游的是5' -NTR^[5]. 1991年, Han et al^[6]采用引物延长与PCR相结合的方法克隆了HCV 5' -NTR的完整序列, 得到的序列长341 nt, 这一结果亦得到了其他人的证实. 但是, 也有短的HCV 5' -NTR序列的报道, 为319或324 nt^[7,8]. 这些短的5' -NTR可能是HCV基因组在体内被切割或基因变异的结果.

HCV整个基因组与黄病毒属病毒极为相似, 但HCV

5' -NTR结构却类似痘病毒属病毒, 而与黄病毒属病毒明显不同^[9]. 与痘病毒属病毒一样, HCV 5' -NTR有3-5个小的ORF. 有关这些小的ORF是否被翻译和有何功能, 目前尚不清楚, Yoo et al^[10]认为这些小的ORF可能是HCV病毒蛋白前体翻译的一种负性调节结构. Rijnbrand et al^[11]研究发现5' -NTR中含有3-5个AUG三联子, 其中一些AUG在HCV基因组中较为保守, 这5个三联子分别位于13、32、85、96、215 nt. 利用核苷酸诱变方法研究AUG在HCV翻译中的作用, 结果表明13、32、215的AUG变异对蛋白的翻译无明显影响, 而85 nt或96 nt的变异会严重影响内部核糖体进入位点(IRES, internal ribosomal entry site)功能, 并且发现核糖体只能识别342 nt的AUG作为蛋白翻译的起始密码子.

Bukh et al^[12]在HCV 5' -NTR中发现了三个高度保守的结构域, 分别位于3-65、178-199、246-263 nt, 后两个区域与病毒的进化有关, 前一个区域毗邻启动多蛋白翻译的真实启动子AUG, Bukh et al认为, 这个结构域对于HCV RNA多蛋白体的翻译至关重要, 这一假设在以后的体内、外翻译实验中陆续得到了证实. 虽然5' -NTR序列保守稳定, 但也发现了一些位于该区的变异. 5' -NTR有限的序列变异基本位于155-170 nt和117-132 nt, 从而形成两个基元(motif). HCV 5' -NTR发生的核苷酸变异多为互补突变, 两个基元随机发生1-3 nt共突变的机率很小, 说明5' -NTR序列变异不是随机发生的^[13,14].

Brown et al^[15]采用计算机模拟折叠程序对5' -NTR保守区进行处理, 计算热力学自由能, 建立了HCV 5' -NTR的二级结构模型, 该结构模型被双链及单链的RNase敏感实验所证实, 即双链及单链RNase可以分别在HCV 5' -NTR的双链区及单链区切割HCV RNA. 根据HCV 5' -NTR二级结构的特征, 可分为4个RNA结构域^[16-18]: 结构域I呈发夹状, 位于5-20 nt, 目前认为结构域I的缺失可增强RNA的翻译, 表明其可能具有翻译调节作用; 结构域II是一个大的茎-环结构, 对于其功能仍存在争议, 但大数学者认为结构域II可增强RNA的翻译表达. 结构域III所含核苷酸最多, 结构也最复杂, 由一个长的不规则螺旋结构和多个分枝状茎-环结构组成, 结构域III是蛋白翻译的核心部位, 结构高度保守, 参与形成对蛋白翻译有重要作用的RNA假结; 结构域IV的5' -端是一段短的单链区, 3' -端的小茎环结构与真实启动密码子AUG相连, 部分学者认为结构域IV的稳定能够提高翻译效率.

2 5' - 非翻译区的功能

2.1 翻译启动功能 HCV RNA多蛋白前体的翻译启动方式与小RNA病毒相似, 是采用一种不同于一般病毒的独特方式: 核糖体着陆启动病毒多蛋白的翻译. 该领域最早的研究工作是由Tsukiyama-kohara et al^[19]开展的. 为探讨HCV RNA的翻译启动方式, 构建了含有两个表达基

因的双顺反子表达载体. 第一个顺反子由噬菌体 T7 启动子和报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)组成, 第二个顺反子, 由 HCV cDNA 341-1431 nt 序列组成. 选择 T7 启动子上游酶切位点线性化载体, 在 RNA 多聚酶作用下体外转录为双顺反子 RNA. 然后采用无细胞翻译系统进行体外翻译. 结果发现, HCV C、E1 区特异性结构蛋白 p22 和 pg35 表达正常. 由于在以传统的核苷酸扫描方式启动翻译中, 结合于 mRNA 5' 端帽子上的核糖体不可能在第二个顺反子前如此长距离的滑动, 有理由认为 HCV C、E1 区蛋白的表达是核糖体越过双顺反子 RNA 的 5' - 端直接在其内部着陆, 即是以非帽依赖性方式启动翻译的. 将这种存在于病毒 5' -NTR 上能与核糖体结合的序列称作 IRES.

Pilipenko et al^[20]在微小病毒 IRES 的 5' -NTR 中发现存在一些重要的序列 - 基元(motif), 可以与 18 S rRNA 35' - 端附近的序列互补, HCV IRES 也发现同样的基元存在. 以后很多学者如 Wang et al^[21]陆续证实了以上的发现, 并对 IRES 结构及功能特点进行了深入研究. 因 HCV RNA 5' -NTR 序列较其他微小病毒短, 因此 HCV 的 IRES 可能具有更紧密的结构, 并且与其他微小病毒相比, IRES 占据较多的 5' -NTR. Tsukiyama-kohara et al 认为 IRES 的 5' - 端位于 111 至 257 nt. 然而, Wang et al^[22]和 Rijnbrand et al^[23,24]研究发现 IRES 的 5' - 端位于 29-69 nt. Reynolds et al^[25]的研究认为 IRES 活性所需的最短序列为 HCV RNA 基因组核苷酸序列 42-356 nt. Honda et al^[26]为了解 IRES 的结构特点, 构建一系列 5' -NTR 缺失变异的全长 HCV cDNA 克隆. 当 HCV RNA 发生核苷酸 28-69 nt 缺失变异时, 蛋白的翻译明显下降, 与 Wang 及 Rijnbrand 研究结果相一致. 同时资料显示在蛋白的翻译过程中该区的二级结构是必不可少的, 当茎环结构 IIa 区(28-69 nt)或 IIb 区(70-69 nt)碱基对结构发生改变而致二级结构改变时, IRES 的功能明显下降. Kalliampakou et al^[27]在研究中也发现核苷酸插入或缺失而致结构 II 区茎环结构改变特别是顶端结构发生改变时, IRES 的功能将受到严重的影响, 而在保守的 A-81、C-83、C-84、A-93、A-96 位发生单个核苷酸替换时, IRES 的活性仅受到轻度的影响. 最近的一些研究资料^[28]显示结构 II 区可诱导核糖体 40 S 亚单位发生构象改变, 同时目前的实验模型表明结构 II 区茎环结构的顶端在核糖体的 E 位点或其附近与核糖体发生作用而参与 RNA 的解码过程, 直至翻译机制建立. 根据 5' -NTR 二级结构的模型结构 III 区可进一步分为 6 个包含茎环结构的亚区(即: a-f). 结构 III 区是 IRES 的核心部位, 其结构高度保守, 并参与形成 RNA 假结, 在结构 III 区的功能研究中, Brown et al^[15]发现 249-275 nt 和 296-313 nt 发生变异而致结构 III 区双螺旋结构不稳定时, IRES 的活性下降. 155-171、172-227、229-238 nt 发生变异时, IRES 的翻译启动功能完全丧失; 而且结构 III 区的二级结构茎环结构 IIIa、IIIb、IIIc, 对 IRES 的功能都起着重要的作用. Jubin et al^[29]研

究发现位于 253-279 nt 的 III d 区是结构 III 区中高度保守的区域, 包含两个双链螺旋结构(即: 螺旋结构 1 区和 2 区), 该区体内诱变显示其茎环顶端的 GGG 三联子(266-268 nt)是 IRES 活性必须结构之一, 序列比较中发现茎环顶端的 6 位核苷酸(UUGGGU)在 HCV 基因组中绝对保守, 并且 GGG 三联子在黄病毒属和瘟病毒属的非翻译区中也高度保守. 同时作者也对 III d 区的二级结构特点进行研究, 茎环顶端的单个 G 突变为 C 时会影响 RNA 的折叠方式, 从而导致 IRES 功能的丧失, 其原因可能是由于 G-C 突变使 IRES 与核糖体 40S 亚基的亲水性降低, 作者认为 III d 区的序列及其二级结构均是 IRES 活性的重要因素. 结构 IV 区与起始密码子 AUG 相连, 在 RNA 的翻译中无明显作用. HCV RNA 5' - 端的茎环结构 I 区缺失却能导致 IRES 的翻译效率提高, 该区可能具有调节作用.

2.2 5' -NTR 的复制功能 5' -NTR 在翻译中的作用受到广泛的关注, 并进行了较为细致的研究. 但 5' -NTR 在 RNA 复制中的作用却知之较少, 主要是因为 HCV RNA 缺少有效的细胞复制系统. 2001 年, Friebe et al^[30]构建了 HCV RNA 复制子, 该复制子在人肝细胞系 Huh-7 可以高效表达, RNA 由以下几个元件组成: 5' -NTR-IRES 3' - 末端, 新霉素磷酸转移酶, 启动非结构蛋白翻译的脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES, NS3-5B, HCV 3' -NTR. 5' -NTR 的 IRES 上游区包括结构 I 区与结构 II 区之间的间隔区. IRES 上游区核苷酸序列 5-20 nt 和 24-40 nt 进行缺失变异, 将变异的双顺反子转染 Huh-7 细胞, 并进行 G418 筛选; 与亲代 RNA 复制相比, 变异 RNA 无克隆株生长, 同时将双顺反子中的新霉素磷酸转移酶替换为萤虫素酶, 变异 RNA 萤虫素酶表达活性在 4 h、24 h、48 h 和 72 h 与亲代相比都明显下降, 说明 5' - 非翻译区 5-40 nt 对 HCV RNA 的复制是必须的, 研究也发现复制水平会随着 5' -NTR 5' - 末端序列的延长而不断提高, 当 5' -NTR 为全长时, 嵌合体 RNA 复制水平最高. 这种 5' - 端翻译和复制信号重叠与其他正链 RNA 不同, 例如: 脊髓灰质炎病毒(PV, polioviral), 其 5' -NTR 由两部分组成: 5' - 末端序列 1-88 nt 三叶草样结构是 RNA 复制所必须, 而 IRES 位于 PV 基因组序列 134-556 nt.

HCV 5' -NTR 包含有复制和翻译的作用元件, 为进一步明确复制作用元件, Kim et al^[31]将 PV 的 IRES 插入到 HCV 5' -NTR 与新霉素磷酸转移酶开放读码框架之间, EMCV 的 IRES 与 HCV(NS3-NS5B)连接. 通过一系列 5' -NTR 的缺失变异突变, Yoon et al 发现含有结构 I 区和结构 II 区时 HCV 嵌合体能够在 Huh-7 细胞中复制, 当结构 I 区或结构 II 区发生缺失时, 嵌合体复制停止; 结构 III 区和假结结构与结构 I 区、结构 II 区连接后, 可明显提高复制水平. Yoon et al 认为结构 I 区和结构 II 区是 HCV RNA 复制所必须的结构, 并且 5' -NTR 的其他结构都在 RNA 的复制中发挥重要的作用. 结构 II 区是复制和

翻译都必须具有的结构,这可能是由于结构 II 区介导复制与翻译的转换。在 PV 的研究中发现,当 PV 进行翻译时,其 RNA 的复制即被阻止,这种翻译与复制之间的转换认为是由 RNA 结合蛋白 - 多聚结合蛋白 - 2 (PCBP2, poly(rC)-binding protein-2)所调控。多聚结合蛋白也能够与 HCV 5' -NTR 相结合,如 PCBP-2 能够与结构 I 区和结构 II 区结合,但其在 HCV 复制与翻译中的具体功能目前还不清楚。

5' -NTR 在翻译和复制中的功能受到越来越多的关注,对其深入的研究将为进一步了解 HCV 感染慢性化机制,以及药物开发提供新的方向和基础。

3 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 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
- 3 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区及其结合蛋白的研究进展. 国外医学微生物学分册 2001;24:7-9
- 4 Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4942-4946
- 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, 1997:83
- 6 Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo QL, Houghton M. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1711-1715
- 7 Chen PJ, Lin MH, Tai KF, Liu PC, Lin CJ, Chen DS. The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA. *Virology* 1992;188:102-113
- 8 Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-2455
- 9 Borman AM, Bailly JL, Girard M, Kean KM. Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. *Nucleic Acids Res* 1995;23:3656-3663
- 10 Yoo BJ, Spaete RR, Geballe AP, Selby M, Houghton M, Han JH. 5' end-dependent translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translational control elements within the 5' untranslated region. *Virology* 1992; 191:889-899
- 11 Rijnbrand RC, Abbink TE, Haasnoot PC, Spaan WJ, Bredenbeek PJ. The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* 1996;226:47-56
- 12 Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4942-4946
- 13 Kleter GE, van Doorn LJ, Brouwer JT, Schalm SW, Heijntink RA, Quint WG. Sequence analysis of the 5' untranslated region in isolates of at least four genotypes of hepatitis C virus in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 1994;32:306-310
- 14 Psaridi L, Georgopoulou U, Varaklioti A, Mavromara P. Mutational analysis of a conserved tetraloop in the 5' untranslated region of hepatitis C virus identifies a novel RNA element essential for the internal ribosome entry site function. *FEBS Lett* 1999;453:49-53
- 15 Brown EA, Zhang H, Ping LH, Lemon SM. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5041-5045
- 16 Honda M, Brown EA, Lemon SM. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 1996; 2:955-968
- 17 Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 1999;73:1165-1174
- 18 Tang S, Collier AJ, Elliott RM. Alterations to both the primary and predicted secondary structure of stem-loop IIIc of the hepatitis C virus 1b 5' untranslated region (5' UTR) lead to mutants severely defective in translation which cannot be complemented in trans by the wild-type 5' UTR sequence. *J Virol* 1999;73:2359-2364
- 19 Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 1992;66:1476-17483
- 20 Pilipenko EV, Gmyl AP, Maslova SV, Svitkin YV, Sinyakov AN, Agol VI. Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA. *Cell* 1992;68:119-131
- 21 Wang CY, Dominguez G, Frey TK. Construction of rubella virus genome-length cDNA clones and synthesis of infectious RNA transcripts. *J Virol* 1994;68:3550-3557
- 22 Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 1993;67:3338-3344
- 23 Rijnbrand R, van der Straaten T, van Rijn PA, Spaan WJ, Bredenbeek PJ. Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J Virol* 1997;71:451-457
- 24 Rijnbrand R, Bredenbeek P, van der Straaten T, Whetter L, Inchauspe G, Lemon S, Spaan W. Almost the entire 5' nontranslated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett* 1995;365:115-119
- 25 Reynolds JE, Kaminski A, Carroll AR, Clarke BE, Rowlands DJ, Jackson RJ. Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA* 1996;2:867-878
- 26 Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D, Lemon SM. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 1996;222:31-42
- 27 Kalliampakou KI, Psaridi-Linardaki L, Mavromara P. Mutational analysis of the apical region of domain II of the HCV IRES. *FEBS Lett* 2002;511:79-84
- 28 Lytle JR, Wu L, Robertson HD. The ribosome binding site of hepatitis C virus mRNA. *J Virol* 2001;75:7629-7636
- 29 Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, Murray MG, Doudna JA, Lau JY, Baroudy BM. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J Virol* 2000;74:10430-10437
- 30 Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057
- 31 Kim YK, Kim CS, Lee SH, Jang SK. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:105-112

乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响

成军

成军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, No. C03011402
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@genetheray.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-01-11 接受日期: 2003-02-16

成军. 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1023-1027

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1023.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染靶细胞之后, 在完成自身复制和表达的生活周期的同时, 所产生的病毒大分子, 如肝炎病毒的 DNA/RNA 和蛋白分子等这些外源性大分子, 对于肝炎病毒感染的靶细胞产生一系列不同的影响^[1-7]. 肝炎病毒大分子对于感染靶细胞的这些影响是肝炎病毒感染后致病机制的主要组成部分. 因此, 研究乙型和丙型肝炎病毒的核酸成分和蛋白质成分对肝细胞的影响具有十分重要的意义. 由于肝炎病毒蛋白的产生, 改变了肝炎病毒靶细胞的正常的信号转导途径, 引起细胞的病变, 甚至是恶性转化, 以至于发生肿瘤^[8-13]. 14-3-3 蛋白家族是细胞主要的信号转导相关蛋白因子, 研究表明, 肝炎病毒对于 14-3-3 蛋白家族所介导的信号转导也具有显著的影响.

1 14-3-3 蛋白家族的组成和主要生物学作用

在目前研究过的所有类型的真核细胞中都有不同的 14-3-3 家族基因的表达^[14-18]. 自然状态的 14-3-3 蛋白都是以同二聚体(homodimer)或异二聚体(heterodimer)的形式存在, 主要的功能就是作为接头(adapter)蛋白, 与其他蛋白分子结合, 进而调节其他蛋白分子的生物学功能. 因此, 14-3-3 蛋白参与许多生物学过程, 如应激(stress)、细胞周期(cell cycle)、细胞凋亡(apoptosis)的调控, 有时还作为接头蛋白、激活剂以及抑制剂等. 目前在美国国立医学图书馆国立生物工程中心建立的核苷酸序列数据库(GenBank)中已经登录了来源于不同生物的 133 条 14-3-3 家族蛋白的全长编码基因. 目前已知有 7 种 14-3-3 亚型(β 、 γ 、 ζ 、 ϵ 、 τ 、 η 、 σ) ζ 亚型迄今仅在哺乳动物细胞中发现. Miura et al^[19]从蛙等生物中克隆到 14-3-3 ζ 基因, 编码产物由 245 个氨基酸残基(aa)组成, 与大鼠、牛的 14-3-3 ζ 同源性为 92%, 与人 14-3-3 ζ 即磷

脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2)的同源性为 92%. Northern blot 分析结果表明, 14-3-3 ζ mRNA 在脑、肺、脾、肾等组织中具有高水平的表达, 在心脏、睾丸中表达水平较低, 在肝脏、胰腺、卵巢、肌肉中表达水平很低. 另外, 基因的 3' - 非翻译区(3' - UTR)在人、蛙的 14-3-3 ζ cDNA 中都是高度保守的. 结果表明, 在进化过程中, 14-3-3 ζ 基因序列是高度保守的. Ferl et al^[20]等的研究以 14-3-3 保守核心区的序列进行的遗传树分析结果表明, 植物细胞中的 14-3-3 蛋白可以很清楚地分为 2 个不同的亚组. 14-3-3 蛋白的核心区编码产物具有疏水和亲水双歧性沟槽(amphipathic groove), 是与其他蛋白结合的关键结构位点, 也是 14-3-3 蛋白中保守的结构域. 相比较而言, 14-3-3 蛋白的氨基和羧基末端序列变异较大.

由于 14-3-3 蛋白家族结合的蛋白类型十分复杂, 因此 14-3-3 蛋白的生物学功能也十分复杂. 14-3-3 蛋白的生物学功能主要是通过其结合蛋白类型来体现的. 14-3-3 蛋白与具有丝氨酸 / 苏氨酸磷酸化位点的蛋白结合, 类似含有 SH2 位点和磷酸酪氨酸结合(phospho-tyrosine binding, PTB)位点的蛋白的功能. Tzivion et al^[21]对于 14-3-3 蛋白的生物学功能进行了初步的总结. 14-3-3 蛋白通过对 Raf、MLK、MEKK、PI-3 激酶、IRS-1 等的激活作用, 对信号转导途径进行调节, 通过对 Cdc25、Wee1、CDK2、中心体(centrosome)的作用, 对于细胞周期进行调节, 通过对 BAD、ASK-1 的影响, 对于细胞凋亡进行调节, 通过对 FKHRL1、DAF-16、p53、TAZ、TLX-2、组蛋白去乙酰酶(histone deacetylase)等的调节, 对转录调节过程具有显著的影响. 但与含有 SH2、PTB 结构位点的蛋白不同, 14-3-3 主要介导蛋白 - 蛋白之间的结合, 并改变结合靶蛋白的生物学功能.

2 14-3-3 蛋白对于细胞信号的转导的影响及机制

2.1 14-3-3 蛋白与脂肪酸结合蛋白 Odani et al^[22]制备了大鼠重组皮肤脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein, FBP)的多克隆抗体, 进行免疫印迹分析时, 发现没有识别 30 kD 的皮肤 FBP, 而是识别 15 kD 的大鼠皮肤细胞质中的 FBP. 这种蛋白存在于大鼠的几种器官以及小鼠的 3T3 L1 细胞系中. 30 kD 蛋白的蛋白酶消化片段的序列分析结果表明, 这些蛋白是真核细胞信号转导分子 14-3-3 蛋白家族的混合物. ϵ 亚单位单独存在时, 免疫印迹反应也是阳性结果. 因此认为这种 30 kD 蛋白就是 14-3-3 蛋白的 ϵ 亚单位. 尽管在一级结构序列上 FBP 与 14-3-3 蛋白亚单位之间没有显著的同源性, 但具有抗体识别的共同的结构域. 已知 14-3-3 蛋白和 FBP 都能与一系列共同的蛋白相结合, 因此推测这两种蛋白可以相互作用, 对于其他蛋白的结合产生影响.

2.2 14-3-3蛋白与糖皮质激素受体信号转导 Widen et al^[23]研究了14-3-3蛋白与糖皮质激素信号转导之间的关系. 糖皮质激素受体(GR)的功能就是一种配体依赖性的转录因子. 利用亲和层析的技术从去肾上腺的大鼠的肝脏中分离纯化GR, 以期发现未知的细胞质中GR结合蛋白. 结果发现了广泛存在的14-3-3和Raf-1蛋白. Raf-1是Ras下游的信号转导蛋白, 作为GR的结合蛋白得到同时纯化. 在半定量的配体/激活GR分析中, 表明与14-3-3和Raf-1之间有最强的结合活性, 但14-3-3在非配体/非激活状态下也能与GR共同纯化. 经过充分的含盐缓冲液的洗涤, 糖皮质激素也能诱导GR与14-3-3、Raf-1之间的结合. 应用体外免疫共沉淀技术也证实GR与14-3-3蛋白之间的结合. 这些研究结果提示GR与Raf-1存在于大鼠肝脏细胞质同一个蛋白复合体中, 即受体蛋白体(receptosome)中, 可以部分解释糖皮质激素对于Raf-1-Ras信号转导途径的影响的分子机制.

2.3 14-3-3蛋白与胰岛素信号转导 Ogihara et al^[24]研究了14-3-3蛋白与胰岛素信号转导之间的相互关系. 胰岛素与其受体结合诱导细胞质中的底物, 即胰岛素受体底物-1(IRS-1)、IRS-2发生磷酸化修饰, 与几种含SH-2结构域蛋白有关. 为了分离鉴定IRS-1结合蛋白, 以³²P-标记的重组IRS-1蛋白对于人心脏cDNA表达型文库进行筛选, 得到了 ϵ 和 ζ 亚型的14-3-3蛋白. L6肌管、HepG2、中国仓鼠卵母(CHO)细胞、牛脑组织中都有与14-3-3蛋白结合的IRS-1蛋白. IRS-2是一种结构上与IRS-1相似的蛋白, 与14-3-3蛋白也能结合. 与IRS-1结合的14-3-3蛋白数量, 并不受胰岛素刺激的影响, 但以爪哇酸(okadaic acid)这种丝氨酸/苏氨酸磷酸酶抑制剂刺激之后结合数量显著增加. 应用含有磷酸丝氨酸的IRS-1多肽进行的多肽抑制实验(peptide inhibition experiment)结果表明, IRS-1分子中含有3段与14-3-3蛋白结合的位点: Ser-270、Ser-374和Ser-641. 这3个位点中, Ser-270位于IRS-1结合的磷酸丝氨酸位点, 与胰岛素受体的结合有关. 仅含有磷酸丝氨酸结合位点的截短型IRS-1仍保留与14-3-3体内结合的功能. 与IRS-1的抗体进行的免疫共沉淀技术研究结果相比较, 以14-3-3抗体进行的免疫共沉淀研究, 胰岛素刺激之后IRS-1仅在酪氨酸、丝氨酸位点发生较弱的磷酸化修饰. 因此, 14-3-3蛋白可能在胰岛素敏感性方面具有一定的意义, 其机制就是通过与IRS-1之间的相互作用. 磷酸二酯酶3B(phosphodiesterase-3B PDE-3B)是脂肪细胞中主要的磷酸二酯酶, 主要抵抗胰岛素对于脂肪的分解. 胰岛素诱导PDE-3B的磷酸化和激活过程是PI3-K和Akt依赖性的但PDE-3B激活的具体机制目前还不清楚. Onuma et al^[25]用酵母双杂交技术研究发现14-3-3 β 这种信号转导过程中的重要脚手架蛋白可以与PDE-3B结合, PDE-3B与14-3-3 β 的结合在体外也得到证实. 以谷胱甘肽S-转移酶(GST)为标签的14-3-3 β 与大鼠脂肪细胞内源性的PDE-3B蛋白结

合, 当脂肪细胞受到胰岛素的刺激后这种结合得到增强. 免疫共沉淀技术也证实大鼠脂肪细胞中PDE-3B与14-3-3 β 蛋白也能结合, 这种结合也因为受到胰岛素的刺激而增强. 2种PI3-K抑制剂wortmannin和Ly294002可以阻断这种诱导, 表明PI3-K是必须的. 合成的含有Ser-279或-302位点的15肽可以抑制这种结合. 提示胰岛素调节的这些丝氨酸位点的磷酸化参与这一调节过程. 因为IRS-1也可以与14-3-3结合, 在胰岛素激活PDE-3B的过程中, 14-3-3 β 作为脚手架蛋白而发挥作用.

2.4 14-3-3蛋白与细胞凋亡调节 Masters et al^[26]研究了14-3-3蛋白在细胞凋亡调节中的作用和意义. 14-3-3蛋白具有抑制Bad和其他细胞凋亡相关的蛋白的作用因而认为14-3-3具有促进细胞存活的作用. 应用14-3-3/配体相互作用的特异性抑制剂difoepin进行研究, 证实difoepin的表达可以诱导细胞凋亡. 应用许多的生长和死亡信号转导因子进行的研究也得出了一致的结论14-3-3/配体之间的结合承接上游促进细胞生存的信号向细胞凋亡核心调节机制转导, 促进细胞的存活. 因为这些上游的激酶信号经常在肿瘤形成过程中被激活, 因此对于difoepin在抗肿瘤药物诱导的细胞死亡的作用进行了研究. 发现difoepin可增强顺铂的抗肿瘤作用. 这些研究结果表明, 14-3-3通过与Bad等其他配体分子的相互作用, 对细胞的存活至关重要. 抑制14-3-3的功能可能是肿瘤治疗的新靶位.

2.5 14-3-3蛋白与神经系统信号转导 Le Bouffant et al^[27]的研究发现, 针对PCTAIRE-1羧基末端的抗体可以识别啮齿类脑中3种不同的蛋白. 分子量最大的一种主要分布在小脑、海马回和脑皮质中. 在电泳中与PCTAIRE-1分子量相似, 并相互作用, 就象重组的PCTAIRE-1与p11、14-3-3蛋白一样. 将p11或14-3-3亲和树脂与洗脱下来的蛋白进行免疫共沉淀分析, 可以获得纯化的全长的PCTAIRE-1蛋白, 并具有激酶活性. 这一结果表明PCTAIRE-1是脑中具有活性的蛋白激酶. PCTAIRE-1催化活性中心对所有的CDK分子都是一样的, 但在酵母双杂交系统中与p11、14-3-3蛋白酶有相互作用. PCTAIRE-1蛋白的氨基末端和羧基末端都参与和p11、14-3-3蛋白质间的相互作用, 提示立体三维结构的形成在蛋白-蛋白相互作用中的重要地位. PCTAIRE-1羧基末端的抗体识别的30 kD的蛋白在脑中几乎所有部位都有分布, 核苷酸数据库搜索证实来源于染色体1q24-1q25位点的262D12片段中包含了这一分子量大约为26 kD蛋白的编码基因序列, 与已知基因序列没有显著的同源性. 但核苷酸序列数据库中有许多DNA序列的局部与其同源性达到100%.

2.6 14-3-3蛋白与马铃薯球蛋白的结合 马铃薯球蛋白(tuberin)是结节硬化复合物2肿瘤抑制基因(tuberous sclerosis complex 2 tumor suppressor gene)的编码产物, 其磷酸化形式是Akt信号转导下游磷脂酰肌醇3'-激

酶(phosphatidylinositol 3'-kinase, PI3K)的负调节因子. Liu et al^[28]在马铃薯球蛋白分子中鉴定出几种 14-3-3 的结合位点, 与 Akt 磷酸化位点相重叠. 马铃薯球蛋白抗体的 14-3-3 α 结合位点特异性抗体的识别与有丝分裂原诱导的马铃薯球蛋白的磷酸化以及 Akt α 磷酸化底物抗体的识别过程相关. 抑制 PI3K 的蛋白激酶活性就可以抑制 2 种抗体对于马铃薯球蛋白的分子的识别. 利用蛋白结构域芯片分析, 含有 Ser-939 结构位点的多肽是与 14-3-3 特异性结合的结构位点. 谷光甘肽 S-转移酶的 pull-down 分析结果表明, 与 14-3-3 的融合蛋白研究结果表明, 所有 7 种 14-3-3 亚型都能与马铃薯球蛋白结合. 这种结合受到 Ser-939 位点磷酸化的多肽片段的竞争性结合抑制, 但是没有磷酸化修饰的多肽不能进行抑制. 马铃薯球蛋白与 14-3-3 可以进行免疫共沉淀. 这些结果表明, 马铃薯球蛋白分子结构中含有 14-3-3、Akt 识别的位点.

2.7 14-3-3 蛋白与 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 Sato et al^[29]研究发现 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1)在激活蛋白激酶 A、G、C 中具有重要作用. PDK1 在调节 Akt Thr-308 位点的磷酸化及其活性中具有重要作用. 以前认为 PDK1 激酶活性是持续性的, 但目前的观点认为受到其他蛋白的调控, 如蛋白激酶 C 相关激酶 2 (protein kinase C-related kinase-2, PRK2)、p90/核糖体蛋白 S6 激酶-2 (RSK2)、热休克蛋白 90 (Hsp90)等. 最近的研究结果表明, PDK1 与 14-3-3 蛋白结合, 结合位点是 Ser-241, 可以发生自身磷酸化, 对于其激酶活性至关重要. PDK1 可增加与 14-3-3 蛋白的结合的突变, 降低其体内蛋白激酶活性. 相反, PDK1 可降低与 14-3-3 蛋白的结合的突变, 提高其体内蛋白激酶活性. 野生型 PDK1 与 14-3-3 蛋白孵育, 降低其蛋白激酶活性. 可以肯定, PDK1 蛋白激酶活性受到 14-3-3 的负调节, 主要是通过其 Ser-241 位点的自身磷酸化修饰进行调节.

2.8 14-3-3 σ 与细胞周期调节 细胞周期的检验点(checkpoint)在细胞维持稳定过程中具有重要意义. Suzuki et al^[30]的最近研究结果表明, 14-3-3 σ 在 p53 的调节作用下, 对于 G2/M-期检验点具有重要影响. 为了研究 14-3-3 σ 基因是否在肿瘤细胞中被激活, 对 14-3-3 σ 基因的 5'-非翻译区的甲基化状态进行了研究. 在胃癌、结直肠癌、肝细胞癌等 22 株肿瘤细胞中, 6 株细胞的 14-3-3 σ 的 5'-非翻译区有异常的甲基化修饰. 发生甲基化之后 14-3-3 σ 的表达缺如, 这种抑制作用以 5-阿扎-2'-脱氧胞嘧啶(5-aza-2'-deoxycytidine)处理可以恢复. DNA 损伤后所出现的正常的 G2 期阻滞, 与此基因的甲基化修饰无关. 43% (26/60)的原发性胃癌 14-3-3 σ 基因高度甲基化, 在低分化腺癌中尤其如此. 发现人的肿瘤中存在 14-3-3 σ 基因由于甲基化而失活的现象.

3 乙型和丙型肝炎病毒蛋白与 14-3-3 蛋白家族的信号转导
3.1 丙型肝炎病毒感染对于皮肤中 14-3-3 蛋白信号转导的影响 Lazaro et al^[31]的研究发现皮肤扁平苔藓(cutaneous lichen planus)与慢性 HCV 感染有关. 但关于 HCV 是否感染扁平苔藓部位的角质细胞一直不十分清楚. 对于 26 例慢性 HCV 感染者皮肤活检标本和 24 例皮肤扁平苔藓患者(5 例有 HCV 感染, 19 例无 HCV 感染)的正常和皮损部位的皮肤中正链、负链 HCV RNA 进行原位杂交检测, 在健康皮肤角质细胞中 HCV RNA 的检出率为 69%, 在扁平苔藓皮肤中的检出率为 100%. 在没有 HCV 感染的皮肤苔藓患者的皮肤中没有检测到 HCV RNA. 健康皮肤与扁平苔藓皮肤相比较, HCV RNA 的检出率显著升高. 认为皮肤角质细胞的 HCV 感染与皮肤扁平苔藓的发病有关.

Ku et al^[17]发现在体内 14-3-3 蛋白家族成员可以结合人中间丝状蛋白角蛋白 18(keratin 18, K18), 而且是细胞周期、磷酸化修饰依赖性的方式. K18 的 Ser-33 位点是磷酸化位点, 在培养细胞的有丝分裂、再生的肝脏中、在体外 cdc2 磷酸化过程都是如此. 比较野生型和突变型 K18 Ser-33-Ala/Asp, 在转染细胞中发现 K18 Ser-33 位点的磷酸化修饰是 K18 与 14-3-3 结合所必需的, 对角蛋白的结构和分布都有影响. K18 蛋白另外一个磷酸化位点(Ser-52)或 K18 蛋白的糖基化修饰对于 K18 与 14-3-3 蛋白之间的结合没有影响. K18 Ser-33 位点的磷酸化在与不同的 14-3-3 蛋白结合中情况不同. K18 蛋白磷酸化 Ser-33 或磷酸化 Ser-52 形式的特异性抗体研究证实, 尽管 Ser-52 磷酸化修饰的和 Ser-33 磷酸化修饰的 K18 蛋白具有共同的分布, 但这些磷酸化修饰在不同的 K18 蛋白分子上进行的. K18 蛋白的磷酸化是 K18 与 14-3-3 蛋白质间结合所必需的, 但不是全部条件. 这种蛋白之间的结合想必是与 K18 Ser-33 位点磷酸化相关的有丝分裂条件相关, 在角蛋白的亚细胞分布中具有重要意义. 角蛋白 Ser-52 或 Ser-33 位点的磷酸化修饰, 决定其亚细胞分布特点^[32-35].

3.2 丙型肝炎病毒核心蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响 HCV 感染是引起肝脏功能异常的主要原因之一, 流行病学调查结果表明, HCV 感染与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)有关. 在 HCV 编码的蛋白中, 核心蛋白在体内、体外的细胞生长调节中具有重要作用, 但具体机制目前还不十分清楚. 研究表明, 14-3-3 家族中的几种蛋白与 HCV 核心蛋白之间具有结合作用. 4-3-3 蛋白与 HCV 核心蛋白的结合是磷酸丝氨酸依赖性的方式. HCV 核心蛋白的表达可引起 HepG2 细胞和酵母细胞中 Raf-1 蛋白激酶活性的持续升高, HCV 核心蛋白与 14-3-3 蛋白之间的结合是 HCV 核心蛋白激活 Raf-1 蛋白激酶所必需的. 这些结果表明, HCV 核心蛋白可能代表了通过与 14-3-3 相结合激活 Raf-1 激酶独特的信号转导通路, 在调节肝细胞生长过程中具有十分重要的作用^[36-39].

3.3 乙型肝炎病毒X蛋白对14-3-3蛋白信号转导的影响
Diao et al^[40]研究了HBxAg对Fas介导的细胞凋亡具有抑制作用,对于细胞生存具有促进作用。Fas介导的细胞凋亡是肝脏疾病过程中肝细胞损伤的主要原因。人原代肝细胞和小鼠胚胎成纤维细胞的实验表明,抗-Fas抗体诱导的细胞凋亡可被HBxAg的表达所抑制。这一现象也在缺乏p53表达的小鼠红细胞白血病细胞中得到证实。说明HBxAg对于细胞凋亡的阻断是p53非依赖性的。对于HBxAg阻断细胞凋亡的信号转导途径进行研究。SAPK/JNK信号转导途径在Fas介导的细胞凋亡中的细胞存活有重要地位,激酶活性分析结果表明表达HBxAg的细胞中SAPK活性显著上调。表达HBxAg的正常的小鼠成纤维细胞可以防止死亡,但缺乏SEK1的同样的细胞中SAPK信号转导途径,无论HBxAg表达与否,都不能阻断Fas介导的细胞凋亡。HBxAg表达可以抑制细胞受到抗-Fas诱导时胱冬肽酶(caspase)3和8的活性,抑制线粒体细胞色素C的释放。共沉淀和共聚焦荧光显微图像分析结果表明HBxAg与细胞质中含有MEKK1、SEK1、SAPK、14-3-3蛋白的复合体共同分布。基因突变分析结果表明HBxAg分子结构中存在与14-3-3结合的特殊位点对于诱导SAPK/JNK活性以及防止Fas介导的细胞凋亡都有显著的相关性^[41-45]。

4 参考文献

- 1 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,李莉,刘妍,段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 2 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 3 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒NS5A抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 4 钟彦伟,成军,施双双,王刚,夏小兵,田小军,李莉,张玲霞,陈菊梅. 人源抗丙型肝炎病毒包膜蛋白E2单链抗体的研究. 中华肝病杂志 2002;10:109-112
- 5 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS4A抗原模拟表位的筛选和鉴定. 免疫学杂志 2002;18:347-349
- 6 钟彦伟,成军,王刚,田小军,陈新华,刘妍,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS₅抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝病杂志 2002;10:266-268
- 7 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
- 8 钟彦伟,成军,蔡炯,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白E2抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 9 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用噬菌体随机肽库技术筛选丙型肝炎病毒NS3抗原模拟表位. 中国病毒学 2002;17:202-205
- 10 李莉,成军,李梵,王建军,张健,吴勤,韩萍,陈国凤,纪冬,李克. 慢性丙型肝炎病毒性肝炎脂肪变的临床与病理学特点. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 11 张健,成军,李莉,刘爱兵,吴勤,李克,董菁,王琳,陆荫英. 丙型肝炎病毒感染患者血清载脂蛋白AI和AII水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 12 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟,段惠娟,芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白AI结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 13 成军,任进余,李莉,陆志檬,李克,洪源,陆荫英,王刚,刘妍,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 14 Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, Itoh F, Suzuki H, Kikuchi T, Kaneto H, Iku S, Ozeki I, Karino Y, Satoh T, Toyota J, Satoh M, Endo T, Imai K. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 σ gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:5298-5302
- 15 Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74:1736-1741
- 16 Bauer LA, O'Sullivan T, Reiss WG, Horn JR, Opheim K, Strandness DE, Carithers RL. Liver blood flow, antipyrine clearance, and antipyrine metabolite formation clearance in patients with chronic active hepatitis and alcoholic cirrhosis. *Br J Clin Pharmacol* 1994;37:375-381
- 17 Ku NO, Michie S, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4373-4378
- 18 Toivola DM, Nieminen MI, Hesse M, He T, Baribault H, Magin TM, Omary MB, Eriksson JE. Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology* 2001;34:1174-1183
- 19 Miura I, Nakajima T, Ohtani H, Kashiwagi A, Nakamura M. Molecular cloning of cDNA for the zeta isoform of the 14-3-3 protein: homologous sequences in the 3'-untranslated region of frog and human zeta isoforms. *Zoolog Sci* 1997;14:771-775
- 20 Ferl RJ, Manak MS, Reyes MF. The 14-3-3s. *Genome Biol* 2002;3:3010
- 21 Tzivion G, Shen YH, Zhu J. 14-3-3 proteins: bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* 2001;20:6331-6338
- 22 Odani S, Nakamura J, Sato T, Fujii H. Identification of a rat 30-kDa protein recognized by the antibodies to a recombinant rat cutaneous fatty acid-binding protein as a 14-3-3 protein. *J Biochem (Tokyo)* 2001;129:213-219
- 23 Widen C, Zilliacus J, Gustafsson JA, Wikstrom AC. Glucocorticoid receptor interaction with 14-3-3 and Raf-1, a proposed mechanism for cross-talk of two signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2000;275:39296-39301
- 24 Ogiwara T, Isobe T, Ichimura T, Taoka M, Funaki M, Sakoda H, Onishi Y, Inukai K, Anai M, Fukushima Y, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, Asano T. 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* 1997;272:25267-25274
- 25 Onuma H, Osawa H, Yamada K, Ogura T, Tanabe F, Granner DK, Makino H. Identification of the insulin-regulated interaction of phosphodiesterase 3B with 14-3-3 β protein. *Diabetes* 2002;51:3362-3367
- 26 Masters SC, Fu H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J Biol Chem* 2001;276:45193-45200
- 27 Le Bouffant F, Capdevielle J, Guillemot JC, Sladeczek F. Characterization of brain PCTAIRE-1 kinase immunoreactivity and its interactions with p11 and 14-3-3 proteins. *Eur J Biochem* 1998;257:112-120
- 28 Liu MY, Cai S, Espejo A, Bedford MT, Walker CL. 14-3-3 interacts with the tumor suppressor tuberlin at Akt phosphorylation site(s). *Cancer Res* 2002;62:6475-6480
- 29 Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Regulation of kinase activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3. *J Biol Chem* 2002;277:39360-39367
- 30 Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K. Inactivation of the 14-3-3 σ gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res* 2000;60:4353-4357
- 31 Lazaro P, Olalquiaga J, Bartolome J, Ortiz-Movilla N, Rodriguez-Ingigo E, Pardo M, Lecona M, Pico M, Longo I, Garcia-Morras P, Carreno V. Detection of hepatitis C virus RNA and core protein in keratinocytes from patients with cutaneous lichen planus and chronic hepatitis C. *J Invest Dermatol* 2002;119:798-803
- 32 Espejo A, Cote J, Bednarek A, Richard S, Bedford MT. A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions. *Biochem J* 2002;367:697-702
- 33 Masters SC, Subramanian RR, Truong A, Yang H, Fujii K, Zhang H, Fu H. Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Biochem Soc Trans* 2002;30:360-365

- 34 Ku NO, Liao J, Omary MB. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J* 1998; 17:1892-1906
- 35 McGonigle S, Beall MJ, Pearce EJ. Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with TGF β receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the TGF β response. *Biochemistry* 2002;41:579-587
- 36 van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 2001;23:936-946
- 37 Muslin AJ, Xing H. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* 2000;12:703-709
- 38 Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40: 617-647
- 39 Baldin V. 14-3-3 proteins and growth control. *Prog Cell Cycle Res* 2000;4:49-60
- 40 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;276:8328-8240
- 41 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,刘妍,王刚,洪源,王贺,芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白的基因. *解放军医学杂志* 2003;28:50-52
- 42 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 结合蛋白基因. *解放军医学杂志* 2003;28:31-33
- 43 钟彦伟,成军,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白抗原模拟表位. *解放军医学杂志* 2003;28:34-37
- 44 钟彦伟,成军,蔡炯,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS4A 抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:37-39
- 45 钟彦伟,成军,施双双,王刚,陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:53-54

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@genetheray.com.cn
电话:010-66933392 传真:010-63801283
收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-16

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(7):1027-1030

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1027.asp>

0 引言

生物的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, 非常有用. 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了. 这些酪氨酸残基通常位于 PTK 域的 C- 末端和蛋白分子的 C- 端末尾之间的区域内^[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 9 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 激酶家族它具有三个基本结构域: 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

- 34 Ku NO, Liao J, Omary MB. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J* 1998; 17:1892-1906
- 35 McGonigle S, Beall MJ, Pearce EJ. Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with TGF β receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the TGF β response. *Biochemistry* 2002;41:579-587
- 36 van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 2001;23:936-946
- 37 Muslin AJ, Xing H. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* 2000;12:703-709
- 38 Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40: 617-647
- 39 Baldin V. 14-3-3 proteins and growth control. *Prog Cell Cycle Res* 2000;4:49-60
- 40 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;276:8328-8240
- 41 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,刘妍,王刚,洪源,王贺,芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白的基因. *解放军医学杂志* 2003;28:50-52
- 42 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 结合蛋白基因. *解放军医学杂志* 2003;28:31-33
- 43 钟彦伟,成军,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白抗原模拟表位. *解放军医学杂志* 2003;28:34-37
- 44 钟彦伟,成军,蔡炯,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS4A 抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:37-39
- 45 钟彦伟,成军,施双双,王刚,陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:53-54

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@genetheray.com.cn
电话:010-66933392 传真:010-63801283
收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-16

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(7):1027-1030

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1027.asp>

0 引言

生物的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, 非常有用. 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了. 这些酪氨酸残基通常位于 PTK 域的 C- 末端和蛋白分子的 C- 端末尾之间的区域内^[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 9 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 激酶家族它具有三个基本结构域: 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, 其氨基端的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, 已发现他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 被分子间和分子内两种二聚机制激活^[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 二聚体中两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. 开始他作为一种保守域在许多胞质的 PTK, 包括病毒癌基因 v-fps/fes 和 v-src 中发现. 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 p130 gag-/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偶联, 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 PDGF 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物, 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: lck 蛋白(p56^{lck})和 fyn 蛋白(p59^{fyn}), 皆为细胞癌基因产物; Syk 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^{lck} 和结合于 TCR/CD3 的 p56^{fyn} 两种 PTK 激活. 激活的 lck 和 fyn 蛋白藉助其 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, 即磷酸酰肌醇途径; 同时, 酪氨酸激活基序(tyrosine-based activation motif, 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-2、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^[18]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^[19].

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^[20,21]. HBxAg 因此是许多转录元件和因子的激活剂^[22,23]. 许多报告表明 HBxAg 的活性是因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^[24]. HBxAg 激活 Src 对病毒复制非常重要, Klein et al^[25]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力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分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^[26-32],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^[33,34]以及 RNA 聚合酶 III 指导的转录^[35]. 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^[36].

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^[37]. 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 IFNARI 和 IFNARII 有关的细胞质 PTK 激酶(Tyk2 和 Jak1)的活化^[38]. Heim et al^[39]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^[40]认为 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^[41]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, Kleine 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, Kawakatsu H, Takeda T, Sakon M, Nagano H, Sakai T, Miyoshi E, Noda K, Tsujimoto M, Wakasa K, Monden M, Matsuura N. Activation of c-Src gene product in hepatocellular carcinoma is highly correlated with the indices of early stage

- phenotype. *J Hepatol* 2001;35:68-73
- 18 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
 - 19 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
 - 20 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
 - 21 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
 - 22 Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1562-1569
 - 23 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
 - 24 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
 - 25 Klein NP, Bouchard MJ, Wang LH, Kobarg C, Schneider RJ. Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO J* 1999;18:5019-5027
 - 26 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
 - 27 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
 - 28 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
 - 29 Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, Natoli G. Hepatitis B virus pX activates NF-kB-dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol* 1996;70:641-646
 - 30 Su F, Schneider RJ. HBV HBx protein activates transcription factor NF-kB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol* 1996;70:4558-4566
 - 31 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
 - 32 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
 - 33 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
 - 34 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
 - 35 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
 - 36 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11215-11219
 - 37 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
 - 38 Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 1992;70:313-322
 - 39 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
 - 40 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
 - 41 Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 2002;195:641-653

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第二届全国期刊奖百种重点期刊

本报讯 为了进一步繁荣期刊出版事业, 2002年9月, 经中共中央宣传部同意, 新闻出版总署决定举办第二届全国期刊奖评选活动。经过反复审核, 全国共推荐出参评科技期刊522种。这些参评期刊经过评选办公室的参评资格审查、出版规范审查、广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行评选。2002年12月初产生评选入围期刊, 并将初评结果在《光明日报》、《科技日报》、《中国新闻出版报》和《中国图书商报》公示, 接受全社会的监督, 最终评出国家期刊奖科技类30名, 国家期刊奖提名奖50名, 国家期刊奖百种重点期刊99名。世界胃肠病学杂志英文版(World Journal of Gastroenterology)获得第二届全国期刊奖百种重点期刊, 并荣获获奖证书、奖杯和获奖徽标。

国家期刊奖是期刊业中最权威的、也是最具影响的奖项。我们衷心感谢全体编委及作者、读者对世界胃肠病学杂志英文版的支持, 希望在今后能继续得到大家的关心爱护和大力支持, 争取更大的成绩。

(世界胃肠病学杂志社 2003-01-23)

北京大学医学部研究生分子肿瘤学课堂讨论及学术论坛纪要

吕有勇, 许小青

吕有勇, 许小青, 北京大学临床肿瘤学院, 北京市肿瘤研究所, 肿瘤分子生物学实验室 北京市 100034
项目负责人: 吕有勇, 100034, 北京市西城区大红罗厂街1号, 北京大学临床肿瘤学院, 北京市肿瘤研究所, 肿瘤分子生物学实验室. yonglyu@public.bta.net.cn
电话: 010-66171122-2021 传真: 010-66175832
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-04-26

吕有勇, 许小青. 北京大学医学部研究生分子肿瘤学课堂讨论及学术论坛纪要. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1031-1034

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1031.asp>

编者按 本年度研究生分子肿瘤学课程结束了, 如何进行考试, 通过征求参加上课学生的意见, 改变了考试的方式, 组织了一次课堂学术讨论, 具体方式采用学生自由组合成7组, 并根据论坛的主题选择自己最感兴趣的科学问题, 每组人员自由组合. 针对提出的一个科学问题进行学术讨论后, 制成多媒体幻灯, 选出一名代表进行演讲, 时间10 min, 讨论5 min. 同时每人可选一个自己感兴趣的题目进行论述, 限500字, 并要附最新的参考文献.

由北京大学临床肿瘤学院开设的分子肿瘤学课程, 承担授课的教授都是工作在科研一线的中青年科学工作者, 他们结合自己的科研工作实际, 对每一个专题都从历史回顾、实验研究的重要发现和展望几个方面进行重点论述. 并强调课堂讨论, 通过课程的学习使教师和学生对人类征服肿瘤的历程和肿瘤生物学有了新的认识.

当今的社会生活中, 健康已成为人类的第一需求. 由于疫苗和抗生素的发现, 人类的寿命不断延长, 由此带来了肿瘤的高发病率. 人类为征服癌症的努力, 可以追溯至公元前. 近一个100 a以来, 通过对癌症的研究, 人类在生命科学上有了显著的进步, 尤其是对机体的生长发育、遗传与进化、免疫防御、衰老死亡等生命现象的认识有了突破性的进展. 而且, 人类在病毒与肿瘤、细胞分化与肿瘤、细胞周期与肿瘤、癌基因、抑癌基因、信号传导与肿瘤和新生血管形成与肿瘤转移等方面也取得进展. 但是, 人们对肿瘤的认识仍然非常有限. 虽然我们有足够的理由相信人类征服肿瘤的前途是光明的, 同时也要清醒地认识到, 新陈代谢和生长发育、衰老死亡是生命的基本特征. 所以, 人类征服癌症应该遵循自然规律的法则.

随着社会的发展和科技的进步, 人类对肿瘤的认识逐步深入. 特别是边缘学科和新技术的出现与整合给生命科学注入了无限的活力. 基因组学、蛋白组学和生物信息学, 与之伴行发展起来的生物芯片技术等为人

类认识细胞癌变和肿瘤发生发展的规律提供了新的途径. 疾病基因识别、功能基因学、蛋白组学、生物信息学的统一之日, 可能是机体内环境平衡调节的细胞、分子机制阐明之时.

对于研究生的考试形式, 过去多沿用传统的笔试, 以回答老师出的题目为主. 作为知识创新主力军的研究生群体如何学习? 如何思考? 如何适应新时代科学发展的要求? 是我们共同探讨的问题. 对于这次分子肿瘤学课程考试方式的尝试, 学生们表示赞同, 认为这是对于研究生课程的一次革新, 在准备资料的过程中主动的学习了感兴趣的知识, 克服了用读教科书的方式读文献的方法学问题, 培养了合作精神, 在上台发言的过程中得到了锻炼.

同学们针对目前肿瘤研究的前沿和重要科学问题, 结合课程学习和工作实践发表了他们的学术观点. 现将部分学术观点和讨论的内容展现给大家, 欢迎有兴趣的师生参与讨论

1 从肿瘤基因标志物的研究看人类征服癌症的历程^[1,2]
肿瘤标志物是肿瘤细胞本身存在或分泌的特异性物质, 早在1846年, Bence Jones就在多发性肿瘤患者的尿液中发现了一种特殊的蛋白质, 这就是临床医生所熟知的本-周氏蛋白, 由此, 肿瘤早期诊断的意识开始产生. 在随后100 a来, 随着技术和人们认识的不断提高, 肿瘤标志物也越来越引起重视, 在征服肿瘤的道路上又前进了一步. 肿瘤标志物一般按产生的方式分为两大类, 即肿瘤组织产生及肿瘤与宿主相互作用而产生. 前者包括胚胎抗原、酶及同工酶、组织特异性抗原、糖蛋白、唾液酸等. 另一类是肿瘤与宿主之间产生的, 他包括血清铁蛋白、免疫复合物、急性期蛋白、多种细胞因子等. 由于各种免疫标记技术的快速发展, 所检肿瘤指标越来越多, 对肿瘤的早期诊断、观察评价治疗的效果及判断愈后有极大的意义. 近年来国内外学者一致认为动态观察和多种标志物联合检测, 并结合临床表现, 特别是影像特点综合判断, 是提高肿瘤诊断阳性率最富有成效的方法与措施. 在人类征服癌症的历程中, 标志物发挥着越来越令人瞩目的作用. (姚丽华)

2 扑朔迷离的肿瘤发生机制^[3]

以往的研究提示, 恶性肿瘤的重要特征是两个水平的改变即基因水平和表型水平. 最近有人提出发育异常也会导致肿瘤细胞独特性的改变即去分化, 肿瘤表型异

常是由于肿瘤细胞反演正常的分化过程引起的,还是由于肿瘤正常分化受到抑制而引起的,仍然是争论的焦点.肿瘤的侵袭和转移过程非常类似胚胎的发育过程,有一些儿童和青春期肿瘤被认为是“胚胎源性”的.通常认为发育过程只是在胚胎期,实际严格意义的发育过程在胚胎发育成熟、离开母体后仍在继续.肿瘤的发生可以看作是一微观进化过程,这种进化最终导致肿瘤的发生,基因的改变仅仅是整个进化过程的一部分.体细胞的基础突变率很高,体细胞良性克隆性基因改变,使细胞系存活,而体细胞恶性克隆性改变,可独立于正常细胞的发育过程,并且与其竞争发育,产生新的(寄生性)器官即肿瘤.微观进化正如宏观进化过程,肿瘤的基因水平的改变可能会影响发育过程的进行,这种发育过程可以产生新的器官,并获得与起源器官不同的新的特性即发生表型的改变,正是在这一点上肿瘤发生的基因水平、表型水平、发育水平达到了统一.随着科学研究的进行,对于肿瘤的发生机制可能还会有新的观点,新的理论产生,这最终有利于人类揭示肿瘤发生的奥秘,攻克肿瘤.(姚金燕)

3 细胞周期调控异常与肿瘤基本生物学特性的关系^[4]

细胞周期受体内外多种因子,多种层次调控,其中最重要的为 Cyclin, CDK, CKI. 现在以发现的细胞增生调控三大途径分别是: (1)Ras 信号网络; (2)抑癌基因 P53 及其靶基因产物之一 P21 以及 CDK(S)-CyclinE 复合物等; (3)CyclinD1, CDK4, P16 及 PRB 构成的反馈调节环路. 细胞周期有两个重要的转换点: G1/S 和 G2/M, 在他们的转换中设有“关卡”. 控制这些关卡即可以实现对细胞周期的调控,有一些学者认为,肿瘤发生的最根本的原因是这两个关卡的失控,使得原本应该停止增生的细胞或生理凋亡的细胞不停的进入细胞周期,因而导致细胞的恶性增生. 肿瘤的发生是正常染色体多重损失的复杂过程,其最终表现为细胞周期调控机制的紊乱,分化受阻,细胞表现为无限制、自主的增生和分裂.不可控制的细胞增生是恶性肿瘤的特征. 肿瘤的恶性增生从生物学角度看主要表现在两个方面:一方面是肿瘤细胞的“不灭性”,即凋亡障碍;另一方面是细胞分裂的失控,即细胞周期网络调控系统的障碍.这两点都是目前肿瘤研究的热点.(康辉)

4 p53 基因 - 一把双刃的剑^[5]

在肿瘤的研究中发现一类基因,称之为抑癌基因,如果其功能失活或出现基因缺失,突变异常,可导致细胞恶性化而发生肿瘤. p53 基因作为抑癌基因,他能有效的抑制肿瘤的发生,他的突变和缺失以被证实是许多肿瘤发生的原因之一.但是,在细胞水平,端粒的丢失、放射性照射等刺激因子能激活 p53 基因的活性导致细胞分化的终止和细胞凋亡,而在整个组织的水平,激活 p53 的活性,能抑制肿瘤的发生和导致早衰.

Tyner et al 通过分子生物学技术使 p53 基因的 5' - 末端缺失,只留 3' - 端编码短肽的基因,称为 m 基因.带有 p53 基因和 m 基因的 P^{+/m} 基因小鼠与野生的小鼠相比具有较高的 p53 活性,较强的抑制肿瘤的能力,患癌的机会较低,但是平均寿命只有 98 wk,较正常的小鼠 118 wk 的寿命短 20%,且 P53^{+/m} 基因小鼠表现早衰的现象.对温度敏感 p53 等位基因突变的 p53 转基因小鼠,也表现较高的 p53 基因,但是也出现早衰现象,这两种 p53 突变基因都表明 p53 具有调节组织生命的作用.这是因为体内有过多的 p53 基因时,会阻碍干细胞的分裂,使身体组织不能得到正常的补充,减弱新陈代谢的能力,加速衰老的过程.综上所述表明增加 p53 活性降低癌发生率,但是促进早衰.反之降低 p53 活性增加癌发生率,防止早衰.因此,在通过药物激活体内 p53 治疗肿瘤时,要考虑高活性的 p53 导致早衰这一副作用.(宋云扬)

5 干细胞、肿瘤、肿瘤干细胞^[6]

所谓干细胞是指通过自我再生而具有永生能力,以及具有通过分化产生特定组织的成熟细胞的能力的一类细胞,最近发现骨髓及被纯化的骨髓干细胞能够产生非造血组织,这一发现表明这些干细胞具有比预想的更强的分化潜能.

干细胞最重要的功能是具有再生能力,这是动物维持生命所必须的.因为正常干细胞和癌细胞均具有再生能力,那么最早产生的癌细胞被认为具有与正常干细胞自我再生的细胞分裂机制是合理的.许多经典的与肿瘤有关的通路也可能调控正常干细胞的过程,其中发现的最有趣的是 Wnt 信号传导通路.

对于大多数肿瘤,其突变的靶细胞是未知的,而有许多证据表明某些类型的白血病是源于造血干细胞的突变的积累,这些细胞可以启动小鼠的急性粒细胞白血病.肿瘤可以被视为一个异常器官,是由于积累突变而产生的具有无限增生潜能的致肿瘤细胞(肿瘤干细胞)引发形成的.依据对于干细胞和肿瘤细胞的研究,做出如下几点假想: (1)自我再生是肿瘤干细胞共有的特性. (2)干细胞在经过很长一段时间继续分裂,更可能积累突变而导致肿瘤. (3)在包含具有增生能力的干细胞的正常组织,其基因的改变很可能是发生于干细胞或者具有那些获得自我再生潜能的子代细胞. (4)在一些不同组织的正常干细胞和肿瘤干细胞可能具有相同的信号传导途径调控二者的增生. (5)理解了存在于干细胞和肿瘤干细胞可能相同的信号传导途径,将有助于利用正常干细胞生产药物,以及确定肿瘤干细胞的治疗靶点. (6)大多数肿瘤可能存在肿瘤干细胞,其与具有有限再生的正常干细胞比较,具有无限增生能力.(许小青)

6 肿瘤 - 睾丸抗原与肿瘤中配子发生程序的诱导假说^[7,8]
肿瘤 - 睾丸抗原(CAT)是一类组织分布局限于睾丸、胚

胎卵巢和胎盘的抗原, 目前已发现 14 个 CAT 的基因或基因家族. 其特异的组织分布和作为肿瘤疫苗的广阔前景, 使得 CAT 成为当今肿瘤免疫学研究的热点和前沿. 越来越多的证据显示 CAT 的表达与肿瘤的进展和恶性程度有关. L loyd J. Oid 最近提出“肿瘤中配子发生程序的诱导”假说, 为 CAT 研究领域打开了一个新的视角. 参与配子发生的 CAT 基因在肿瘤发生和进展过程中重新激活的可能机制包括: (1)广泛去甲基化; (2)CAT 基因调控区改变; (3)肿瘤中配子发生的启动. 配子发生和肿瘤进展相互关系下一步的研究重点主要有: 继续寻找新的 CAT; 建立肿瘤中 CAT 的表达模式与配子发生阶段的对应关系; 进一步确定 CAT 与肿瘤恶性程度的关系; CAT 的异质性表达; 确定 CAT 在配子发生、肿瘤进展及其相互关系中的作用等. (李国栋)

7 肿瘤标志物 - 甲胎球蛋白的临床新认识^[9]

甲胎球蛋白(AFP)是人类发现的第一个真正有价值的肿瘤标志物, 是诊断原发性肝癌(HCC)的重要手段. 但是随着认识水平的不断提高, AFP 在临床上的作用受到挑战.

AFP 的敏感性和特异性相互制约, 即使在最佳的敏感性和特异性的条件下, 仍有 30 % 的 HCC 患者被漏诊. 且研究发现检测的真阳性率较低, 使部分受检者经受不必要的精神负担. 病毒感染是否也影响 AFP 的敏感性和特异性病毒, 阳性时有较高的敏感性. 所以 AFP 作为 HCC 筛选、监视指标并不完全可靠, 因为结合其他临床资料, 发现更多的 AFP 阴性的 HCC 患者. (沈芳)

8 ka11 基因与肿瘤转移^[10]

1995年 Dong et al 从前列腺癌杂交细胞首次克隆出 ka11 基因, 该基因定位于人染色体 11p12, 全长 80 kb, 广泛分布于各组织, 且不同种属间 KAI1 的编码序列高度保守, 说明其有重要的生物学功能. ka11 蛋白是跨膜糖蛋白, 其细胞外端有 3 个潜在的糖基化位点, 可介导细胞与细胞外基质的相互作用, 影响细胞的侵袭转移能力. ka11 基因作为一个肿瘤抑制基因最早在前列腺癌中得到证实. 此外, 他在多种组织类型肿瘤也有转移抑制作用. 研究发现, ka11 基因的表达对瘤细胞体外生长无影响, 但可抑制细胞的运动和体外浸润能力、增强细胞钙离子的自主聚集能力以及通过调节整合素的功能影响细胞的黏附, 从而抑制肿瘤转移能力. ka11 基因表达上调可能受控于 p53 与 c-Jun 基因, 表达下调可能发生在转录后水平, 也可能与基因的杂和性丢失、等位基因丢失或复制错位有关. 但是其表达机制、表达产物的作用机制等仍需阐明. (沈华杰)

9 细胞周期与肿瘤治疗^[11]

目前, 肿瘤细胞周期机制的破坏, 主要集中在监控机制、驱动机制、界面机制三个层次上. 如监控机制的

破坏, 则细胞复制的忠实性下降, 导致遗传物质的改变, 破坏了细胞周期的驱动机制, 最终导致细胞的失控性生长, 在肿瘤细胞中, 依赖 Cyclin 的 CDK 驱动机制被激活的太容易、太强烈、太持久、表现出易激惹现象, 另一类更为常见的驱动机制的破坏是一系列 CKI、RB、P53 等终止部件, 即“刹车”失灵. 细胞周期与信号转导, 基因转录, DNA 修复, 细胞凋亡, 细胞分化等多种细胞生命活动的界面之间存在着密切联系. 从细胞生命活动过程来看, 细胞分裂, 细胞分化, 细胞死亡三种不同的细胞归宿会聚到细胞周期调控机制上来, 通过细胞周期核心机制的精确解剖、对细胞周期界面联系的深入分析以及对肿瘤破坏机制的详细解析, 使人们对肿瘤的发生、发展、有了全新的认识, 正在根本上揭示肿瘤乃至生命之谜. 基础医学的进步, 必将更好的指导临床对肿瘤的诊断、治疗. 新药物的开发, 如诱导细胞分化、凋亡的药物阻断信号传导的药物, 抑制 CDK 活性, 终止细胞周期的药物等, 随着后基因组时代的到来及蛋白质工程的开展, 人们会更有创造力, 对根治肿瘤将更有信心. (朱永强)

10 肿瘤基因诊断有无临床意义^[12]

肿瘤是一种多步骤、多基因突变所致的细胞克隆性、进化性疾病, 是一种基因病. 肿瘤分子诊断主要集中于对癌基因、抑癌基因及相关基因的检测, 分别在蛋白质、RNA、DNA 水平上进行判断. 肿瘤遗传相关的易感基因对于肿瘤高危人群的筛查具有实用价值, 如 Rb1, WTI, p53 Apc 等. k-Ras 基因突变是一种在胰腺癌、结肠癌和肺癌中发生率较高的分子病, 应用 PCR-RFLP 方法检测结肠癌患者的粪便中的 Ras 基因突变, 其检出率与肿瘤组织检出率相似, 33.3 % 基因过表达. 表达产物的检测, 用其抗体或免疫组化方法检测肿瘤组织中蛋白产物, 用 ELISA 法和 Western Blot 法检测肿瘤细胞或血液中的蛋白产物. 基因扩增的检测, 经典的方法为核酸分子杂交; 基因突变的检测, 方法有 SSCP, HA, DGGE 等, 总之有很多检测方法, 并且在不断的发展. 分子诊断是一种新型的诊断技术, 目前主要集中于研究领域, 真正应用临床使患者受益, 开展的还比较局限, 最大的问题是假阳性和假阴性, 因此建立费用低廉、结果可靠的、操作方便的分子诊断技术是迫切需要解决的问题, 随着人类基因组计划和后基因组计划的实施, 分子诊断技术也将得到进一步的成熟和完善. (赵国华)

11 抗体治疗的新靶点 - 受体酪氨酸激酶^[13,14]

随着对肿瘤研究的深入, 人们已经注意到: 信号传导中的一些组分均由一些已被鉴定的癌基因编码, 且在一些肿瘤中, 某一或一些相关组分的突变可以导致该通路的组成性活化, 而这一活化则与该肿瘤的增生性相关, 尤其是受体酪氨酸激酶的异常信号传导参与人类多种肿瘤的发生和发展. 基于此, 开发了受体酪氨酸激

酶的抑制剂,其可以作用于受体的胞外区、胞内区或传导通路下游的其他组分。过去5a中在开发具有足够的效率、生物利用度、选择性的针对受体酪氨酸激酶的酪氨酸激酶抑制剂的进程已经取得巨大的进展,其中抗-HER2单克隆抗体-trastuzumab(用于转移性乳腺癌的治疗)已经通过FDA的批准,给人类征服肿瘤带来了希望。(马建波)

12 关于一种新的肿瘤基因治疗方法的设想^[15]

Fire et al 于1998年发现双链RNA(dsRNA)被导入细胞后,当与其中的某一mRNA的有意义链或反义链相对应时,该mRNA会被降解而引起特异基因的沉默,这种现象被称为转录后基因沉默(PTGS)也称RNA干扰。由此想到针对肿瘤发生过程中基因的高表达特点,在体外合成与癌基因某一区域如启动序列同源的小型干扰RNA(siRNA)分子导入肿瘤细胞引起相应的癌基因的沉默。一个dsRNA分子能引导许多RNA酶分子,少量的dsRNA分子就能发挥作用,相对于反义核酸、核酶等,其用量低几个数量级,在nmol/l水平。由于dsRNA转染细胞后会随着细胞的裂解而被稀释,所以需要进一步研究dsRNA的半衰期,探索合适的给药量和给药时间以巩固效果。(陈颢)

13 肿瘤基因表达研究的新方法 - 荧光转移鼠模型^[16,17]

细胞培养是研究肿瘤生物学特征的重要方法,但有其固有缺陷,所以,目前国际上倾向于在实体、三维结构上进行肿瘤研究。利用动物模型模拟临床肿瘤的过程是研究肿瘤的有力的手段,最初研究者把肿瘤细胞悬液接种于免疫缺陷动物的肩皮下区,观察成瘤及浸润、转移等过程进行研究。但是癌的微生态系统学说认为癌细胞-细胞外基质-宿主细胞三者是一个动态变化的相互作用、相互影响的整体,癌细胞如果脱离其适合的微环境,将导致其生物学特征的改变。因此,完整的组织块的外科手术原位移植模型应运而生,其优点在于近乎100%的成瘤率和广泛多器官的浸润、转移,真实地模拟临床上恶性肿瘤的发展过程,甚至优于转基因动物,GFP是一种源于水母的标记物,具有无细胞毒性、化学性质稳定,不影响目的基因的表达,无需底物和共辅助因子,只需在紫外线或蓝光激发下既可发射荧光等优点。体外操作把GFP稳定整合入癌细胞的基因组内,再将癌组织块接种到裸鼠相应的器官,借助荧光显微镜能实时、定量观察癌细胞的动态变化过程,甚至在活体内观察到一个癌细胞,目前已经建立起多种恶性肿瘤的荧光转移模型。(邓华)

14 腺病毒转染mda-7选择性诱导多种肿瘤细胞凋亡^[1,2]

Mda-7是一种通过差减杂交法将人类黑色素瘤细胞株(Ho-1)由IFN- β 和Mezerin诱导而产生的细胞终分化基因,故称“黑色素瘤分化相关基因”,其编码206个氨基酸,分子量为23 800的保守蛋白,具有明显的肿瘤抑制作用,已有多个研究小组以腺病毒介导mda-7进行基因治疗实验,他可以在多种肿瘤细胞诱导细胞的凋

亡。以往研究证实,p53基因具有抑制肿瘤生长和促进凋亡的作用,但一部分肿瘤患者对p53基因治疗不敏感,而mda-7具有明显的不依赖p53的抗肿瘤活性他可以有效的抑制野生型p53、突变p53、缺失p53的肿瘤细胞株的生长,促进肿瘤细胞凋亡此外,利用腺病毒转染的mda-7对肿瘤细胞具有很高的选择性,对肿瘤周围的正常组织有无损伤作用。mda-7治疗的特异性与某些与之相互作用的蛋白的选择性有关,但是mda-7的作用通路及机制还不明确,已有的结果表明,mda-7可以非依赖p53激活dsRNA的丝氨酸/苏氨酸激酶(PKR)通过PKA磷酸化一系列目标底物,阻滞Eif-2a,导致蛋白合成受阻引发生长阻滞和肿瘤细胞凋亡。此外,凋亡作用还与mda-7非依赖p53的上调BAX有关。(沈涛)

15 参考文献

- 1 吕有勇. 21世纪的肿瘤基因和生物学展望. 世界华人消化杂志 2002;10:677
- 2 赵晓航. 肿瘤基因识别与肿瘤蛋白标志物的统一. 世界华人消化杂志 2002;10:677-678
- 3 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70
- 4 Bruno S, Tenca C, Saverino D, Ciccone E, Grossi CE. Apoptosis of squamous cells at different stages of carcinogenesis following 4-HPR treatment. *Carcinogenesis* 2002;23:447-456
- 5 Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 2002;415:26-27
- 6 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111
- 7 Chang SS, O'Keefe DS, Bacich DJ, Reuter VE, Heston WD, Gaudin PB. Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clin Cancer Res* 1999;5:2674-2681
- 8 Bruno S, Tenca C, Saverino D, Ciccone E, Grossi CE. Apoptosis of squamous cells at different stages of carcinogenesis following 4-HPR treatment. *Urology* 2001;58(2 Suppl 1):114-122
- 9 Eleanor B, Carson W, Watkins D. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Research* 2001;61:6649-6655
- 10 Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. Down-regulation of KA? messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KA? gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn Cancer Res* 1999;90:970-976
- 11 金顺钱,詹启敏. 肿瘤分子生物学是基础医学研究的前沿. 世界华人消化杂志 2002;10:678-680
- 12 Storlazzi CT, Anelli L, Specchia G. Molecular cytogenetic characterization of a novel additional chromosomal aberration in blast crisis of a Ph-positive chronic myeloid leukemia. *Cancer Gene Cytogenet* 2002;134:109-13
- 13 吕有勇. 从生物多样性和基因多态性认识肿瘤生物学行为及基因改变的异质性. 世界华人消化杂志 2002;10:690-693
- 14 Camerini T, Mariani L, De Palo G, Marubini E, Di Mauro MG, Decensi A, Costa A, Veronesi U. Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:1664-1670
- 15 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:428-429
- 16 Croix ST, Rago B, Velculescu C. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000;289:1197-1202
- 17 Pataer A, Vorburgen SA, Barber GN, Chada S, Mhashilkar AM, Zou-Yang H, Stewart AL, Balachandran S, Roth JA, Hunt KK, Swisher SG. Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7 (mda7) induces apoptosis of lung cancer cells via up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). *Cancer Research* 2002;62:2239-2243

骨髓源性肝干细胞的研究进展

杨明智, 彭志海

杨明智, 彭志海, 上海市第一人民医院普外科 上海市 20080
项目负责人: 彭志海, 20080, 上海市第一人民医院普外科. hugo88@163.net
电话: 021-33010900 传真: 021-63800900
收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-16

摘要

近年来干细胞研究取得了很大进展, 但是人类胚胎在研究中的应用一直备受争议, 因此有关人体内某些干细胞的受重视程度日益增加. 骨髓中的某些干细胞可以演变成为与其组织发育或再生来源无关的细胞类型. 卵圆细胞是一种存在于肝脏实质的专能干细胞, 研究首先发现了人及动物肝内存在骨髓来源的卵圆细胞, 之后体外骨髓干细胞向肝干细胞的成功诱导, 使这种现象的存在得到了进一步证实. 骨髓干细胞分化为肝干细胞的发现提示他可能参与了体内肝组织细胞的再生及损伤的修复与替代, 并为难治性肝病的治疗提供了新的思路. 但是, 就目前研究状况而言, 许多方面尚存在疑问, 骨髓源性肝干细胞的临床应用价值如何还有待于进一步研究.

杨明智, 彭志海. 骨髓源性肝干细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11(7):1035-1036

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1035.asp>

0 引言

干细胞参与胚胎的发育以及成熟个体多种组织的再生过程, 因此有关的基础及应用研究始终占据生命科学的前沿. 1999 年代末, 克隆羊多利的诞生及其后不久的 (1998) 人胚胎干细胞 (ES cells, embryonic stem cells) 系的成功建立^[1], 使干细胞研究受到世人空前的关注. 由于伦理道德上存在争议, 人体的克隆已被各国政府禁止. 为此, 相关领域的科学家相继转移了科研方向, 开始了干细胞工程对器官移植和疾病治疗价值的探索. 由于这些新的研究课题可以使人类直接受益, 所以好评如潮. 2000 年, 美国《科学》杂志推举干细胞的研究与应用为 21 世纪最重要的研究领域.

1 骨髓干细胞可塑性的意义

除可来源于胚胎外, 成年个体的某些组织和器官中也存在一定数量的干细胞. 由于有关人类胚胎的研究同样受到伦理道德的限制, 成体干细胞的研究地位就愈显重要. 最近的有关实验与临床研究证实, 骨髓中的干细胞在特定环境下可分化成为多种无关的组织细胞, 这种跨胚层分化现象被称为横向分化 (transdifferentiation), 而这种横向分化潜能被称为可塑性 (plasticity). 骨髓干细

胞易于采集, 可来源于自身, 其可塑性不但为组织器官损伤的修复提供了新思路, 而且使其成为一种理想的基因治疗的载体细胞, 并有可能成为干细胞工程用来克隆器官的一种新型 ‘种子’ 细胞^[2].

2 骨髓源性肝干细胞 (BDHSC bone marrow-derived hepatocyte stem cells) 的研究用途

由于供体器官来源缺乏, 肝移植治疗肝脏终末期疾病的应用受到限制. 于是, 人们设计出了生物人工肝 (BAL)、肝细胞移植 (HTx) 作为肝移植的辅助或替代疗法, 用来治疗某些肝脏代谢性疾病、促进急性肝功能衰竭 (ALF) 的肝再生、或者在患者得到合适供体肝脏之前提供肝功能支持^[3]. 对于肝细胞移植及生物人工肝, 原代肝细胞是理想供体, 但同样其来源缺乏; 除此之外, 原代肝细胞体外培养或体内移植后的增生及功能保持状况不甚理想. 因此, 肝干细胞甚至是成熟的肝实质细胞可源于骨髓细胞的横向分化, 更加具有重要的临床应用价值, 比如为肝基因治疗提供一种理想的细胞载体; 或在体外生产大量完全分化的肝细胞用来作为 HT 或 BAL 的供体细胞, 以解决供体缺乏. 同时自体来源的肝干细胞还可免除异基因或异种细胞所致的许多不便, 诸如免疫排斥、传染疾病等.

3 肝卵圆细胞 (oval cells)

肝卵圆细胞是最早被证明的一种可能的 BDHSC, 与骨髓中的干细胞有许多相同的特征. 卵圆细胞是一种存在于肝脏实质的专能干细胞, 细胞核大, 呈卵圆形, 胞质少, 定位于移行胆管细胞 (TDCs) 和 / 或终末小胆管形成的 Hering 管. 研究证实卵圆细胞具备自我更新、多项分化潜能等肝干细胞的特征, 长期体外培养过程中, 保持自身特性的同时, 能够分化为成熟的肝细胞或胆管细胞. 卵圆细胞 CK 7, 8 & 18, 19、白蛋白、AFP、Thy-1、SCF/c-kit^[4]、CD34、Flt-3R 等标志表达阳性, 应用这些阳性标志可将其分离纯化. 近期常用的方法有荧光活化细胞分类法^[5]及免疫磁珠分离法等. 成人肝脏中存在的卵圆细胞数目极少, 且处于休眠或静止状态, 目前有关肝卵圆细胞的观察均在肝脏严重受损的情形下, 比如在 70% 以上的肝切除、肝炎病毒感染、肝毒性物质 (CCl₄) 或致癌物质 (2AAF)、倒千里光碱^[6]作用于肝脏等, 只是在自身肝脏大部分成熟的肝实质细胞增生受到抑制的情况下, 卵圆细胞才会被活化且便于观察.

4 体内 BDHSC 的研究

Petersen et al^[7]、Theise et al^[8,9]和 Alison et al^[10]的研究相继指出骨髓干细胞或造血干细胞能够在鼠肝内转化成为肝卵圆细胞甚至成熟的肝细胞和胆管细胞;并证明了在接受过骨髓移植或肝移植的患者体内,这种现象也同样存在.在转化的肝细胞功能发挥的研究方面,纯化的造血干细胞移植重建了 I 型酪氨酸血症模型大鼠肝脏的生化功能,使受体病情得到基本缓解^[11].最近的一项研究指出,受体体内的干细胞可进入移植的肝脏并分化为肝实质细胞,而且这一现象在肝移植后的早期即可发生,虽然数目极少,但这种现象可能持续存在于长期存活的供体肝脏之中^[12].相关资料中体内的 BDHSC 仅发生在病理条件下,比如在接受骨髓移植或肝移植的动物及患者体内,Theise 更发现:在接受检测的骨髓移植和肝移植患者的肝内,约 4-43% 的肝细胞和 4-38% 的胆管细胞来源于骨髓干细胞的横向分化,而这种细胞的转化量似有随肝脏损伤的程度和时间的增加而增加的倾向.

最近的一项研究对骨髓干细胞的可塑性提出了质疑,骨髓细胞和 ES 细胞在体外共同培养过程中发生了细胞融合(cell fusion)的现象,少量融合的骨髓细胞转而表达 ES 细胞的许多特征.这种现象提示如果骨髓干细胞与肝卵圆细胞发生融合为四倍体细胞,进而表达卵圆细胞的某些特征.因此体内是否存在 BDHSC 出现疑问^[13].

5 BDHSC 的体外研究

体外研究证明,用高浓度的 HGF 诱导体外培养的大鼠骨髓细胞,RT-PCR 检测到白蛋白及 AFP 的表达,免疫细胞化学也证实了该经诱导的细胞出现了 AFP、白蛋白及 CK8/18 等肝前体细胞的特征性表达^[14].应用磁珠细胞筛选法分离人或大鼠骨髓细胞中的 $\beta 2m^{-}$ ($\beta 2$ -微球蛋白)/Thy-1⁺ 的细胞,能够表达肝细胞的特征^[15].这些 BDHSC 肝内移植后很快就整合入肝板,并且分化为成熟的肝细胞,而在体外培养的过程中加入胆汁化血清可促进他们向肝细胞方向分化,这种分化机制可能与胆汁化血清存在某些体液信号有关.C1qRp 可以作为从骨髓细胞中选择具有肝细胞分化潜能细胞的阳性标志^[16].

6 BDHSC 研究存在的问题

体外诱导骨髓干细胞的横向分化明确了其可塑性的存在.骨髓干细胞可以生成肝细胞的机制,为阐明肝损伤的修复机制增添了新内容,并为肝病的治疗提供了新的思路,同时其自身又存在许多问题.由于目前相关研究技术的限制,正常生理情况下体内是否存在骨髓干细胞横向分化还没有得到证实;再者,骨髓干细胞横向分化作为一种现象存在,是否具有实际应用价值取决于细胞的转化量^[17],而真正意义上转化是完全功能上的转化(full functional conversion),完全功能上的转化的基础是完全组织结构上的转化,只靠现有的几个细胞的表面标志或基因的表达尚不足以说明骨髓干细胞真正意义上的转化.

骨髓中是否存在可以产生肝细胞的单一细胞亚群?或者是否所有骨髓干细胞在适合的环境中都能转化为肝细胞?一方面,上述研究中仅用一些细胞表面标志从骨髓细胞中筛选具有肝细胞分化潜能的干细胞,有可能忽略了许多这些标志阴性的却具肝细胞分化潜能的骨髓干细胞,而且操作繁琐并有可能影响细胞的和生物学活性,应用肝细胞某些功能进行筛选有可能避免以上不足.另一方面,体外诱导 BDHSC 也仅限于高浓度的 HGF 或胆汁化血清,其他的肝损伤及肝再生状况(包括肝卵圆细胞活化的条件)是否可行、以及这种横向分化的基因调控和信号传导有待于更加深入的研究.

7 参考文献

- 1 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147
- 2 杨明智,陈积圣.一种肝细胞移植的新来源-骨髓干细胞可塑性的应用研究. *国外医学外科学分册* 2002;29:200
- 3 Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver-state of the art. *Science* 2002;295:1005-1009
- 4 Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* 1999;30:112-117
- 5 Taniguchi H, Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K, Nakauchi H. Usefulness of flow-cytometric cell sorting for enrichment of hepatic stem and progenitor cells in the liver. *Transplant Proc* 2000;32:249-251
- 6 Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000;156:607-619
- 7 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- 8 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240
- 9 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16
- 10 Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257
- 11 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med* 2000;6:1229-1234
- 12 Fogt F, Beyser KH, Poremba C, Zimmerman RL, Khettry U, Ruschoff J. Recipient-derived hepatocytes in liver transplants: a rare event in sex-mismatched transplants. *Hepatology* 2002;36:173-176
- 13 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:500-504
- 14 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542-547
- 15 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164
- 16 Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10441-10445
- 17 Li J, Ning G, Duncan SA. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α . *Genes Dev* 2000;14:464-474

ERK信号传导通路与肝星状细胞周期调控

蒋明德, 马洪德, 解方为

蒋明德, 马洪德, 解方为, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科
四川省成都市天回镇 610083
项目负责人: 蒋明德, 610083, 四川省成都市天回镇, 中国人民解放军成都军区
总医院消化内科. jiang.md@china.com
电话: 028-86570346
收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2002-10-22

摘要

慢性肝病的重要病理基础是肝纤维化, 慢性肝病通过纤维化的发展走向肝硬化. 现公认肝星状细胞(HSC)的活化与增生是肝纤维化进展的中心环节, HSC的增生有赖于一系列细胞内信息分子的调控, 近年研究证实了ERK信号传导通路通过调控细胞周期相关周期蛋白的表达而调控细胞增生. 因此本文对ERK信号传导通路调控HSC周期的研究概况作一扼要综述.

蒋明德, 马洪德, 解方为. ERK信号传导通路与肝星状细胞周期调控. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1037-1039
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1037.asp>

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化转归的中转站^[1-5], 其发生机制较复杂, 近年来取得了一系列进展, 目前认为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^[6-10], 细胞外信号激活肝星状细胞(HSC), 促进以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)各成分合成增多, 降解减少或代偿不足, 从而使ECM在肝脏内异常沉积引起肝纤维化^[11-21]. 因此HSC的信号传导通路一直是近年来肝纤维化发病机制的研究热点.

1 HSC活化的细胞内信号传导通路

参与HSC活化过程的因素主要有ECM成分、生长因子、细胞因子、炎症因子、氧化应激等^[22-26], 他们与相应HSC膜受体结合后, 激活细胞内信号传递结构和分子, 最终导致基因表达的变化, 这是多条细胞信号传导通路等一系列细胞信息分子控制的结果^[27-29]. 这些信号分子之间存在交互作用(cross talk)而非独立, 构成了复杂的信号网络系统. 涉及的信号分子至少包括: 三磷酸肌醇激酶(PI3-k)、钙通道、信号转导及转录活化蛋白(STATs)、丝裂原激活蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase, MAPK)、c-AMP、NF- κ B、磷酸酶C- γ 1(PLC- γ 1)、钠-氢(Na⁺/H⁺)交换、粘着斑激酶等^[30,31].

2 ERK信号传导通路

MAPK是最近人们发现的一类特殊细胞信号传导蛋白, 经上游激酶作用后发生苏氨酸、丝氨酸双位点磷酸化而激活^[32,33], 是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者^[34,35]. 细胞外信号调节的激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是MAPK的重要成员. ERK信号传导途径是脊椎动物中克隆的第一个MAPK途径^[36], 也是目前研究最为彻底的MAPK通路^[37]. 此通路的核心是由三种蛋白激酶(MAPKKK, MAPKK, MAPK)构成的蛋白激酶反应链, 不同生长因子受体的信号通过ras/ERK这一共同通路, 汇集至c-fos和其他辅助调节基因启动子的主要调节元件-血清反应元件, 调控细胞生长、发育和细胞间的功能同步等多种生理及病理过程^[38-41]. 受体酪氨酸激酶、Ca²⁺、蛋白激酶C均可激活ERK通路^[42-45], ERK一旦被激活, 可以磷酸化一系列的胞质蛋白, 包括S6激酶p90rsk、细胞磷脂酶A2及EGF受体的近膜区域; 或者激活后移位到细胞核, 磷酸化许多转录因子, 包括Elk-1、SAP-1a、c-myc和信号转导与激活剂(STAT)等. 激活的转录因子随种类、数量及锚着位点的不同会导致不同的基因表达, 启动细胞增生.

3 细胞周期的分子调控

细胞增生是通过细胞周期的运转来实现的, 细胞周期包括G1、S、G2、M四期, 近年来对细胞周期的研究表明: 细胞周期调控是在各期的控制点上进行的, 细胞周期中存在两个重要的调控点: G1/S和G2/M期调控点, 只要G1期内的正调节因子累积达到一定程度, 周期越过G1/S交界点, 以后细胞就不再依赖于细胞外促生长因子而顺序完成整个细胞周期, 因而G1/S调控点是影响细胞周期的关键, G2/M期调控点在染色体分开和细胞分裂前保证染色体均分的精确性. 目前发现的细胞周期调控因子可分为三类: 细胞周期蛋白(Cyclins)和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制物(CKI)^[46-50]. CDK是细胞周期调控的中心环节, Cyclins是CDK的正调节因子, 能激活CDK活性; CKI是CDK的负调节因子^[51]. 通过G1/S期需要CDK2、CDK4、CDK6激活, CDK4和CDK6与CyclinD(D1, D2, D3)结合后激活, CDK2与CyclinE结合后激活. CKI可分为两类: 一是INK家族, 包括p16INK4a、p15INK4b、p18、p19, 能特异性抑制CyclinD/CDK2和CyclinD/CDK4复合物; 另一类是Cip/Kip家族, 能广泛抑制Cyclin/

CDK复合物的活性,包括p21WAF/CIP1, p27KIP1, p57KIP2等^[52].研究表明:CDK4和CDK6与CyclinD1在G1早期升高,并控制G1晚期CDK2与CyclinE的合成^[53-55],G1期CDK的次序活化使Rb蛋白磷酸化^[56-58],释放核转录因子E2F,失去抑制E2F的启动DNA合成作用,促进细胞由G1向S期转化.

4 ERK信号传导通路与HSC周期调控

围绕肿瘤等细胞领域的研究已表明:ERK信号通路是多数生长因子、细胞因子、调控靶细胞增生重要途径^[59].CyclinD1的转录依赖于ERK的持续激活和核内的滞留^[60,61],Hoshino et al^[62]用Erk阻断剂,抑制人类RPMI-SE和HT-1080肿瘤细胞ERK信号传导通路,可诱导其停止在G1期.近期资料证实ERK阻断剂U-0126可阻断胶质母细胞瘤细胞的增生与ERK活化,并抑制CyclinD1表达^[63];Kortylewski et al^[64]观察到使用另一ERK阻断剂P98059阻断人类A375和WM239黑色素瘤细胞的ERK通路后,P27表达增加,CDK2表达减少,细胞停滞在G1期,提示ERK通路参与细胞周期的调节.

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,ERK信号传导通路是否调控HSC的增生?近来资料表明血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等细胞生长因子可激活ERK信号传导途径,刺激c-fos的表达,促进HSC增生,但这种作用可被PD98059所抑制^[65-67];己酮可可碱(Pentoxifylline)是一种磷酸二酯酶抑制剂,其抑制HSC增生作用也被证实与抑制ERK活性相关^[68,69];多稀磷脂酰胆碱可阻断PDGF激活通路中ERK活化及与AP-1结合,抑制PDGF增生效应;特异性PDGF受体阻断剂AG1295能使PLC、ERK活性下降并显著抑制HSC增生^[70].证实ERK信号传导通路在调控HSC增生中起重要作用.ERK对HSC增生调控本质上是通过影响细胞周期的运行来实现的,王宝恩^[71]观察到中药复方861可抑制PDGF诱导的肝星状细胞增生,同时861对PDGF诱发的CyclinD水平、CDK4及Erk活性亦有抑制作用.最近, Kim et al^[6]报道N-乙酰-L-半胱氨酸持续活化ERK通路,导致周期素依赖性蛋白激酶抑制p21(Cip1/WAF1)表达增加,生成Sp1使HSC周期运行停滞于G1期,我们初步应用P98059及中药提取物-红景天甙阻断HSC内ERK活性后发现G1→S期转化明显抑制,CyclinD1,CyclinE表达减少,表明了ERK在HSC细胞周期运行中的意义.

细胞周期调控的机制相当复杂,目前对ERK调控HSC周期的研究刚刚起步,其确切机制,如对G2/M期及其他周期蛋白调控尚不清楚,深入研究ERK对HSC周期调节因子的影响,将有助于进一步了解ERK调控HSC增生的分子机制,并为抗肝纤维化治疗提供新的思路.

总之,近10a来,越来越多的证据表明肝纤维化

可逆转,但迄今尚缺乏确切有效的治疗手段.通过抑制信号传导通路如ERK通路,观察对HSC周期的调控作用及对HSC增生的影响,从而开辟一条治疗肝纤维化的新路,这为肝纤维化的逆转,和对肝硬化的预防有重大意义.

5 参考文献

- 1 周馨,李宣海,李定国.库普弗细胞与肝纤维化.世界华人消化杂志 2002;10:65-68
- 2 Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7:115-119
- 3 李丹,王小众.肝纤维化与TNF- α , L-6及IL-10.世界华人消化杂志 2001;9:808-810
- 4 李兵顺,王继,甄彦君,王鑫国,孙彦辉,王淑琴,吴中秋.中药抑肝纤和促肝细胞生长素对大鼠免疫性肝纤维化的阻断作用.世界华人消化杂志 1998;6:786-788
- 5 刘芳,刘金星.转化生长因子 β 1在肝纤维化中的作用.世界华人消化杂志 2000;8:86-88
- 6 Kim KY, Rhim TY, Choi IC, Kim SS. N-Acetylcysteine induces cell cycle arrest in hepatic stellate cells through its reducing activity. *J Biol Chem* 2001;276:40591-40598
- 7 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-2250
- 8 Burt AD. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* 1993;170:105-114
- 9 Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995;22:28-36
- 10 Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. Endothelin 1 is over expressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996;110:534-548
- 11 Trotter JF, Brenner DA. Current and prospective therapies for hepatic fibrosis. *Comprther* 1995;21:3039-3073
- 12 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
- 13 Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYP2E1-Mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:987-996
- 14 高毅,王宇,杨继震,黄宇琦.实验性肝纤维化过程中明胶酶A基因表达的动态变化.世界华人消化杂志 1999;7:1003-1004
- 15 李兵顺,王继,甄彦君,刘金星,魏梅新,孙树强,王淑琴.血清纤维化指标与肝组织病理和肝组织纤维定量关系的实验研究.世界华人消化杂志 1999;7:1031-1034
- 16 王宇,高毅,俞金龙,黄宇琦,蒋晓青. IFN- α 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 2001;9:20-23
- 17 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
- 18 吕晓辉,谢艳华,傅宝玉,刘春荣,王炳元,傅宝玉.基质金属蛋白酶抑制剂-1在实验性酒精性肝病中的动态表达.世界华人消化杂志 2001;9:29-33
- 19 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TIMPsmRNA.世界华人消化杂志 2001;9:251-254
- 20 赵东强,张晓岚,姜慧卿. TNF- α 与肝星状细胞.世界华人消化杂志 2001;9:947-948
- 21 刘文滨,王吉耀. NF- κ B与肝星状细胞凋亡.世界华人消化杂志 2001;9:1054-1055
- 22 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46:443-446
- 23 Gressner A. The cell biology of liver fibrogenesis-an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998;292:447-452
- 24 Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998;18:2-13
- 25 陈平圣,翟为溶,张月娥,张锦生.缺氧对肝星状细胞产生胶原及胶原降解酶影响.世界华人消化杂志 2000;8:586-587

- 26 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
- 27 Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario Benedetti A, Saccomanno S, Bendia 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
- 28 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001;34:89-100
- 29 Alcolado R, Arthur MJ, Iredate JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci* 1997;92:103-112
- 30 甘新宇, 蒋明德. PDGF与HSC中信号传导关系的研究进展. 西南国防医药 2000;10:246
- 31 Robino G, Parola M, Marra F, Caligiuri A, De Franco RM, Zamara E, Bellomo G, Gentilini P, Pinzani M, Dianzani MU. Interaction between 4-hydroxy-2, 3-alkenals and the platelet-derived growth factor-beta receptor. Reduced tyrosine phosphorylation and downstream signaling in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2000;275:40561-40567
- 32 Shimohashi N, Nakamuta M, Uchimura K, Sugimoto R, Iwamoto H, Enjoji M, Nawata H. Selenoorganic compound, ebselen, inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by the modulation of jun-N-terminal kinase and the NF-kappaB signaling pathway in rat Kupffer cells. *J Cell Biochem* 2000;78:595-606
- 33 Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *TIBS* 1995;20:117-122
- 34 Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995;9:726
- 35 Shapiro PS, Ahn NG. Feedback regulation of raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinases 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). *J Bio Chem* 1998;273:1788-1793
- 36 Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993;268:14553-14556
- 37 Page G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J. Defective thymocyte maturation in P44 MAP kinase (Erk1) knock out mice. *Science* 1999;286:1374-1377
- 38 New L, Jiang Y, Zhao M, Liu K, Zhu W, Flood LJ, Kato Y, Parry GC, Han J. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J* 1998;17:3372-3384
- 39 刘景生. 细胞信息与调控. 第1版. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998:272
- 40 Tanoue T, Moriguchi T, Nishida E. Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *J Biol Chem* 1999;274:19949-19956
- 41 Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis-mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835
- 42 Aronheim A, Engelberg D, Li N, al-Alawi N, Schlessinger J, Karin M. Membrane targeting of the nucleotide exchange factor sos is sufficient for activating the ras signaling pathway. *Cell* 1994;78:949-961
- 43 Rosen LB, Greenberg ME. Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1113-1118
- 44 Farnsworth CL, Freshney NW, Rosen LB, Ghosh A, Greenberg ME, Feig LA. Calcium activation of ras mediated by neuronal exchange factor ras-GRF. *Nature* 1995;376:525-527
- 45 Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P, Sanz L, Mosaic J. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J* 1995;14:6157-6163
- 46 韦伟, 龚建平, 裘法祖. 细胞周期调控与肿瘤的发生发展. 癌症 1999;18:95-97
- 47 卢斌, 戴益民. 肝癌发生中细胞周期调控的异常. 世界华人消化杂志 2001;9:205-207
- 48 Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 1995;11:136-140
- 49 Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131-134
- 50 Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828
- 51 赵炬才, 张广泉. 细胞周期调控与骨肉瘤. 中华骨科杂志 2000;20:44-47
- 52 帅晓明, 王国斌. G1/S期调控元件异常与胃癌研究进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2001;21:261
- 53 Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12146-12150
- 54 Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA. Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 1996;12:1173-1180
- 55 Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Durr P. Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol* 1996;16:3401-3409
- 56 Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 1998;18:753-761
- 57 Hatakeyama M, Brill JA, Fink GR, Weinberg RA. Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 1994;8:1759-1771
- 58 Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10699-10704
- 59 Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:82-89
- 60 Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996;271:20608-20616
- 61 Ravenhall C, Guida E, Harris T, Koutsoubos V, Stewart A. The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNAsynthesis in human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2000;131:17-28
- 62 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 cycle in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27(kip1). *Biol Chem* 2001;276:2686-2692
- 63 Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Biol Chem* 1998;273:18623-18632
- 64 Kortylewski M, Heinrich PC, Kauffmann ME, Bohm M, MacKiewicz A, Behrmann I. Mitogen-activated protein kinases control P27 kip1 expression and growth of human melanoma cells. *J Biochem* 2001;357(Pt 1):297-303
- 65 Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. Effects of platelet derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 1989;84:1786-1793
- 66 Pinzani M, Marra F, Caligiuri A, DeFranco R, Gentilini A, Failli P, Gentilini P. Inhibition by pentoxifylline of extracellular signal-regulated kinase activation by platelet-derived growth factor in hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:1117-1124
- 67 Reimann T, Hempel U, Krautwald S, Axmann A, Scheibe R, Eidel D, Wenzel KW. Transforming growth factor-beta1 induces activation of Ras, raf-1 MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells. *FERSlett* 1997;403:57-60
- 68 Lee KS, Cottam HB, Houglum K, Wasson DB, Carson D, Chojkier M. Pentoxifylline blocks hepatic stellate cell activation independently of phosphodiesterase inhibitory activity. *J Physiol* 1997;273:1094-1100
- 69 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
- 70 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
- 71 王宝恩. 肝星状细胞与肝纤维化. 中华肝脏病杂志 2000;8:197-199

趋化因子与肝病的研究进展

胡迎宾, 田德安, 刘南植

胡迎宾, 田德安, 刘南植, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 田德安, 430030, 湖北省武汉市航空路 13 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. tiandeanwh@sina.com
电话: 027-83643609 传真: 027-83643609
收稿日期: 2002-11-12 接受日期: 2002-11-29

摘要

近年来, 趋化因子(Chemokines)在肝病发病机制中的作用越来越受到重视. 大量研究表明, 趋化因子在各种肝损伤中表达上调. 通过应用趋化因子抑制剂, 特异性趋化因子缺陷动物模型以及调控趋化因子受体等方法, 趋化因子与炎症细胞浸润的密切关系得以证实. 而在肝脏慢性炎症中, 炎症因子、生长因子、氧应激及其产物等刺激因素促进趋化因子的表达. 高表达的趋化因子能激活肝星状细胞(HSC)参与肝纤维化甚至肝硬化的形成. 由于趋化因子有促进血管生成和生物增生的作用, 其与肿瘤的关系也成为研究的热点. 本文将阐述趋化因子在酒精性肝病, 肝纤维化, 肝硬化和肝癌中的作用机制.

胡迎宾, 田德安, 刘南植. 趋化因子与肝病的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1040-1042
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1040.asp>

0 引言

趋化因子是一系列结构相似、分子量约为 8-10 kD、

具有趋化功能的细胞因子. 研究表明趋化因子参与肝脏炎症发生、血管生成、免疫反应、新生物增生、纤维化形成, 甚至与肝硬化有关. 本文就趋化因子与酒精性肝病, 肝纤维化, 肝硬化和肝癌的关系作一综述.

1 趋化因子及其受体

目前已知的趋化因子有 40 种, 他们可分为 4 个亚族: CXC 趋化因子又称为 α 趋化因子, 其氨基酸序列中 4 个保守半胱氨酸(Cys)的前两个之间有一个其他氨基酸相隔; CC 趋化因子又称为 β 趋化因子, 前两个 Cys 之间没有氨基酸相隔; C 趋化因子又称为 γ 趋化因子, 没有第一个和第三个 Cys; CX3C 趋化因子的前两个 Cys 之间有 3 个氨基酸相隔, 也称为 fractalkine. 其中 CXC 趋化因子根据其结构又可分为 2 组: ELR 组的第一个 Cys 前是谷氨酸-亮氨酸-精氨酸(Glu-Leu-Arg, ELR), 主要诱导中性粒细胞趋化; 非 ELR 组主要诱导淋巴细胞趋化. 一些其他细胞因子也具有趋化活性, 能诱导不同的细胞趋化, 但其主要作用不是诱导细胞趋化. 趋化因子受体含有 7 个富含疏水氨基酸的 α 螺旋穿膜结构, 经异源三聚体 G 蛋白传递信号, 属视紫红质样 G 蛋白耦联受体超家族成员. 根据受体结合的趋化因子种类不同将受体称为 CXCR(结合于 CXC 上)、CCR(结合于 CC 上)、XCR(结合于 C 上)及 CX3CR(结合于 CX3C 上)(见表 1).

表 1 趋化因子亚族及受体

亚族		受体
CXC(α 亚族)		
GRO	growth related gene, 生长相关基因	CXCR2
ENA-78	μ -78 residue epithelial cell-derived neutrophil-activator, 上皮细胞来源的 78 氨基酸中性粒细胞活化剂	CXCR1, CXCR2
IL-8	interleukin-8, 白介素-8	CXCR1, CXCR2
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant, 细胞因子诱导的中性粒细胞趋化物	CXCR1, CXCR2
IP-10	interferon-inducible protein-10, γ -干扰素诱导蛋白-10	CXCR3
MIG	monokine inducible by γ -interferon, γ -干扰素诱导的单核因子	CXCR3
SDF-1 α	stromal cell-derived factor 1 α , 基质细胞来源的因子-1 α	CXCR4
CC(β 亚族)		
MIP	macrophage inflammatory protein, 巨噬细胞炎症蛋白	CCR1, CCR5
MCP	monocyte chemoattractant protein, 单核细胞趋化蛋白	CCR1, CCR2 CCR3, CCR5
C(γ 亚族)		
Lymphotacin, 淋巴细胞趋化素		XCR1
CX3C		
Fractalkine, 神经趋化素		CX3CR1

本表仅涉及文中出现的趋化因子及受体.

2 趋化因子与酒精性肝病

酒精性肝炎以肝脏广泛的炎症细胞浸润为特征, 并可进一步发展为酒精性肝纤维化及肝硬化. 一般认为, 以中性粒细胞为主的炎症细胞在弹性蛋白酶和其他因素的作用下造成肝损伤, 因此许多研究集中在对中性粒细胞有趋化作用的ELR组CXC趋化因子上, 尤其是白介素-8(Interleukin-8, IL-8)的作用. Sheron et al^[1]比较不同程度的酒精性肝病(ALD)和非酒精性肝损伤患者血清及血浆趋化因子水平. 他们发现酒精性肝炎患者IL-8水平增高, 并且预后差, 其肝组织匀浆中IL-8的浓度是其他ALD患者的10倍. 另外一项研究也有相同报道, 并认为IL-8水平增高具有可逆性, 在酒精性肝炎恢复期下降^[2]. 酒精性肝炎患者血清IL-8的水平与粒细胞浸润的严重程度相关. 根据对酒精性肝炎患者长期随访的结果发现, 高水平IL-8的患者往往在2 a内死亡^[3].

用免疫标记的方法测定酒精性肝炎患者肝组织中IL-8水平, 发现呈弥漫性增高^[1], 这可能是肝细胞产生IL-8增加所致. 在培养的肝细胞中加入乙醇后产生许多趋化性物质, 其中一种物质的活性能被IL-8抗体所检测^[4]. 另外, 被细胞因子或脂多糖激活的大鼠肝细胞和Kupffer细胞可产生细胞因子诱导的中性粒细胞趋化物(cytokine-induced neutrophil chemoattractant, CINC), 这是IL-8的一种同系物. 但乙醇并不能直接刺激细胞产生趋化因子, 只有在一定条件下, 乙醇才能介导肝细胞和Kupffer细胞的活化而产生趋化物质. 而氧应激和脂质过氧化产物也许能够直接激活IL-8系统. Nanji et al^[5]发现在用乙醇和不饱和脂肪酸喂养的大鼠中脂质过氧化产物增加, NF- κ B被激活, CC和CXC趋化因子表达上调. 另外一些证据表明, 氧应激和脂质过氧化产物能介导单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达上调, 并证明丙二醛-乙醛蛋白加合物(adduction of soluble proteins with malondialdehyde-acetaldehyde, MAA)刺激Kupffer细胞分泌MCP-1. 这些加合物在ALD动物模型和患者中均存在, 他们可能参与ALD的发病机制^[6].

在不同程度的ALD中趋化因子的产生部位也不相同^[7]. 在酒精性肝炎中以肝细胞表达趋化因子mRNA为主, 而在酒精性肝硬化中则以肝非实质细胞表达为主. 这个结果与所观察到的炎症细胞浸润在酒精性肝炎时主要发生在肝实质, 而在酒精性肝硬化时主要发生在肝间质相一致.

CXC趋化因子, 特别是IL-8介导粒细胞趋化和参与组织损伤最直接的证据是, 通过腺病毒转染的肝细胞过度表达CINC与炎症细胞浸润程度及肝谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)增加密切相关^[8]. 但IL-8并不是ALD中发挥作用的唯一趋化因子, 据报道ALD患者血清生长相关基因- α (GRO- α)水平增高与粒细胞浸润有关^[9]. 而在酒精性肝炎患者中则发现单核细胞可产生大量CC趋化因子, 如MCP-1和MIP-1, 他们都能介导单核细胞及淋巴细胞的趋化^[10]. 最近有报道乙醇

喂养的大鼠血浆和肝组织中巨噬细胞炎症蛋白(MIP-2)和CINC表达下调, 并伴有继发性内毒素中毒^[11]. 这项研究表明, 乙醇过量摄入所导致的趋化因子反应低下也许是ALD患者易于感染的原因之一.

3 趋化因子与肝纤维化、肝硬化

肝纤维化是多种肝病共同的病理过程, 是机体抗损伤的一种反应. 若肝纤维化得不到控制, 最终发展为肝硬化. 研究证明肝星状细胞(HSC)是肝纤维化发生的关键细胞. HSC细胞增生、 α -平滑肌动蛋白(α -SMA)表达、脂滴消失和其他细胞外基质的形成是活动型HSC的表型, HSC由“静止型”转化为“活动型”后直接参与了胶原的合成、降解和细胞外基质的沉积等. 但静止型和活化型HSC均能被诱导产生趋化因子. TNF能够激活静止型HSC产生MCP-1, 而活化型HSC则能被氧应激和脂质过氧化产物所诱导^[12]. 整合素和TGF- β 在HSC表达MCP-1的过程中也可能起一定作用^[13]. 活化型HSC分泌TGF- β , 后者通过自分泌作用于HSC而产生MCP-1和大量细胞基质. 整合素与细胞基质中的相应整合素配体结合, 进一步诱导趋化因子的产生. Czaja et al^[14]用CCL₄慢性刺激大鼠肝细胞, 证明MCP-1主要在HSC中表达. 在人类慢性肝病中, 用免疫组化技术和原位杂交技术也可检测到HSC表达MCP-1^[15]. 因此MCP-1在肝纤维化的发生中可能起到一定作用.

另外一些研究则集中在HSC所产生的MIP-1和CINC的作用上. Sprenger et al^[16]首次报道HSC产生介导中性粒细胞的趋化物. 用抗MIP-2特异性抗体能够减少这种趋化物的产生, 而用特异性ELISA可检测到HSC上清液中的MIP-2, 并且MIP-2的表达依赖HSC的活化. Maher et al^[17]则在摄入CCL₄和胆管结扎术的大鼠肝硬化模型中发现HSC表达CINC增加. 其机制可能是细胞因子如IL-1和TNF- α 激活了NF- κ B而使HSC活化, 活化型HSC产生趋化因子MIP-1和CINC等, 并促进肝纤维化的形成.

最近有研究表明, 无论HSC是否活化, 过氧化物酶体增生物激活受体- γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR- γ)拮抗剂可阻断信号传递通路而显著下调MCP-1的表达^[18]. 花生四烯酸代谢产物中的炎症介递诱导HSC表达MCP-1, 应用环氧合酶抑制剂能下调由IL-1或TNF- α 所诱导的HSC中MCP-1的表达. 通过细胞转染高表达CD40配体的HSC能产生MCP-1和IL-8, 这表明免疫系统也可能参与肝纤维化的形成^[19].

一些证据还表明趋化因子直接参与HSC的生物学功能. Bonacchi et al^[20]认为活化后的人HSC能表达CXC趋化因子, CXC趋化因子与其相应受体结合介导人HSC的迁移, 并激活Ras/ERK和PI3-K/Akt细胞间信号通路. 初步资料表明这些信号通路能抑制HSC的凋亡, 在肝损伤后参与肝纤维化的形成. 总之, 趋化因子通过介导HSC的多种作用参与肝组织的损伤修复, 这

可能是肝慢性炎症和纤维化形成的关键因素。

4 趋化因子与肝癌

近年来趋化因子与肿瘤的关系一直是研究的热点。肿瘤细胞产生的趋化因子能够介导巨噬细胞和淋巴细胞趋化到肿瘤部位参与特异性宿主抗肿瘤免疫反应。Yoong et al 分析了肝细胞癌标本中 CXC 和 CC 趋化因子的表达, 并免疫标记了 γ 干扰素诱生的单核因子(monokine inducible by γ -interferon, Mig), IL-8, MIP-1 α 和 MIP-1 β 。这些趋化因子的产生与浸润在肿瘤部位的淋巴细胞高表达 CXCR3 和 CCR5 密切相关, 而当应用抗 CXCR3 或 CCR5 抗体则能够减轻这种浸润。

趋化因子还参与肿瘤血管生成、转移、肝细胞再生等生物学功能的调节。在肝细胞癌中, 许多趋化因子, 如 ELR 组 CXC 趋化因子可以促进肿瘤血管生成, 而非 ELR 组 CXC 趋化因子, 特别是 γ 干扰素诱生蛋白-10 (IP-10) 和 Mig 则有拮抗血管生成的作用。有研究报道基质细胞来源的因子-1 α (stromal cell-derived factor 1 α , SDF-1 α) 与 CXCR4 的相互作用与乳腺癌转移到淋巴结、肺、肝和骨髓有关, 这表明某些趋化因子可能促进恶性肿瘤的转移。另外一些研究认为趋化因子能够调控肝细胞的再生过程, 并可能与促进肿瘤细胞的增生有关。IL-8 能刺激分离的肝细胞和肝癌细胞产生急性期蛋白(AP), 他与 AP 呈剂量依赖性关系。更为重要的证据是, CXC 趋化因子 IL-8, 上皮细胞来源的中性粒细胞趋化物 78(ENA-78) 和 MIP-2 可以促进分离的大鼠肝细胞增生, 而且在大鼠 2/3 肝切除术后这些趋化因子表达上调。有人在摄入醋氨沙洛的急性肝损伤模型中发现, 即使 10 h 后给中毒小鼠注射 IL-8、ENA-78 或 MIP-2 也能减轻肝损伤, 因此趋化因子可能参与肝细胞的再生过程。

肝内皮细胞和胆管上皮细胞在胚胎期表达 SDF-1 α , 后者有介导出生前 B 淋巴细胞趋化的作用。有研究报道在肝癌中癌组织 SDF-1 α 的表达比癌旁正常组织少, 癌细胞能够阻止 SDF-1 α 和 CXCR4 结合所介导的信号传递, 但确切机制尚不清楚。

总之, 虽然趋化因子介导炎症细胞趋化的作用已经明确, 但仍有许多问题尚未阐明。在肝病中各种趋化因子之间是如何相互调控的, 趋化因子与免疫反应的关系, 以及他们在肝纤维化和肝硬化中的具体机制都有待更深入的研究。趋化因子抑制剂可能成为治疗某些肝病的一种新方法。因此, 对趋化因子与肝病的研究必将有助于进一步掌握肝病的发病机制、发生发展过程以及治疗等。

5 参考文献

- 1 Sheron N, Bird G, Koskinas J, Portmann B, Ceska M, Lindley I, Williams R. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology* 1993;18:41-46
- 2 Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology*

- 1993;18:576-580
- 3 Huang YS, Chan CY, Wu JC, Pai CH, Chao Y, Lee SD. Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepatol* 1996;24:377-384
- 4 Shiratori Y, Takada H, Hikiba Y, Nakata R, Okano K, Komatsu Y, Niwa Y, Matsumura M, Shiina S, Omata M, Kamii K. Production of chemotactic factor, interleukin-8, from hepatocytes exposed to ethanol. *Hepatology* 1993;18:1477-1482
- 5 Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999; 30:934-943
- 6 Kharbanda KK, Todero SL, Shubert KA, Sorrell MF, Tuma DJ. Malondialdehyde-acetaldehyde protein adducts increase secretion of chemokines by rat hepatic stellate cells. *Alcohol* 2001; 25:123-128
- 7 Afford SC, Fisher NC, Neil DA, Fear J, Brun P, Hubscher SG, Adams DH. Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 1998;186:82-89
- 8 Maher JJ, Scott MK, Saito JM, Burton MC. Adenovirus-mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induces a neutrophilic hepatitis. *Hepatology* 1997; 25:624-630
- 9 Maltby J, Wright S, Bird G, Sheron N. Chemokine levels in human liver homogenates: associations between GRO alpha and histopathological evidence of alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1996;24:1156-1160
- 10 Fisher NC, Neil DA, Williams A, Adams DH. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1 alpha in alcoholic liver disease. *Gut* 1999;45:416-420
- 11 Zhang P, Bagby GJ, Boe DM, Zhong Q, Schwarzenberger P, Kolls JK, Summer WR, Nelson S. Acute alcohol intoxication suppresses the CXC chemokine response during endotoxemia. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:65-73
- 12 Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, Lahme B, Gemsa D, Gressner AM. Differential expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999;30:88-94
- 13 Marra F, Pastacaldi S, Romanelli RG, Pinzani M, Ticali P, Carloni V, Laffi G, Gentilini P. Integrin-mediated stimulation of monocyte chemotactic protein-1 expression. *FEBS Lett* 1997; 414:221-225
- 14 Czaja MJ, Geerts A, Xu J, Schmiedeberg P, Ju Y. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease. *J Leukoc Biol* 1994;55:120-126
- 15 Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P. Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1988;152:423-430
- 16 Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, Lahme B, Gemsa D, Gressner AM. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 113:277-285
- 17 Maher JJ, Lozier JS, Scott MK. Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and in vivo. *Am J Physiol* 1998;275:G847-G853
- 18 Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119: 466-478
- 19 Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001;166:6812-6819
- 20 Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3. Activation of Ras/ERK, Src and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 2001; 276:9945-9954

游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎

高志强, 陆付耳

高志强, 陆付耳, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 陆付耳, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 同济医院中西医结合研究所. hbgzq@yahoo.com.cn
电话: 027-83662577 传真: 027-83646605
收稿日期: 2002-11-12 接受日期: 2002-11-28

摘要

非酒精性脂肪性肝炎的患病率日益升高, 其对公众健康的危害受到普遍关注; 胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎密切相关, 并且是其重要的病理生理学环节之一, 而升高的血浆游离脂肪酸被认为在二者发病过程中具有重要作用. 游离脂肪酸升高通过组织过氧化物酶体增生物活化受体 α 、细胞色素 P450、肿瘤坏死因子 α 、瘦素和肝细胞解耦联蛋白 2 等介导肝细胞的损伤作用, 同时这些酶类和细胞因子又促使血浆游离脂肪酸更为升高, 从而引起细胞线粒体结构和功能异常、氧应激、乃至胰岛 β 细胞和肝细胞凋亡, 加重胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎的程度. 胰岛素抵抗使内脏脂肪组织脂解速率明显增加, 导致动员至门静脉的游离脂肪酸选择性增加, 后者对肝组织具损伤作用, 从而使脂肪肝和胰岛素抵抗之间形成恶性循环.

高志强, 陆付耳. 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1043-1045

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1043.asp>

0 引言

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 参与脂肪肝的发生和发展, 是非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 的重要致病因素^[1]; 同时各种原因所致脂肪肝可促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素, 并且脂肪堆积的肝细胞对胰岛素产生抵抗^[2,3], 从而形成 IR 与脂肪肝之间的恶性循环; 他们之间可能存在一些共同机制或通道, 把二者紧密联系在一起. 大量资料表明, 游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 在 IR 和脂肪肝发病中均具有重要的地位^[4-9], 本文主要从分子、细胞、组织水平对 FFA 在胰岛素抵抗导致非酒精性脂肪性肝炎中的作用进行综述.

1 FFA 与相关酶类及细胞因子

FFA 可以与许多酶类及细胞因子相互作用, 在胰岛素抵抗的发病过程中越来越受到重视.

1.1 PPAR 和 CYP2E1 过氧化物酶体增生物活化受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 的改变与脂肪酸的 β 氧化障碍有密切的关系, 在 NASH 的

发病机制中起重要的作用; 同时 PPAR α 的活化及其诱导的有关代谢途径及活性氧的产生诱发 NASH. PPAR γ 是维持脂肪细胞成熟所必需的, 在促脂肪细胞表型时也增加其对 FFA 氧化、减少 TNF- α 和脂蛋白脂酶的表达, 使 FFA、释放减少, 通过激活 PPAR γ 能增加脂肪酸的肌肉组织流出量和脂肪组织流入量而增加胰岛素敏感性^[10]. Weltman et al^[11] 发现 31 例经病理证实为 NASH 的患者, 细胞色素 P450 (CYP2E1) 的前体 CYP3A 下降, 而所有患者 CYP2E1 均显著升高, 并可被胰岛素所抑制, 其与 NASH 的易患因素不相关, 且脂肪酸是 CYP2E1 的底物和诱导剂; CYP2E1 活性增加促使氧应激, 直接导致肝细胞损伤或参与中性粒细胞和其他炎症细胞的聚集; 且 CYP2E1 能产生氧自由基, 加强脂质过氧化, 引起肝脏损伤和纤维化^[12,13].

1.2 TNF- α Leptin 及 UCP2 脂肪肝患者血浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、瘦素 (Leptin) 等均增高, 且 TNF- α 、Leptin 又能引起 FFA 增高^[14,15], 具体机制尚不清楚. TNF- α 可直接造成肝损伤及引起胰岛素抵抗^[8,16], Leptin 可加速 NASH 的恶化, 在老龄哺乳动物, 瘦素抵抗及血浆瘦素升高常与 IR 并存^[10,17,18]. FFA 具有轻度的氧化磷酸化解耦联作用, 可使线粒体能量储备降低, 且有上调肝细胞解耦联蛋白 2 (uncoupling protein 2, UCP2) 表达的作用; UCP2 及其同类物可使线粒体氧化磷酸化解耦联导致线粒体合成 ATP 的效率降低, 引起组织坏死和纤维化. NASH 患者的肝细胞中 UCP2 表达增多, 亦可能是由于氧化应激增强使核转录因子 - κ B (nuclear transcription factor κ B, NF- κ B) 激活的结果^[19].

2 FFA 与线粒体及氧应激

2.1 IR 和 NASH 的线粒体异常 线粒体基因异常在胰岛素抵抗的进展中具一定作用^[20], 线粒体基因突变或功能异常, 可引起胰岛素对葡萄糖利用的调节障碍^[12]; Sanyal et al^[13] 认为脂肪肝和 NASH 存在外周胰岛素抵抗, 脂肪酸 β 氧化增加, 及肝脏氧应激, 但 NASH 同时存在线粒体结构缺陷; 如无线粒体结构异常, 只引起单纯性脂肪肝.

2.2 FFA 增高导致氧应激和线粒体损伤 脂肪酸氧化代谢主要在线粒体内进行, 若 FFA 增加超过线粒体 β 氧化负荷, 过氧化物生成, 可发生下列事件: (1) 通过 CYP2E1 诱导线粒体释放活性氧 (reactive oxygen species, ROS). (2) 激活过氧化物酶体释放 H_2O_2 , 使脂肪酸氧化. (3) 随着 UCP2 的表达, 线粒体 ROS 释放增加, 引起 ATP

耗竭,最后通过血浆 TNF- α 等能促成氧应激。(4)直接激活炎症细胞释放细胞因子。上述一系列事件可在细胞内同时发生,导致促氧化和抗氧化机制的失衡,引起氧应激,促使组织坏死和纤维化;同时氧应激及 ROS 释放增加,引起脂质过氧化增加,脂质过氧化产物又损伤线粒体 DNA (也作用于线粒体蛋白),从而抑制呼吸链的电子传递,进一步促进 ROS 的增多,形成恶性循环^[7,10,21,22]。

3 FFA 与凋亡

3.1 FFA 极具细胞毒性 FFA 是具有高度细胞毒性的两性分子,其中的不饱和脂肪酸还可通过加强脂质过氧化反应损伤细胞。脂质过氧化自由基及其终产物丙二醛等过氧化脂质可使细胞膜的流动性和通透性发生障碍,引起细胞功能失调,甚至凋亡或死亡^[23]。体外细胞培养研究显示极低浓度的 FFA 即可直接损伤肝脏细胞的生物膜,并可能通过加强其 CYP2E1 表达、以及脂质过氧化反应和细胞因子毒性等途径损伤肝细胞^[5]。

3.2 FFA 升高促进肝细胞凋亡 动物实验和临床研究表明, NASH 中至少有部分肝细胞以细胞凋亡的形式死亡,脂质过氧化是促进肝细胞凋亡的途径之一;也有学者认为不饱和的 FFA 作为蛋白激酶 C 的激活剂,可通过改变细胞增生信号而促进细胞凋亡;也有研究表明, FFA 使 TNF- α 升高及加强 TNF- α 等细胞因子的毒性,引起肝细胞凋亡和肝细胞坏死,促进肝损伤的发生^[5,16,24]。

3.3 FFA 升高促进胰岛 β 细胞凋亡 离体实验中, FFA 通过凋亡或坏死使胰岛 β 细胞死亡;胰岛 β 细胞凋亡使机体对 IR 的代偿作用明显下降^[25]。机制可能有二:(1)FFA 可能影响前胰岛素原启动子的转录、活化,抑制他的合成速率和 mRNA 表达,使胰腺内甘油三酯含量增加,持续的细胞内甘油三酯堆积可以导致 β 细胞功能障碍,结构破坏,细胞数量减少,发生凋亡^[26]。而细胞内甘油三酯堆积是引起 β 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) 功能障碍的重要原因。(2)FFA 可诱导一氧化氮(NO)升高,后者是引起细胞凋亡的常见途径^[25]。

4 FFA 升高与 IR 和 NASH

FFA 升高分别在器官、细胞和分子水平上引起 IR 和脂肪肝。反之, IR 与 NASH 的发展又引起 FFA 的升高。大部分非酒精性脂肪肝患者,其临床和实验室特征与糖尿病和肥胖很相似,因此有人认为非酒精性脂肪肝是代谢综合征的胰岛素抵抗在肝脏的表现之一或继发后果^[27,28]。

4.1 肝脏 FFA 增加引起代谢紊乱 肝脏 IR 的启动与 FFA 浓度升高密切相关;升高的 FFA 干扰胰岛素抑制糖原分解和肝内糖异生的作用、减少胰岛素清除并损害肝细胞对胰岛素的敏感性^[29],脂解速率在内脏脂肪组织中明显加速,结果导致 FFA 动员至门静脉的选择性增加。

门静脉高浓度的 FFA 对肝组织具损伤作用,从而导致脂代谢紊乱,高胰岛素血症,高血糖和 IR^[30]。

4.2 FFA 抑制 GSIS 一旦形成 IR,就会削弱/损伤胰岛素对脂代谢的调节作用,使脂肪组织分解,释放 FFA 增多。已有证据表明,从 IR 的出现到胰岛 β 细胞功能衰竭的发展过程中, FFA 起着决定性作用^[31]。FFA 对胰岛 β 细胞的影响是双时相的:在短期内,表现为基础高胰岛素分泌及对 GSIS 高敏;而长时间温育,则表现为基础高胰岛素分泌和 GSIS 障碍,后者为肥胖型 2 型糖尿病患者胰岛素分泌的特征。长期摄入饱和脂肪酸能增强 GSIS,而摄入不饱和脂肪酸(饮食或注射途径),则抑制 GSIS^[32]。

4.3 NASH 发病存在两个缺陷 Sanyal et al^[13]通过对 NASH、单纯性脂肪肝及正常对照共三组 22 例患者的 IR、胰岛素对脂解速率的影响、线粒体损伤、脂肪酸 β 氧化、肝脂质过氧化等进行评价,显示脂肪肝和 NASH 的外周组织胰岛素抵抗,增加脂肪酸 β 氧化,促进肝脏氧应激,且 NASH 存在线粒体结构缺陷,从而支持 NASH 发病存在两个缺陷的学说:一是 IR 增加脂解作用,促进 FFA 进入肝脏及其 β 氧化,产生氧应激;二是肝细胞自身缺陷,对氧应激损伤更加敏感。

总之, FFA 与细胞因子、酶、线粒体、细胞、组织等在机体内互相作用,形成复杂的网络,但由于 IR 和 NASH 的发病机制还不清楚, FFA 在其机制中的具体作用尚需进一步研究;尤其要开展对 FFA 代谢途径有关基因缺陷方面的研究。如果对 FFA 代谢异常进行干预,能否有效减缓或终止 IR 与 NASH 的恶性循环,还需相关的实验研究和临床大样本长期观察。

5 参考文献

- Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;35:373-379
- Cassader M, Gambino R, Musso G, Depetris N, Mecca F, Cavallo-Perin P, Pacini G, Rizzetto M, Pagano G. Postprandial triglyceride-rich lipoprotein metabolism and insulin sensitivity in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Lipids* 2001;36:1117-1124
- Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor α promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:274-280
- Nehra V, Angulo P, Buchman AL, Lindor KD. Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2001;46:2347-2352
- 范建高,钟岚,王国良,徐正婕,巫协宁,李明升.大鼠非酒精性脂肪性肝炎发病中游离脂肪酸的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:721-722
- Carpentier A, Patterson BW, Leung N, Lewis GF. Sensitivity to acute insulin-mediated suppression of plasma free fatty acids is not a determinant of fasting VLDL triglyceride secretion in healthy humans. *Diabetes* 2002;51:1867-1875
- Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:27-41
- Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial

- overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor α in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-211
- 9 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
- 10 Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor- α activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 2001;142:1269-1277
- 11 Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:27-41
- 12 Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000;105:1067-1075
- 13 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- 14 Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor- α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1185-1163
- 15 Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 2001;276:25096-25100
- 16 王玉梅, 冯国和, 赵桂珍, 乔光彦. 肿瘤坏死因子- α 及一氧化氮对暴发性肝衰竭肝损伤的作用. *世界华人消化杂志* 2002;10:646-649
- 17 Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002;36:403-409
- 18 Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Rossetti L, Barzilai N. Leptin resistance during aging is independent of fat mass. *Diabetes* 2002;51:1016-1021
- 19 Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor- α activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem* 2002;277:9562-9569
- 20 Huang X, Eriksson KF, Vaag A, Lehtovirta M, Hansson M, Laurila E, Kanninen T, Olesen BT, Kurucz I, Koranyi L, Groop L. Insulin-regulated mitochondrial gene expression is associated with glucose flux in human skeletal muscle. *Diabetes* 1999;48:1508-1514
- 21 Patrick L. Nonalcoholic fatty liver disease: relationship to insulin sensitivity and oxidative stress. Treatment approaches using vitamin E, magnesium, and betaine. *Altern Med Rev* 2002;7:276-301
- 22 Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002;60:289-303
- 23 Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 1999;19:221-230
- 24 Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, Castellvi A, Alonso E, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis* 2002;160:223-232
- 25 Stickings P, Cunningham JM. Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production and inhibition of insulin secretion in rat islets of langerhans is dependent upon the nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin. *Cytokine* 2002;18:81-85
- 26 Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2002;35:898-904
- 27 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty disease a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850
- 28 Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3057-3061
- 29 Sonksen PH. Insulin, growth hormone and sport. *Endocrinology* 2001;70:13-25
- 30 Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL, Bergman RN. Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes* 2002;51:755-761
- 31 Chen NG, Reaven GM. Fatty acid inhibition of glucose stimulated insulin secretion is enhanced in pancreatic islets from insulin resistant rats. *Metabolism* 1999;48:1314-1317
- 32 Dobbins RL, Szczepaniak LS, Myhill J, Tamura Y, Uchino H, Giacca A, McGarry JD. The composition of dietary fat directly influences glucose-stimulated insulin secretion in rats. *Diabetes* 2002;51:1825-1833

KAI1基因在胰腺癌中抗转移作用的研究

任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义

任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义, 中国人民解放军沈阳军区总医院医学实验科 辽宁省沈阳市 110016
项目负责人: 刘民培, 110016, 辽宁省沈阳市沈河区文化路 83 号, 中国人民解放军沈阳军区总医院医学实验科. profe_liu@163.com
电话: 024-23051421 传真: 024-24508052
收稿日期: 2002-12-08 接受日期: 2002-12-25

摘要

癌症患者死亡的主要原因之一是癌细胞的转移所致, 而转移更是胰腺癌的主要特点. 高转移率、高死亡率为此癌的突出特征, 手术切除率较低, 故给治疗带来困难, 因此积极开展抑制胰腺癌转移的基因诊断和治疗的研究, 既具有重要的理论意义, 亦有临床应用的价值. KAI1 基因是近年来发现的一种与肿瘤转移抑制有关的基因, 编码分子量为 29.61 kD 的细胞膜糖蛋白, 属于 TM4SF 家族成员之一. 该基因的功能日益受到学者们的广泛关注, 本文主要对该基因的结构、功能, 以及在抑制胰腺癌转移中的作用研究作一综述.

任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义. KAI1 基因在胰腺癌中抗转移作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1046-1049
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1046.asp>

0 引言

胰腺癌的诊断和治疗都是当今最棘手的一种恶性肿瘤, 不仅其早期诊断困难, 而且手术切除率低, 预后差^[1-3]. 这些主要与此癌的易转移等特点有关, 因此积极开展抑制胰腺癌转移基因等诊断和治疗的研究, 既具有重要的理论意义, 亦有其临床应用的价值^[4-15]. KAI1 基因是一种与肿瘤转移抑制有关的新基因^[16-20], 因此现已成为细胞生物学和肿瘤学研究的热点基因之一. 本文主要对该基因的结构、功能, 以及在胰腺癌中抑制其转移作用的研究进行综述.

1 KAI1 基因的结构和特性^[21-24]

1995 年, Dong et al 首次从人前列腺癌杂交瘤细胞系 AT6.1-11-1 中, 克隆得到一种与肿瘤转移抑制有关的基因, 并命名为 Kang Ai 1, 即中文拼音抗癌 1 号基因之意, 简称 KAI1 基因, 又称 CD82 分子. 该基因定位于人类染色体 11p11.2 上, 全长约 80 kb, 含有 10 个外显子和 9 个内含子. 其中第一个内含子长达 29 kb, 相当于其他内含子长度之和. 5' 端有大约 8 kb 的前导区, 第 10 外显子约有 8 kb 的拖尾. 其 5' 的启动子区域有一 CpG 岛, 约 735 bp, 无 TATA 盒和 CCAAT 盒,

但有多个结合基序可与各种转录因子结合, 包括 9 个 SP1 位点和 5 个 AP2 位点. 因此, 推测该基因在人类组织中的表达可能有多种调控机制, 但其具体方式尚不清楚. 该基因的 cDNA 长 2.4 kb, 有一开放阅读框架, 编码 267 个氨基酸的蛋白质, 分子质量约 29.61 kD. 根据其含 4 个跨膜结构域和一个细胞外亲水性结构域中有 3 个潜在糖基化位点等结构特点, 其属跨膜 4 超家族 (transmembrane 4 superfamily, TM4SF) 成员之一, 并属细胞膜糖蛋白.

在 TM4SF 成员中, 至少有 14 个人类的分子. 其中 KAI1 有 6 个不同的名称, 即 CD82/ KAI1/R2/C33/IA4/4F9. 其他 13 个分子是 CD9/MRP-1、CD37、CD53/OX-44、CD63/ME491、CD81/TAPA-1/S5.7、A15/MXS1/TALLA-1、peripherin/RDS、ROM-1、CO-029、L6/M3S1、SAS、iITMP 和 SFA-1.

KAI1 蛋白作为 TM4SF 成员之一, 虽然其抑制肿瘤转移的作用已被人们所接受, 但这种作用的机制至今尚无明确的解释. 目前的分析认为, 这可能与其在细胞膜上的定位和广泛的糖基化, 以及在细胞与细胞及细胞与细胞外基质的相互作用有关. 但这些均需进一步的探讨.

2 KAI1 基因抗胰腺癌转移作用的研究

2.1 基础研究

2.1.1 KAI1 基因及其探针的制备^[25-28] 所用的引物是 5' CGACACGTGGGCACAGGCAGAA3' (KAI1-Sense) 和 5' GTTGGGGGCCAGGCAGGGAGAT 3' (KAI1-Antisense). 其方法是将 cRNA 反转录为 cDNA 后行 PCR 扩增, 与 pCR-II 载体重组, 转染到 E.coli JM109 细菌体内, 通过质粒扩增和线性化处理, 用地高辛标记 KAI1 基因探针. 该探针无放射性污染, 灵敏度高, 且方便可行, 为胰腺癌浸润转移的检测提供了分子杂交试剂.

7S cDNA 探针的制备按上述相似的方法进行, 以 [α -³²P]dCTP 标记, 其放射性为 0.5-1 × 10⁹ cpm/μg, 以此作为 KAI1 基因平行上样的标准.

2.1.2 胰腺癌组织中 KAI1 基因的突变分析^[29-30] 采用的引物有 (1) KAI1-AS: 5' GTTGGGGGCCAGGCAGGGAGAT3'; (2) KAI1-S: 5' CGACACGTGGGCACAGGCAGAA3'; (3) KAI1-AS: 5' ATTTAGGTGACACTATAGAAAGGGAGATGGGGATAGCA 3'; (4) KAI1-S: 5' TAATACGACTC ACTATAGGAAGAATTGGGCCCTGTGAC3'.

分析的方法是用正常和胰腺癌组织中 RNA 反转录成 cDNA, 经 2 次 PCR, 用核糖核酸酶 III (RNase III) 酶

切后行凝胶电泳, 通过其序列分析确定其突变方式. 经对 17 例伴有淋巴结转移的原发性胰腺癌(Ⅲ期), 7 例无淋巴结转移的原发性胰腺癌(2 例 I 期, 5 例 II 期)和 9 例正常胰腺组织的分析结果表明, 在这 24 例胰腺癌标本中, 7 例(29%)在其核苷酸链 886 位上的碱基发生点突变(CAT → CGT), 故导致缬氨酸置换为异亮氨酸. 其突变率为 4.1% (7/17), 且有突变的这些癌标本均属于晚期(Ⅲ期)转移的胰腺癌. 这些结果表明, KAI1 基因的这种突变可能与细胞增生、黏附、迁移和转移等生物学行为的改变有关. 这一发现为阐明胰腺癌转移的有关理论提供了其分子变化的重要而直接的证据.

2.1.3 KAI1 基因表达异常的可能机制 通过对前列腺组织的研究发现, KAI1 蛋白在癌组织中表达下调与该基因突变及等位基因缺失无关^[31]. Tagawa et al^[32]用微卫星分析肺腺癌组织中 KAI1 基因的表达结果显示, 没有检测到其杂合性缺失(LOH)和复制错误(RERs). CpG 岛的甲基化在胰腺癌中是一个倍受关注的问题^[33]. KAI1 基因启动子区域有丰富的 CpG 岛, 如果发生过度甲基化将会导致 KAI1 基因的表达缺失. 但 Jackson et al^[34]的研究认为, CpG 岛的甲基化对于调控基因的表达无意义. Mashimo et al^[35]的研究发现, p53 基因可通过与 KAI1 基因 5' 上游区的结构相互作用而直接活化 KAI1 基因, 在人类前列腺癌细胞系中进一步证明 p53 的激活作用与 c-Jun 基因相联系, 并同拓扑异构酶 II (鬼臼叉乙甙) 呈剂量依赖关系^[36]. 但也有研究报道, p53 对 KAI1 表达的调节作用不明显, 认为 KAI1 基因不是 p53 作用的转录靶基因^[37]. 这些结果表明, 有关其机制的问题目前无统一论, 尚待进一步的探讨^[38].

2.2 临床研究

2.2.1 KAI1 mRNA 在胰腺癌组织中的表达^[25,39] Guo et al 采用 Northern blot 和原位杂交对 44 例正常胰腺和 95 例原发性胰腺癌的测定结果显示, 84% (80/95) 的胰腺癌组织中有不同程度的 KAI1 mRNA 的表达, 其中有转移的胰腺癌组织明显低于没有转移的原发性胰腺癌中的 mRNA 水平($P < 0.005$). 在 54 例有转移的原发性胰腺癌中, 25 例(46%)的 KAI1 mRNA 为弱表达, 15 例(28%)无表达, 其余的 14 例(26%)为中度表达.

2.2.2 KAI1 mRNA 的表达与胰腺癌的临床和病理关系^[25,40] 早期原发性胰腺癌的 KAI1 mRNA 水平与晚期转移的原发性胰腺癌相比有非常显著的差异性($P < 0.01$), 而高、中分化胰腺癌的 KAI1 mRNA 水平明显低于低分化和未分化的原发性胰腺癌($P < 0.05$). 通过 Northern blot 和原位杂交技术分析得出, 具有远处淋巴结转移的 KAI1 mRNA 水平明显低于没有淋巴结转移(I-II 期)的患者, 而且低分化和未分化的明显高于分化良好者($P < 0.05$). 早期原发性胰腺癌的 KAI1 mRNA 水平与晚期转移的原发性胰腺癌相比有非常显著的差异性($P < 0.01$).

2.2.3 KAI1 mRNA 在胰腺癌组织中的定位^[25,41] 经原位杂交和免疫组化分析发现, KAI1 mRNA 在胰腺癌细胞

质内有不同程度的分布表达, 而癌周围基质、炎症细胞、胰岛细胞, 以及邻近癌旁组织腺泡细胞内的 mRNA 无或弱表达. 其细胞蛋白质水平的定位除胰岛细胞有中、高度表达外, 其余与 KAI1 mRNA 的分布一致.

2.2.4 KAI1 mRNA 的表达与胰腺癌转移的关系

^[39,42,43]

KAI1 基因在非转移的原发胰腺癌中呈中度到高度的表达, 而转移的原发胰腺癌呈低或无表达. Friess et al 进一步比较了 KAI1 在未转移的胰腺癌、已经发生转移的胰腺组织, 以及转移到淋巴结或肝脏的转移瘤这四种标本中的表达, 结果是未转移的胰腺癌组织 KAI1 基因的表达明显高于其他三组. 淋巴结转移癌 KAI1 基因水平低于已发生转移的原发癌, 肝转移癌的 KAI1 基因几乎无表达. 通过 Northern blot、免疫组化以及原位杂交方法对十二指肠乳头癌和胰腺癌组织进行研究, 结果提示 KAI1 基因是抑制胰腺癌进展的因素, 支持其在胰腺癌中抑制肿瘤转移的作用, 而对十二指肠乳头癌的生物学特性似乎无明显影响. 我们对原发性胰腺癌转移淋巴结的分析发现, 20 例淋巴结转移癌中有 6 例(30%)的 KAI1 mRNA 为弱表达, 其余 14 例(70%)转移癌均无 KAI1 表达, 与其相应的原发性胰腺癌相比有显著性差异($P < 0.05$); 11 例肝转移癌与原发性胰腺癌相比有非常显著的差异性($P < 0.01$), 而胰腺癌的淋巴结转移癌和肝转移癌之间的结果相似($P < 0.05$).

2.2.5 KAI1 mRNA 水平和胰腺癌患者预后的关系

^[25,39,44]

经对胰腺癌患者 KAI1 基因的表达水平与其年龄、性别、手术方式、分期、分化程度和生存期等关系的分析发现, I - II 期胰腺癌和低未分化胰腺癌的 KAI1 mRNA 呈高表达, 在晚期呈低表达. 而且这种表达与胰腺癌患者的术后生存期缩短无关($P < 0.05$). 经对 TM4SF 家族部分成员(MRP-1/CD9、KAI1/CD82 和 ME491/CD63)同胰腺癌的关系进行研究, 以确定 TM4SF 在估计胰腺癌患者的预后中的意义. 结果发现 15 例 KAI1 基因阳性表达患者的生存率明显高于 25 例 KAI1 基因表达降低的患者. 用 Cox 多变量的统计学分析显示, CD82 和 CD9 是最明显的相关因素^[45].

3 KAI1 基因与其他抑瘤基因在胰腺癌转移抑制中的比较 通过对正常十二指肠组织和十二指肠乳头癌组织以及正常和胰腺癌组织中 nm-23H1 和 KAI1 基因的比较研究发现, 在肿瘤的早期阶段, nm-23H1 和 KAI1 mRNA 表达水平呈上调, 而在肿瘤进展时其表达水平降低, 他们表达的差异是导致这两种肿瘤不同预后的主要因素之一^[40].

尽管 KAI1 基因在胰腺癌中有上述表达特征, 但是大量实验证明, KAI1 基因在正常肝中的 mRNA 定量分析发现, 其水平明显高于肝癌的 2.6 倍, 在 22 例晚期转移肝癌中有 14 例(60%)的 KAI1 mRNA 呈低表达, 与无转移肝癌相比差异性显著($P < 0.05$), 且原发性肝癌与肝内转移癌、腹膜转移癌及淋巴结转移癌均有明显

差异性。然而,晚期转移的和非转移的食管癌、胃癌和十二指肠乳头癌无显著性差异($P < 0.05$)^[46]。KAI1基因表达的这些差异性表明,该基因在不同癌组织中的分布及表达呈不均一性。这可能与不同肿瘤的异质性有关。

总之,侵袭和转移是恶性肿瘤细胞的一种主要的生物学行为。这种行为既与病情发展有直接的关系,更是影响其转归与预后的重要因素。因此,近年来对恶性肿瘤有关转移的分子生物学研究已成为肿瘤学研究中的前沿和热点。KAI1基因在胰腺癌中抗转移作用的研究最早始于1996年^[25],大量而深入的研究发现,该基因在胰腺癌中呈低或无表达时则出现转移,且早期患者的mRNA水平显著高于晚期有转移的患者,表明该基因在此癌中具有抑制其转移的作用。目前的研究表明,KAI1基因是一种与多种恶性肿瘤的转移抑制有关而新的抗肿瘤转移基因,其在前列腺癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、结肠癌、肝癌、口腔癌及小儿肿瘤中的作用均有类似的报道^[47-74]。由于这些作用和特性,因此KAI1基因受到国内外的广泛关注,并已对其进行有关的实验研究和临床病例的分析,这不仅为胰腺癌等恶性肿瘤抗转移作用的研究奠定了理论基础,而且亦为其基因的诊治提供了实验依据。

4 参考文献

- 刘民培,马景云,潘伯荣,马连生. 中国胰腺癌的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:1103-1109
- Yue H, Na YL, Feng XL, Ma SR, Song FL, Yang B. Expression of p57(kip2), Rb protein and PCNA and their relationships with clinicopathology in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:377-380
- Abbruzzese JL. Past and present treatment of pancreatic adenocarcinoma: chemotherapy as a standard treatment modality. *Semin Oncol* 2002;(6 Suppl 20):2-8
- 孙早喜,孙诚谊,王福生. 胰腺癌等肿瘤的免疫治疗. 世界华人消化杂志 2002;10:90-93
- 刘江伟,李开宗. 胰腺癌与癌基因及抑癌基因. 世界华人消化杂志 2001;9:172-73
- 谢传高,王兴鹏. 血管生成与胰腺癌. 世界华人消化杂志 2001;9:338-341
- 王兴鹏. 中国胰腺疾病研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2000;8:843-846
- 徐选福,王兴鹏. 胰腺癌诊断学新认识. 世界华人消化杂志 2000;8:1034-1036
- 冷建军,陈玉强,冷希圣. 胰腺癌的基因治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:916-918
- 张世能,袁世珍. 胰腺癌基因治疗研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:269-270
- 王新军,周正炎. 抑制肿瘤转移的研究进展. 口腔颌面外科杂志 2002;12:51-53
- 聂胜利,袁世珍. 血管抑制素基因治疗人胰腺癌的实验研究. 中华消化杂志 2001;21:465-468
- Shi X, Friess H, Kleeff J, Ozawa F, Buchler MW. Pancreatic cancer: factors regulating tumor development, maintenance and metastasis. *Pancreatol* 2001;1:517-524
- Kauffman EC, Robinson VL, Stadler WM, Sookloff MH, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis suppression: the evolving role of metastasis suppressor genes for regulating cancer cell growth at the secondary site. *J Urol* 2003;169:1122-1134
- Kasuya H, Nomoto S, Nakao A. The potential of gene therapy in the treatment of pancreatic cancer. *Drugs Today (Barc)* 2002;38:457-464
- Li S, Fang W, Zhong H. Expression of tumor metastasis suppressor gene KAI1/CD82 in human cancer cell lines with different metastasis potential. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:708-710
- 张英兰,张捷. KAI1/CD82与恶性肿瘤. 国外医学分子生物学分册 2001;28:271-273
- Write A, Lamb PW, Barrett JC. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene* 1998;16:3143-3149
- 邵晓冬,郭晓钟. 转移抑制基因KAI1与恶性肿瘤的关系. 国外医学肿瘤学分册 2001;28:167-170
- 杨景,柳凤轩. KAI1肿瘤转移抑制基因研究新进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2001;21:339-340
- Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11 p112. *Science* 1995;268:884-886
- Dong JT, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT. Genomic organization of the human KAI1 metastasis-suppressor gene. *Genomics* 1997;41:25-32
- 陆颖,朱茂祥. 人类11号染色体与肿瘤. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2002;22:362-365
- Yang JL, Jackson P, Yu Y, Russell PJ, Markovic B, Crowe PJ. Expression of the KAI1 metastasis suppressor gene in non-metastatic versus metastatic human colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3337-3342
- Guo XZ, Friess H, Graber HU, Kashiwagi M, Zimmermann A, Kore M, Büchler MW. KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res* 1996;56:4876-4880
- 徐建华,郭晓钟,刘民培,邵晓冬,任丽楠,安天义,王迪,李宏宇,赵佳均. KAI1 RNA探针的制备及其在胰腺癌中的应用. 胰腺病学 2002;2:159-161
- 蒋鲁岩,陈光哲,祝长青,秦敏,张常印. 应用地高辛标记的寡聚核酸探针检测副溶血弧菌. 检验检验科学 2002;12:11-12
- 王文亮,顾广玉,胡敏,王春杰. 人原发性肝内胆管细胞癌中乙型肝炎病毒基因及其抗原的表达及意义. 华人消化杂志 1998;6:1039-1042
- 郭晓钟, Friess H, 徐建华, 李爱娟, 邵晓冬, Büchler MW. KAI1基因在胰腺癌中的突变分析. 胰腺病学 2001;1:29-31
- 郑作昱, 王立东, Shi Stephanie T, Yang GY, Xue ZH, 高姗姗, 李永欣, Yang CS. 河南食管癌高发区居民多灶性食管癌前病变和癌组织p53基因的突变分析. 世界华人消化杂志 1999;7:280-284
- Dong JT, Suzuki H, Pin SS, Bova S, Schalken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res* 1996;56:4387-4390
- Tagawa K, Arihiro K, Takeshima Y, Hiyama E, Yamasaki M, Inai K. Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:970-976
- Chao AO, Kim SG, Bedeir A, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in carcinoid and pancreatic endocrine tumors. *Oncogene* 2003;22:924-934
- Jackson P, Millar D, Kingsley E, Yardley G, Ow K, Clark S, Russell PJ. Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Letters* 2000;157:169-176
- Mahimo T, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Tegtmeyer PJ, Rinker-Schaeffer CW, Watabe K. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11307-11311
- Mashimo T, Bandyopadhyay S, Goodarzi G, Watabe M, Pai SK, Gross SC, Watabe K. Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:370-376
- Duriez C, Falette N, Cortes U, Moyret-Lalle C, Puisieux A. Absence of p53-dependent induction of the metastatic suppressor KAI1 gene after DNA damage. *Oncogene* 2000;19:2461-2464
- Jackson P, Grimm MO, Kingsley EA, Brosius U, Antalis T, Yardley G, Russell PJ. Relationship between expression of KAI1 metastasis suppressor gene, mRNA levels and p53 in human bladder

- and prostate cancer cell lines. *Urol Oncol* 2002;7:99-104
- 39 Friess H, Guo XZ, Berberat P, Grabber HU, Zimmermann A, Korc M, Büchler MW. Reduced KAI1 expression in pancreatic cancer is associated with lymph node and distant metastases. *Int J Cancer* 1998;79:349-355
- 40 Guo XZ, Friess H, Shao XD, Liu MP, Xia YT, Xu JH, Buchler MW. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis. *World J Gastroenterol* 2000;6:866-871
- 41 黄培林, 陆伦根, 史志英, 尹克铮, 张晓明. 大肠肿瘤组织中人乳头状瘤病毒 DNA 的分子原位杂交研究. *华人消化杂志* 1998;6:771-773
- 42 郭晓钟, 夏玉亭, 李宏宇, 吴春燕, 刘民培, 霍燃, 安天义, 张丹阳. KAI1 基因在十二指肠乳头癌及胰腺癌不同表达的意义. *中华实验外科杂志* 2000;18:201
- 43 郭晓钟, 刘民培, 夏玉亭, 邵晓冬, 李宏宇, 张丹阳, 陈虹. KAI1 基因与胰腺癌转移的关系. *中华内科杂志* 2000;9:626
- 44 郭晓钟, 刘民培, 夏玉亭, 岳辉, 戴兵, 潘汝明. 低 KAI1 mRNA 水平与胰腺癌的浸润转移有关. *中华消化杂志* 1998;18:223-225
- 45 Sho M, Adachi M, Taki T, Hashida H, Konishi T, Huang CL, Ikeda N, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M. Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1998;79:509-516
- 46 Guo XZ, Friess H, Maurer C, Berberat P, Tang WH, Zimmermann A, Naef M, Graber HU, Korc M, Buchler MW. KAI1 is unchanged in metastatic and nonmetastatic esophageal and gastric cancers. *Cancer Res* 1998;58:753-758
- 47 Bouras T, Frauman AG. Expression of the prostate cancer metastasis suppressor gene KAI1 in primary prostate cancers: a biphasic relationship with tumour grade. *J Pathol* 1999;188:382-388
- 48 Bienstock RJ, Barrett JC. KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcing* 2001;32:139-153
- 49 Jee B, Jin K, Hahn JH, Song HG, Lee H. Metastasis-suppressor KAI1/CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through src-dependent pathway. *Exp Mol Med* 2003;35:30-37
- 50 Tozawa K, Akita H, Kawai N, Okamura T, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. KAI1 expression can be a predictor of staga A prostate cancer progression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2001;4:150-153
- 51 Lijovic M, Somers G, Frauman AG. KAI1/CD82 protein expression in primary prostate cancer and in BPH associated with cancer. *Cancer Detect Prev* 2002;26:69-77
- 52 Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, Takami K, Adachi M, Taki T, Ishiguro S, Nakamori S, Yoshie O, Miyake M. KAI1/CD82 expression in nonsmall cell lung carcinoma is a novel, favorable prognostic factor: an immunohistochemical analysis. *Cancer* 1998;83:466-474
- 53 吴文青, 范希光, 饶纬华. 抑癌基因在肺癌治疗中的新进展. *中华结核和呼吸杂志* 1999;22:697-699
- 54 Yu Y, Yang JL, Markovic B, Jackson P, Yardley G, Barrett J, Russell PJ. Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin Cancer Res* 1999;3:1045-1049
- 55 Jackson P, Kingsley EA, Russell PJ. Inverse correlation between KAI1 mRNA levels and invasive behaviour in bladder cancer cell lines. *Cancer Letters* 2000;156:9-17
- 56 Ow K, Delprado W, Fisher R, Barrett J, Yu Y, Jackson P, Russell PJ. Relationship between expression of the KAI1 metastasis suppressor and other markers of advanced bladder cancer. *J Pathol* 2000;191:39-47
- 57 Yang X, Welch DR, Phillips KK, Weissman BE, Wei LL. KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer. *Cancer Letters* 1997;119:149-155
- 58 Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:5284-5288
- 59 李珊珊, 任秀花, 闫爱华, 方伟岗, 沈琼. 转移性和非转移性乳腺癌组织中 KAI1 基因的表达. *河南医科大学学报* 2000;35:101-102
- 60 Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ. Frequent down-regulation and lack of mutation of the KAI1 metastasis suppressor gene in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000;78:10-15
- 61 Houle CD, Ding XY, Foley JF, Afshari CA, Barrett JC, Davis BJ. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol* 2002;86:69-78
- 62 Liu FS, Chen JT, Dong JT, Hsieh YT, Lin AJ, Ho ES, Hung MJ, Lu CH. KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol* 2001;159:1629-1634
- 63 Maurer CA, Graber HU, Friess H, Beyermann B, Willi D, Netzer P, Zimmermann A, Buchler MW. Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery* 1999;126:869-880
- 64 Muneyuki T, Watanabe M, Yamanaka M, Shiraiishi T, Isaji S. KAI1/CD82 expression as a prognostic factor in sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001;21:3581-3587
- 65 Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW, Barrett JC. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res* 1999;59:5724-5731
- 66 Mikami T, Ookawa K, Shimoyama T, Fukuda S, Saito H, Munakata A. KAI1, CAR, and Smad4 expression in the progression of colorectal tumor. *J Gastroenterol* 2001;36:465-469
- 67 张捷, 张英兰, 陈晓华. KAI1/CD82 在肠癌组织中的表达水平及表达机制. *临床检验杂志* 2001;20:153-155
- 68 Guo XZ, Friess H, Di Mola FF, Heinicke JM, Abou-Shady M, Graber HU, Baer HU, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW. KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;28:1481-1488
- 69 苏文深, 陈大良. 肝细胞癌侵袭转移的分子机制. *福建医科大学学报* 2001;35:19-22
- 70 陈克林, 李海华, 李玉梅, 曹秀华, 刘敏, 崔秀明, 王浩, 赵祥明, 张彦春. KAI1 基因在肝癌组织中表达的研究. *世界华人消化杂志* 1998;6:1102-1103
- 71 方石岗, 杨继震. 肝细胞癌转移的研究进展. *世界华人消化杂志* 1999;7:782-784
- 72 Uzawa K, Ono K, Suzuki H, Tanaka C, Yakushiji T, Yamamoto N, Ykoe H, Tanzawa H. High prevalence of decreased expression of KAI1 metastasis suppressor in human oral carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2002;8:828-835
- 73 Imai Y, Sasaki T, Shinagawa Y, Akimoto K, Fujibayashi T. Expression of metastasis suppressor gene (KAI1/CD82) in oral squamous cell carcinoma and its clinico-pathological significance. *Oral Oncol* 2002;38:557-561
- 74 Aryee DN, Ambros I, Ambros PF, Muehlbacher K, Luegmayer A, Yoshie O, Kovar H. Frequent low level expression in Ewing sarcoma family tumors and widespread absence of the metastasis suppressor KAI1/CD82 in neuroblastoma. *Pediatr Res* 2002;52:279-285

结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势

谢正勇, 卿三华

谢正勇, 卿三华, 中国人民解放军第一军医大学附属南方医院普外科
广东省广州市 510515
项目负责人: 卿三华, 510515, 广东省广州市南方医院普外科, 中国人民解放军
第一军医大学附属南方医院普外科. sanhuaq@yahoo.com
电话: 020-61641696 传真: 020-87280340
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-03

摘要

对结直肠癌发病率及解剖部位分布变化趋势进行研究, 有利于探索病因及制定合理防治策略. 息肉切除术的广泛应用, 使西方国家CRC发病率呈下降趋势; 而西方化的生活方式和饮食习惯则使得原来低发的许多国家CRC发病率上升. CRC高发国家以结肠癌为主, 低发国家则以直肠癌占优势. 近年许多学者发现CRC肿瘤部位分布由远端向近端转移, 并认为这与远端结直肠癌发病率下降致近端结肠癌所占比例上升有关. 年龄、性别、种族、共病等多种因素可影响CRC的解剖部位: 老年、女性、黑人、患有糖尿病等共病、有阳性家族史等是CRC分布于近端结肠的高危因素. 近端结肠癌预后不良, 尤应注意早期诊治, 改善预后.

谢正勇, 卿三华. 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势. 世界华人消化杂志
2003;11(7):1050-1053

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1050.asp>

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一, 仅2000年全球就有945 000新发病例, 仅次于肺癌、乳癌, 居恶性肿瘤发病率的第三位^[1]. CRC病因不明, 预后较差, 5 a存活率不超过40%^[2], 对其发病率及解剖部位的流行病学变化趋势进行研究, 有利于探索病因及制定合理防治策略^[3,4]. 本文仅对CRC的流行病学变化趋势作一简要综述.

1 CRC的发病率及变化

1.1 CRC在各国分布的总体概况 世界各国CRC发病率差异较大. 一般而言, 工业发展程度越高的国家, CRC发病率越高^[2,5], 在西方发达国家CRC常见, 居恶性肿瘤发病率的第二位, 而发展中国家则仅占全部CRC的不到1/3^[2]. 北美、西欧、澳大利亚及新西兰是CRC高发地区, 发病率为30-50/10万, 东欧居中, 而非洲、亚洲及南美发病率较低, 约为10/10万^[2,5-7], 发病率差异显著, 提示CRC与环境、生活方式及遗传等因素有密切关系. 世界上男性CRC发病率最高者为生

活在夏威夷的日本人, 为37.15/10万; 女性则在新西兰, 为30.46/10万^[2].

1.2 CRC发病率在部分国家的下降及其原因 高脂肪、低纤维素食是CRC发病的重要危险因素^[8-12]. 随着工业化进程的加速、生活水平的提高, 1950年代之后, 西方国家CRC发病率显著上升^[2,13], 且呈现黑人较白人、男性较女性、结肠癌较直肠癌上升更为迅速的特点^[13], 在加拿大、英国及其他工业发达的欧洲国家亦是如此^[2]. CRC发病率至1980年代中后期达到高峰, 而后开始以每年1%的速度下降^[6, 13]. 美国SEER (surveillance, epidemiology, and end results)1973-1994年的统计资料显示^[14]: 白人男、女性远端结直肠癌发病率分别下降24%、26%, 近端结肠癌则分别下降12%、14%; SEER的另一资料^[13]显示: 尽管美国黑人女性直肠癌在1990年代开始下降, 而黑人男、女性近端结肠癌却分别上升30%、22.5%. 在美国呈现以男性、远端下降为主的特点^[13,14], 其他研究亦报告类似结果^[15].

暴露于危险因素至CRC发病的时间约为5-15 a^[14], 对1970年代的膳食结构[脂肪、蛋白质、纤维素、维生素等]、生活方式[吸烟、饮酒、运动等]、胆囊切除、息肉切除术等可能影响CRC发病的因素进行分析, 有利于找出CRC发病率下降的原因. 结直肠息肉与CRC的发生密切相关, 息肉切除可明显降低CRC的发病率. 从结直肠息肉至形成肿瘤的时间约为10 a^[16], 息肉切除术自1970年广泛应用, 使CRC发病率下降约70%^[17], 他导致的CRC发病率下降出现在1980年代中后期. Nelson et al^[14]研究表明: 息肉切除术的广泛应用导致美国CRC发病率从1986年开始持续下降, 与上述假设相一致. 黑人得到结直肠息肉切除术的机会明显低于白人^[13,14], 这与黑人发病率没有出现白人的持续下降相吻合. 国内新近的一项研究^[18]也证实息肉切除术可降低直肠癌发病率. 纤维素摄入的增多、去除亚硝酸胺的啤酒、阿司匹林、钙剂等也可能与CRC发病率下降有关, 而脂肪酸种类的改变是否与之有关尚无定论^[13,14,19]. 尽管1990年瑞典的一个CRC描述性流行病学报告^[20]发现在降结肠、乙状结肠癌中青年女性较男性多见, 作者解释为雌激素作用, 但近年许多研究都发现雌激素对结肠癌有保护作用^[3,15,21], 使结肠癌发病率降低30%, 可能通过影响雌激素受体基因启动子内的CpG岛而发挥作用^[21], 但确切的机制尚不清楚.

1.3 CRC发病率在部分国家的上升及其原因 与西方国家CRC发病率持续降低或保持稳定不变不同的是: 亚

洲、非洲、东欧、南欧一些国家的CRC发病率呈上升趋势. 在日本^[22], CRC发病率大上升尤为显著, 从1950年到1995年上升了8倍; 在韩国^[6], 发病率每10 a上升2倍, CRC占全部癌症的比例从1982年的5.8%上升到1996年的8.4%; 在中国上海^[23], 男性发病率从1972年的14.5/10万上升到1996年的23.5/10万, 女性从12.1/10万上升到20.3/10万. 国内外学者均认为这与西方化生活方式和饮食习惯有关. 而仍保持传统饮食习惯的埃及^[24], 其发病率近年仍呈上升趋势, 且40岁以下年轻人占30%以上, 另一作者^[25]发现埃及CRC患者体内有机氯化物或其他杀虫剂水平较高, 认为这与针对CRC的预防措施同工业化、城市化进程不相适应有关.

移民流行病学结果发现^[2,5]: 从日本、中国及非洲等CRC低发国家移居至美国、澳大利亚等CRC高发国家的人群, 在第一代即出现发病率的显著上升, 而从南欧移居至澳大利亚但仍保持其原有烹调方式的人群, CRC发病率却无明显改变^[26], 提示生活方式在CRC发病中起重要作用.

一些国家CRC发病率短期内的巨大变化及移民流行病学的研究结果提示^[2]: 环境、饮食习惯是CRC发生中较遗传更为重要的危险因素.

2 解剖部位分布的变化趋势及影响因素

一般而言, 在亚洲及南美等CRC低发地区, 直肠癌占全部CRC的比例在50%以上, 而在欧洲及北美等高发地区, 结肠癌占60%以上, 直肠癌不超过40%^[22]. CRC在不同人群中的解剖部位分布不同并且随时间而变化, 提示年龄、性别、环境、饮食、遗传等因素可能与CRC部位分布有关^[2,3,13-15,22,27,28], 而近远端结直肠癌在对诊断试验及化疗的敏感度、肿瘤分期及预后等方面存在明显差异^[3,29-31], 了解CRC解剖部位分布变化趋势, 便于研究CRC病因及制定合理防治策略.

2.1 CRC解剖部位分布的近端转移趋势及原因 1977年, 美国学者首次发现CRC肿瘤部位存在由远端结直肠向近端结肠转移的现象^[32]. 此后, 许多学者^[2-5,13-15,20,22,23,27-30,33-37]报告了CRC解剖部位分布变化的这种趋势, 且在老年、女性、黑人中更为明显. Cucino et al^[34]最近报告: 1993-1997年间, SEER统计近端结肠癌所占比例上升6%, 1970-2000年美国新墨西哥州白人的近端结肠癌比例上升16%, 黑人上升22%.

多数学者只是描述了CRC各部位所占比例的变化, 但这种近端转移趋势是由于远端CRC发病率的下降还是由于近端结肠癌发病率的上升所致并不清楚. Davila et al^[35]最近统计了SEER1978-1998年的左、右半结肠癌及直肠癌的发病率, 结果发现: 左半结肠癌发病率下降; 直肠癌发病率在黑人基本不变, 在白人下降; 而右半结肠癌发病率并未发生明显改变. 因此认为CRC发病的近端转移趋势是远端结直肠癌发病率下降致近端结肠癌

所占比例上升所致. 希腊^[33]及日本^[22]最近的研究结果发现近端转移趋势在女性、老年中尤为明显, 提出近端转移与人口老龄化有关.

2.2 CRC解剖部位分布的影响因素 近远端结直肠存在不同的胚胎学起源^[6,20], 对致癌物质的敏感性存在差异. 近远端结肠癌可能存在不同的发病机制^[3,6,20,22,30,38]. 微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)及CpG岛甲基化表型与近端结肠癌有关^[30], 而K-ras基因突变^[6]、染色体不稳定^[30]与远端CRC有关. 近年来, 国内外学者对CRC分子生物学进行了系统研究^[39,40], 但至今尚无确切结论. 但是, 流行病学家及临床学家发现许多因素可影响CRC的解剖部位分布. (1)年龄: 早在1963年, 美国学者就发现年龄与CRC部位分布有密切关系^[22]: 30岁以下CRC患者中近端结肠癌仅占18%, 而80岁以上者高达28.6%. 有学者^[41]指出: 70岁以上的患者, CRC发病以近端为主. SEER1978-1998年的资料^[35]显示: 60岁以上CRC患者, 近端结肠癌占43%, 而60岁以下仅占28%. Gonzalez et al^[3]对影响近端分布的因素进行Logistic回归分析的结果认为: 年龄每增长1岁, 分布于近端的概率上升2.2%. 老年人CRC高发且存在近端分布趋势, 提示CRC的发生与老年生理学、遗传学改变有关^[28], 致癌物质对近远端结直肠作用有不同的潜伏期, 亦是导致近远端CRC发病年龄存在差异的原因之一^[6]. (2)性别: 女性CRC更易分布在近端结肠, 男性则相反^[3,6,13,15,22,29,34,35]. Gonzalez et al^[3]研究表明: 女性CRC分布于近端结肠的概率较男性上升38%. 性别对CRC部位分布的影响与生活方式的差异^[3,13,15]、内源性激素导致的生理改变^[3,6]等有关. 女性激素可能通过影响胆固醇代谢影响胆汁酸代谢, 而胆汁酸与近端结肠癌有关^[3]. 与男性有关的吸烟、饮酒等危险因素则与远端CRC的发生有关^[3,13,15]. (3)种族: 种族是影响CRC部位分布的另一重要原因. 众所周知, 黑人较白人CRC发病率更高, 且多分布在近端结肠^[2,3,13-16,27-29]. 1980年代中后期, 白人近、远端CRC皆开始下降, 黑人近端结肠癌发病率及所占比例却持续上升^[3,13,14,29]. Gonzalez et al^[3]认为黑人较白人CRC分布于近端结肠的概率上升24%. 最近一份比较中美CRC解剖部位分布的研究^[42,43]发现: 美国白人较中国人更易分布在近端. 种族间CRC部位分布差异可能与遗传、生活方式、环境、社会经济状况、医疗服务的能力等多种因素有关^[2,3,13,16,27-29]. (4)共病: 共病(comorbidity)的存在是CRC发生呈近端分布的另一原因. Gonzalez et al^[3]首次研究共病对CRC部位分布的影响, 结果发现: 共病使CRC分布于近端结肠的概率提高28%, 尤以充血性心力衰竭、消化性溃疡及糖尿病三种共病的影响最大, 有共病的CRC患者存在分期高、预后差的特点. 2型糖尿病患者CRC发病率较高^[44], 这可能与胰岛素作为肠黏膜的生长激素有关, 高胰岛素血症在其他共病中亦存在^[45]. 生物作用机制如胰岛素对肠黏膜的作用^[44,45]、有共病者行更频率的筛查^[46,47]、

共病本身及针对共病的治疗影响肠道动力^[48,49]等是共病影响CRC部位分布的可能原因,但确切的机制有待进一步研究。(5)其他因素:有遗传性非息肉性结直肠癌(HNPCC)及家族性息肉病(FAP)在内的家族史者,CRC易分布于近端结肠^[3,30];动物脂肪摄入多、超重、运动少等与近端分布有关,酒精、吸烟、血清铁、白蛋白的增加则与CRC的远端分布有关^[27]。

3 近远端结肠癌的预后

近端较远端CRC分期更高、预后更差^[3,17,27,29],其原因可能与由于诊断方法而导致的诊断延误及肿瘤本身的生物学特性等有关^[27,29]。Gonzalez et al^[3]在控制可影响肿瘤分期的其他因素的情况下讨论部位对肿瘤分期的影响,结果发现:近端较远端CRC患者就诊时趋于晚期的概率高10%,从直肠向回盲部每移动一个部位,就诊时趋于晚期的概率上升4%。而分期高决定其预后较差^[3,27,29]。

总之,CRC在发达国家常见,但发病率开始下降;而在亚洲、非洲等低发地区,CRC发病率呈上升趋势。近年CRC出现由远端向近端转移的趋势,年龄增加、女性、黑人、共病及饮食等因素与之有关。在制定CRC防治策略上尤应注意对近端结肠癌的筛查,早期诊断,改善预后。

4 参考文献

- Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-543
- Wilink AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1997;40:483-493
- Gonzalez EC, Roetzheim RG, Ferrante JM, Campbell R. Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 2001;44:251-258
- Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25
- Levin KE, Dozois RR. Epidemiology of large bowel cancer. *World J Surg* 1991;15:562-567
- Kim DH, Shin MH, Ahn YO. Incidence pattern of colorectal cancer in Korea of origin. *J Korean Med Sci* 2000;15:675-681
- Bonithon-Kopp C, Benhamiche AM. Are there several colorectal cancers? Epidemiological data. *Eur J Cancer Pre* 1999;(Suppl 1):S3-12
- Jia XD, Han C. Chemoprevention of tea on colorectal cancer induced by dimethylhydrazine in Wistar rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:699-703
- Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 2003;27:55-66
- Maynard M, Gunnell D, Emmett P, Frankel S, Davey Smith G. Fruit, vegetables, and antioxidants in childhood and risk of adult cancer: the Boyd Orr cohort. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:218-225
- Tan W, Lin DX, Xiao Y, Kadlubar F, Chen JS. Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenyl-midazo 4,5-b pyridine-induced carcinogen-DNA adducts by Chinese cabbage in rats. *World J Gastroenterol* 1999;5:138-142
- Jarvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Rissanen H, Heliövaara M. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. *Br J Cancer* 2001;85:357-361
- Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S: An update of trends by gender, race, age subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* 1999;85:1670-1676
- Nelson RL, Persky V, Turyk M. Determination of factors responsible for the declining incidence of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1999;42:741-745
- Nelson RL, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race, and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. *Cancer* 1997;80:193-197
- von Eyben FE, Thordal C. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997;113:1422-1423
- Lieberman DA. Cost-effectiveness model for colon cancer screening. *Gastroenterology* 1995;109:1781-1790
- Zheng S, Liu XY, Ding KF, Wang LB, Qiu PL, Ding XF, Shen YZ, Shen GF, Sun QR, Li WD, Dong Q, Zhang SZ. Reduction of the incidence and mortality of rectal cancer by polypectomy: a prospective cohort study in Haining County. *World J Gastroenterol* 2002;8:488-492
- De Stefani E, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H, Ronco A. Influence of dietary levels of fat, cholesterol, and calcium on colorectal cancer. *Nutr Cancer* 1997;29:83-89
- Gerhardsson M, Steineck G, Norell SE. Colorectal cancer in Sweden. A descriptive epidemiologic study. *Acta Oncol* 1990;29:855-861
- al-Azzawi F, Wahab M. Estrogen and colon cancer: current issues. *Climacteric* 2002;5:3-14
- Takada H, Ohsawa T, Iwamoto S, Yoshida R, Nakano M, Imada S, Yoshioka K, Okuno M, Masuya Y, Hasegawa K, Kamano N, Hioki K, Muto T, Koyama Y. Changing site description of colorectal cancer in Japan. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1249-1254
- You W, Jin F, Gridley G, Schatzkin A, Yang G, Rosenberg P, Xiang Y, Hu Y, Li Q. Trends in colorectal cancer rates in urban Shanghai, 1972-1996, in relation to dietary changes. *Ann Epidemiol* 2000;10:469
- Abou-Zeid AA, Khafagy W, Marzouk DM, Alaa A, Mostafa I, Ela MA. Colorectal cancer in Egypt. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1255-1260
- Soliman AS, Smith MA, Cooper SP, Ismail K, Khaled H, Ismail S, McPherson RS, Seifeldin IA, Bondy ML. Serum organochlorine pesticide levels in patients with colorectal cancer in Egypt. *Arch Environ Health* 1997;52:409-415
- Andrews LG, Johnston JH. Epidemiology of bovine tuberculosis in northern Australia. *Acta Vet Scand Suppl* 1988;84:139-141
- Cheng X, Chen VW, Steele B, Ruiz B, Fulton J, Liu L, Carozza SE, Greenlee R. Subsite-specific incidence rate and stage of disease in colorectal cancer by race, gender, and age group in the United States, 1992-1997. *Cancer* 2001;92:2547-2554
- Okamoto M, Shiratori Y, Yamaji Y, Kato J, Ikenoue T, Togo G, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Relationship between age and site of colorectal cancer based on colonoscopy findings. *Gastrointestinal Endoscopy* 2002;55:548-551
- Marcella S, Miller JE. Racial differences in colorectal cancer mortality: the importance of stage and socioeconomic status. *J Clin Epidemiol* 2001;54:359-366
- Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer* 2002;101:403-408
- Makin GB, Breen DJ, Monson JR. The impact of new technology on surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:612-621
- Snyder DN, Heston JF, Meigs JW, Flannery JT. Changes in site distribution of colorectal carcinoma in Connecticut, 1940-1973. *Am J Dig Dis* 1977;22:791-797
- Vassilopoulos PP, Kelessis N, Plataniotis G, Gondikakis E, Galanos A. Colorectal cancer trends by anatomic sites, age and staging. A twenty-year study of 1412 Greek cases. *Anticancer Res* 2000;20:4773-4776
- Cucino C, Buchner AM, Sonnenberg A. Continued rightward shift of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1035-1040
- Davila J, El-Serag H, Rabeneck L. #68 Is there a true "shift" to the right in the incidence of colorectal cancer? *Ann Epidemiol*

- 2002;12:515
- 36 Miller A, Gorska M, Bassett M. Proximal shift of colorectal cancer in the Australian Capital Territory over 20 years. *Aust N Z J Med* 2000;30:221-225
- 37 Wan J, Zhang ZQ, Zhu C, Wang MW, Zhao DH, Fu YH, Zhang JP, Wang YH, Wu BY. Colonoscopic screening and follow-up for colorectal cancer in the elderly. *World J Gastroenterol* 2002; 8:267-269
- 38 Ma QY, Williamson KE, Rowlands BJ. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2002;8:847-852
- 39 Yuan P, Sun MH, Zhang JS, Zhu XZ, Shi DR. APC and K-ras gene mutation in aberrant crypt foci of human colon. *World J Gastroenterol* 2001;7:352-356
- 40 Luo MJ, Lai MD. Identification of differentially expressed genes in normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma of colon by SSH. *World J Gastroenterol* 2001;7:726-31
- 41 Slattery ML, Friedman GD, Potter JD, Edwards S, Caan BJ, Samowitz W. A description of age, sex, and site distributions of colon carcinoma in three geographic areas. *Cancer* 1996;78: 1666-1670
- 42 Arai T, Takubo K, Sawabe M, Esaki Y. Pathologic characteristics of colorectal cancer in the elderly: a retrospective study of 947 surgical cases. *J Clin Gastroenterol* 2000;31:67-72
- 43 卿三华, 饶开运, 蒋会勇, Wexner SD. 原发性结直肠癌解剖部位在美国白人与中国人之间分布趋势的比较. *中华胃肠外科杂志* 2002; 5:123-125
- 44 Hu FB, Manson JE, Liu S, Hunter D, Colditz GA, Michels KB, Speizer FE, Giovannucci E. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Ins* 1999;91:542-547
- 45 Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med* 1990;113:779-788
- 46 Stange K, Flocke SA, Goodwin MA. Opportunistic preventive service delivery. Are limitations and patient satisfaction barriers? *J Fam Pract* 1998;46:419-424
- 47 Bostick RM, Sprafka JM, Virnig BA, Potter JD. Predictors of cancer prevention attitudes and participation in cancer screening examinations. *Prev Med* 1994;23:816-826
- 48 Levein NG, Thorn SE, Wattwil M. Dopamine delays gastric emptying and prolongs oro-caecal transit time in volunteers. *Eur J Anaesthesiol* 1999;16:246-250
- 49 Rosa-e-Silva L, Troncon LE, Oliveira RB, Foss MC, Braga FJ, Gallo Junior L. Rapid distal small bowel transit associated with sympathetic denervation in type I diabetes mellitus. *Gut* 1996;39:748-756

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)

微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展

李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书

李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科 广东省广州市 510515
李新华, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化科 陕西省西安市 710032
项目负责人: 李新华, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科. doclixh@sina.com
收稿日期: 2002-12-05 接受日期: 2002-12-25

摘要

微阵列技术是近年来兴起的一项前沿生物技术, 他利用分子杂交的原理, 将生物学中许多不连续的分析过程, 移植到固相的递质芯片上, 进行样品的多方位分析, 首次提供了高通量或平行监测基因表达变化和功能的新方法. 已广泛应用于基因表达分析、新基因发现及功能研究、基因组文库作图、基因突变及多肽性分析、疾病诊断、药物筛选、基因测序等领域. 利用基因微阵列研究消化系统疾病将会有助于从整体水平上认识疾病发生中相应的分子事件, 更深刻地了解消化系肿瘤与疾病的基因变化路径和机制. 本文综述了微阵列技术原理及近年来在消化系疾病研究中的应用.

李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书. 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1054-1058

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1054.asp>

0 引言

人类基因组测序草图的公布, 使人类所有 DNA 的遗传信息得以解码^[1]. 但是, 这解决了遗传信息库的问题, 我们还需要尽快读懂人类全部基因的含义(功能), 并能阐明其相互内在关系及多层次分类的生物信息, 以建立对生命现象的整体认识, 为疾病的诊断、新药物的研制和新疗法的探索带来一场革命. 而传统的从基因到基因(gene-by-gene)的研究方法已经无法完成如此复杂的工作, 非常有必要对生物进程从全局的观念(global views)进行理解, 也就是同时解析生物体相关所有组份. 基因芯片的出现则首次提供了对这种全局观念的解决之道, 他提供了高通量(high throughput)或平行监测基因表达变化和功能的新技术新方法. 被评为21世纪最有发展前途的20项高新技术之一, 有可能成为未来生物学研究和临床诊断的通用手段^[2].

1 定义与原理

微阵列(microarray)技术突出特点在于高度并行性、多样性、微型化和自动化^[3,4]. 他是利用分子杂交的原理, 将许多特定的寡核苷酸片段、基因片段或其他生物信息作为探针, 有规律地排列固定于支持物上, 然后与待测的标记样品的基因按碱基配对原理进行杂交, 最

后检测杂交信号强弱, 并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号做出比较和检测, 从而迅速得出所要的信息^[5,6]. 含有大量生物信息的固相基质被称为微阵列, 又称生物芯片(biochip). 根据储存的生物信息的类型, 微阵列可分为组织微阵列(tissue microarray)^[7], 蛋白质芯片^[8,9], 寡核苷酸微阵列^[10](oligonucleotide microarray, 又称 DNA 微阵列或 DNA 芯片), cDNA 微阵列(cDNA microarray, 又称 cDNA 芯片)等. DNA 微阵列和 cDNA 微阵列一起又称基因芯片. 从广义上讲, 一切以芯片为基础的生物分析过程均可称为微阵列技术, 其中以大规模 DNA 杂交技术为基础的基因芯片技术尤为人们所瞩目.

2 微阵列的技术要点

2.1 微阵列的片基或支持物(substrate or support matrix)可以分为无机片基和有机合成物片基^[11-13]. 前者主要有半导体硅片和玻璃片等, 其上的探针主要以原位聚合的方法合成; 后者主要有特定孔径的硝酸纤维膜和尼龙膜, 其上的探针主要是预先合成后通过特殊的微量点样装置或仪器滴加到片基上. 另有以聚丙烯膜支持物用传统的亚磷酸胺固相法原位合成的高密度探针序列. 作原位合成的支持物在聚合前要使其表面衍生出羟基或氨基(视所要固定的分子为核酸或寡肽而定)并与保护基建立共价连接; 作点样用的支持物为使其表面带上正电荷以黏附带负电荷的探针分子, 通常需包被以氨基硅烷或多聚赖氨酸等.

2.2 微阵列的制备方法 (1)原位合成 (in situ synthesis)法^[10,14-16]: 即在片基上直接合成寡核苷酸探针阵列, 目前应用的主要有光引导合成技术(light-directed synthesis)(也称光刻法)和压电打印法(piezoelectric printing)等, 其关键是高空间分辨率的模板定位技术和高合成产率的 DNA 化学合成技术, 适用于寡核苷酸及寡肽分子制作大规模 DNA 探针芯片, 以实现高密度芯片的标准化和规模化生产. (2)合成后点样^[10-12,14](off-chip DNA synthesis): 是将合成好的探针、cDNA 或基因组 DNA 通过特殊的点样装置或仪器将其以较高密度分布于硝酸纤维膜或经过处理的玻片上, 通过共价键和离子键使之固定. 直接打印时针头与芯片接触, 而在喷印时针头与芯片保持一定距离. 其多用于大片段 DNA, 主要优点是: 保持样品原形, 操作迅速, 成本低廉, 适合于研究者根据需要制备点阵规模适中的基因芯片.

2.3 待分析样品的制备 是基因芯片实验流程的一个重要环节, 靶基因在与芯片探针杂交前必须进行分离、

扩增及标记. 通常是在待测样品的PCR扩增、逆转录或体外转录过程中实现对靶基因的标记. 目前常用荧光物质直接标记核苷酸, 也可用生物素化的核苷酸, 用荧光物质-亲和素结合物间接检测杂交结果, 花青素(Cyanin, Cy3、Cy5)是目前使用最广泛的荧光标记物^[3,17]. 另外也有人用放射性³²P标记核苷酸^[18].

2.4 杂交 基因芯片与靶基因的杂交过程与一般的分子杂交过程基本相同, 杂交反应条件要根据探针的类型和长度、GC碱基含量以及芯片的类型来优化, 如用于基因表达检测, 杂交的严格性较低; 若用于突变检测的芯片, 其杂交温度高, 杂交时间短, 条件较严格^[11,19].

2.5 信号检测及分析 目前荧光检测方法主要有两种^[11,13,15]: 一是激光共聚焦荧光显微扫描, 二是电荷藕联装置照相机(charge-coupled device camera CCD)荧光显微照相检测. 前者检测灵敏度、分辨率均较高, 但扫描时间长; 后者扫描时间短, 但灵敏度和分辨率不如前者. 虽然荧光检测在芯片技术中得到了广泛的应用, 但其灵敏度较低且不能区分干扰信号, 因而有研究者正试图建立更灵敏、更快速的检测系统, 如质谱法、化学发光法、光导纤维法以及生物传感器法等.

对检测得到的数据, 现有专门的软件进行图像分析和数据库相连, 进行信息处理, 如: 根据时间、功能、染色体位置、代谢途径和其他表型或实验参数进行查询、分类、综合.

3 微阵列技术在消化系疾病研究中的应用

基因芯片技术自其问世起就得到了广泛的应用^[20,21]. 应用领域包括(1)基因表达谱监测, 这是其应用最广泛的领域. 即同时、快速、准确地检测培养细胞和组织标本中上千个已知或未知序列在转录水平的表达状况, 系统地提供基因在发育过程、生理反应、疾病过程和调控网络表达上的时空差别的信息, 从而达到阐述基因功能、探索疾病原因及机制、发现可能的诊断及治疗靶分子等目的.(2)DNA变异研究, 包括DNA测序及突变的检测, 基因型和多态性分析. 人类基因组计划分析出了3.5万个基因序列. 下一步, 就是要分析这些基因的多态性与生物功能和疾病(包括遗传疾病)易感性的关系. 结合单核苷酸多态性标记物系统(single nucleotide polymorphisms, SNP), 应用DNA芯片确定基因多态性和疾病的关系的能力将大大提高, 同时也可确定致病的机制和患者对治疗的反应等.(3)基因测序.

3.1 消化系肿瘤研究中的微阵列技术 利用cDNA阵列中所包含的基因信息的大容量和检测上的简便性, 运用cDNA阵列的方法分析正常组织和不同病理分类肿瘤的表达谱型和差异, 对其分析比较后, 有望为肿瘤的临床分类提供更客观的分子水平的标准, 并为肿瘤临床治疗提供新的靶位分子, 其中还包括为抗肿瘤药物的研制提供很好的实验模板. 从肿瘤的基础理论研究来看, 肿瘤表达谱型的比较研究, 对了解肿瘤的发生、

发展、转移等涉及肿瘤研究领域的一些核心问题, 也可提供依据. 目前, cDNA阵列分析肿瘤基因表达谱型已广泛用于各种肿瘤的研究^[22-28]. 消化系肿瘤亦是其研究的热点领域. (1)肝癌: 日本东京大学医学院分子医学研究室^[29]用包含23 040个基因的cDNA微阵列研究了20例原发性肝细胞癌(HCC)及其对应非癌组织基因表达谱. 结果提示绝大多数肿瘤组织中有丝分裂启动基因上调表达. HBV阳性的HCCs其基因表达方式不同于HCV阳性的HCCs, 他们编码一些代谢酶类致癌物及/或抗癌因子. 另外鉴定了一定数量与恶性表型或侵袭表型相关的基因. 这样有可能弄清楚个体肿瘤的本质, 提供线索确定新的治疗靶因子, 最终优化每个患者的治疗. (2)食管癌: 目前临床分类的依据主要是根据肿瘤形态学上的差异, 并籍以指导临床治疗方案. 如何从分子水平阐明肿瘤的发病机制和由此所产生的繁多的病理种类, 是一项涉及多个学科领域的综合性系统工程. 刘芝华 et al^[30]用cDNA微阵列的方法研究了食管癌的表达谱, 结果显示在所分析的588种已知基因中, cdc25B、MMP、MET等61个在食管癌组织中表达上调, cytoke-
ratin4、BAD、IL-1 Receptor Antagonist、IL6等22个表达下调, 参与细胞增生、凋亡、分化和转移调控的多种基因的表达水平发生了明显改变. 在其后的研究中^[31], 他们又以5 760个点阵的滤膜(包括530个命名的基因, 4654个表达序列标签, 168个看家基因和24个空白点)分析了食管癌发生不同病理阶段(正常, I度异型增生, II度异型增生, 原位癌, 食管细胞癌)的基因表达谱, 通过比较分析这些表达谱, 发现I度异型增生很多基因表达水平已发生改变, 其他4个阶段一些已知的肿瘤相关基因呈高表达或低表达, 对一些重要组分的分析发现一些基因包括 α -TNF, keratin6B和S100 calcium-binding protein A9等在肿瘤的发生发展过程中起了重要的作用. 这些基因的表达改变首次为食管癌细胞的恶性表型提供了分子遗传学参考数据, 一些与肿瘤发生相关的差异表达基因为发展生物标记物或肿瘤早期诊断和治疗提供了线索. (3)结肠癌: 结肠癌是欧美国家最常见的恶性肿瘤, 通过芯片技术对结肠癌基因表达谱的筛选可以发现若干与癌发生发展有关的基因表达变化, 将这些特异表达变化的基因序列重新排列用于结肠癌的诊断, 理论上是可行的. Notterman et al^[32]进行了有益的尝试. 他们首先构建了包括人类3 200个全长cDNA和3 400个EST的基因芯片, 然后以此筛选了18例结肠腺癌、4例结肠腺瘤和配对的正常结肠黏膜的转录表达情况. 与正常黏膜相比, 结肠癌有19个基因上调表达, 47个基因下调表达. 其中的一些不同也出现在腺瘤标本中. 两步聚类分析能够成功地将腺瘤与腺癌和正常组织区分开来, 由此得到的系统树恰好代表了所研究的三种组织类型. Kitahara et al^[33]的实验用含9 216个人类基因的cDNA芯片比较了经显微切割(LCM)的8例结肠癌和相应非癌结肠上皮的基因表达谱差异. 一半的肿瘤组

织表达谱发生了改变,有44个上调表达和191个下调表达的基因.这些基因涉及信号转导相关基因、代谢酶类、转录相关、有丝分裂以及凋亡相关基因. Favis et al^[34]把PCR和链接酶反应(ligase detection resction, LDR)结合,在一个反应管里同时检测上百个突变,再结合寡核苷酸阵列,就能同时迅速分析大量样本.他们应用该方法成功地描绘出结肠癌的K-ras和P-53突变.

3.2 炎症 Honda et al^[35]用基因芯片技术发现慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎所致肝损伤的基因表达类型不同.基因表达的分层聚类分析显示,HBV感染的肝细胞中,以炎症相关基因表达水平的下调改变较为突出,而HCV感染的肝细胞中,以抗炎基因表达上调为主,提示两型肝炎发病的不同分子机制.1997年,法国Livache et al^[36]就成功的利用基因芯片技术,对人血中的HCV病毒进行了基因型分析.

基因芯片也被用于胰腺炎的研究. Samir et al^[37]应用高密度小鼠cDNA芯片分析急性胰腺炎期间胰腺细胞基因表达谱的改变.并对筛选出的一条新基因:胰腺炎诱导蛋白49(PIP)的克隆、序列和表达进行了研究.该基因在胰腺炎急性期迅速而强烈表达.对PIP49初期及后期结构分析显示他是编码跨膜蛋白的基因.

cDNA芯片亦被用到了宿主-病源体相互作用的研究中: Eckmann et al^[38]用高密度芯片研究了培养的结肠上皮细胞感染沙门氏菌后基因表达的变化,发现了一些与感染相关的基因,其中细胞因子(G-CSF, inhibin A, EB病毒诱导基因3, IL-8, 巨噬细胞炎症蛋白-2a),一些激酶(TKT, Eck, HEK),转录因子(INF诱导因子1)以及HLA I等变化明显,进一步研究发现NF- κ B在调节基因表达中具有重要作用.使这方面的知识得到了拓展.

3.3 Hp研究 Hp的诊断迄今为止仍然是一个未被很好解决的问题,基因芯片目前也用到了对Hp的基因分型、寻找毒力相关基因以及与宿主细胞相互作用基因表达水平影响的研究上.

Israel et al^[39]用Hp全基因组芯片分析从不同临床相关疾病分离的Hp基因组差异,寻找与致病作用有关的毒力基因.发现与致十二指肠溃疡菌株G1.11相比,B128菌株感染沙土鼠后引起更严重的胃炎、溃疡和黏膜细胞增生凋亡紊乱;杂交还发现致十二指肠溃疡菌株G1.11具有大量致病岛(PAI)组分缺失.证明Hp致炎作用是PAI依赖性的. Salama et al^[40]用Hp全基因组基因芯片检测不同Hp菌株之间基因的改变,发现22%的基因对于一个或多个Hp菌株是非必需的,进而确定了Hp的1281条核心基因.核心基因编码大多数细菌代谢和细胞生命过程必需的蛋白.菌株特异性基因包括Hp特有的基因、限制性修饰基因、转座酶和编码细胞表面蛋白的基因,这些变化是细菌在长期感染宿主过程中的改变.通过基因芯片杂交方法,在菌株特异性基因中,发现了一批相对保守的与PAI有共同遗传性的候

选毒力相关基因.还有学者试图为Hp的研究开辟新的领域, Ang et al^[41]用含1534个开放读框(ORF)的Hp基因芯片研究了不同酸度条件下(pH7.2, pH5.5)生长的Hp基因组表达的差异.在两种酸性条件下有53个ORF均上调表达.在低酸条件下有80个ORF上调表达,另有4个ORF表达受抑.这一研究为Hp的研究开辟新的思路. Maeda et al^[42]用高密度cDNA芯片监测与Hp共同培养的人胃癌细胞(MKN-45, AGS)基因表达谱的改变. CagA阳性Hp上调胃癌细胞株2304条基因中的8条.等位基因cagE阴性突变Hp则不能上调这些基因的表达.

3.4 毒物作用和抗肿瘤药物研究 Reilly et al^[43]用基因芯片技术监测大鼠对乙酰氨基酚所致肝损伤的基因表达改变.得到了一些与加速或抑制进一步肝损伤有关的基因. Waring et al^[44]又用基因芯片技术分析了四氯化碳、氨甲蝶呤、卡马西平等15种肝毒性物质对体外培养肝细胞基因表达谱改变的影响,表明此技术是毒理学研究的好方法.

NCI(美国国立癌症研究所)在癌症治疗发展计划中观察了65000种以上化合物对9种肿瘤组织来源的60个肿瘤细胞系的作用效应,所得数据为癌症药物的开发和研究提供了很有价值的参考作用,在此基础上,肿瘤生物学家可以利用基因芯片评估药物对肿瘤治疗的可行性及其反应^[45,46]. Clarke et al^[47]用基因芯片研究了肠癌患者化疗前和治疗期间肿瘤基因表达情况,发现丝裂霉素C和5-氟尿嘧啶治疗均可使糖苷合成酶和尿嘧啶-DNA糖基酶的基因表达增加.这类研究说明基因芯片是研究药物作用机制潜在的强有力工具^[48],有助于确定药物作用的靶基因,为新药研究提供线索.

生物芯片一经出现,就显示出了强大的生命力,其发展速度及其中所运用的技术是传统杂交技术所无法比拟的,令人瞩目,他顺应了人类基因组计划及后基因组计划的实施,必将给生命科学研究和临床诊断带来无法预知的广阔空间.利用基因微阵列研究消化系统疾病将会有助于从整体水平上认识疾病发生过程中相应的分子事件,更深刻地了解消化系肿瘤与疾病的基因变化路径和机制.并最终为消化系疾病发病机制的阐明和诊断、预防和治疗以及药物作用机制和新药物的研制带来一场革命.

4 参考文献

- 1 Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z,

- Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-1351
- 2 Lander ES. Array of hope. *Nat Genet* 1999;21(Suppl 1):3-4
- 3 Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- 4 DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996;14:457-460
- 5 Lemkin PF, Thornwall GC, Walton KD, Hennighausen L. The microarray explorer tool for data mining of cDNA microarrays: application for the mammary gland. *Nucleic Acid Res* 2000;28:4452-4459
- 6 Service RF. Microchip arrays put DNA on the spot. *Science* 1998;282:396-399
- 7 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Net Med* 1998;4:844-847
- 8 Emili AQ, Cagney G. Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Nat Biotechnol* 2000;18:393-397
- 9 Service RF. Protein arrays step out of DNA's shadow. *Science* 2000;289:1673
- 10 Heller MJ. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2002;4:129-53
- 11 Marshall A, Hodgson J. DNACHips: an array of possibilities. *Nat Biotechnol* 1998;16:27-31
- 12 Ramsay G. DNACHip: stat-theart. *Nat Biotechnol* 1998;16:40-44
- 13 LeProust E, Zhang H, Yu P, Zhou X, Gao X. Characterization of oligodeoxyribonucleotide synthesis on glass plates. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2171-2180
- 14 Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol* 1998;16:301-306
- 15 Barone AD, Beecher JE, Bury PA, Chen C, Doede T, Fidanza JA, McGall GH. Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:525-531
- 16 Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Pro Natl Acad Sci USA* 1994;91:5022-5026
- 17 Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 1996;6:639-645
- 18 Xu L, Hui L, Wang S, Gong J, Jin Y, Wang Y, Ji Y, Wu X, Han Z, Hu G. Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:3176-3181
- 19 Drobyshev A, Mologina N, Shik V, Pobedimskaya D, Yershov G, Mirzabekov A. Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip: identification of β -thalassemia mutations. *Gene* 1997;188:45-52
- 20 Young RA. Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell* 2000;102:9-15
- 21 Liotta L, Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev* 2000;1:48-56
- 22 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537
- 23 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511
- 24 Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, Kitahara O, Kihara C, Okamoto A, Ochiai K, Takagi T, Nakamura Y. Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Research* 2000;60:5007-5011
- 25 Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, Berens M, Alberts D, Sondak V. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406:536-540
- 26 Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-548
- 27 Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M, Jensen JL, Marcussen N, Hamilton-Dutoit S, Wolf H, ORntoft TF. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Gene* 2003;33:90-96
- 28 Luo J, Duggan DJ, Chen Y, Sauvageot J, Ewing CM, Bittner ML, Trent JM, Isaacs WB. Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res* 2001;61:4683-4688
- 29 Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Research* 2001;61:2129-2137
- 30 刘芝华, 周津, 王秀琴, 周传农, 赵峻, 张汝刚. 食管癌及癌旁组织中基因表达的初步研究. *中华医学遗传学杂志* 1999;16:303-306
- 31 Lu J, Liu Z, Xiong M, Wang Q, Wang X, Yang G, Zhao L, Qiu Z, Zhou C, Wu M. Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. *Int J Cancer* 2001;91:288-294
- 32 Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Research* 2001;61:3124-3130
- 33 Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita ME, Takagi T, Nakamura Y, Tsunoda T. Alteration of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tu-

- mor tissues and normal epithelia. *Cancer Research* 2001;61:3544-3549
- 34 Favis R, Barany F. Mutation detection in K-ras, BRCA1, BRCA2, and p53 using PCR/LDR and a universal DNA microarray. *Ann N Acad Sci* 2000;906:39-43
- 35 Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shiota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 2001;120:955-966
- 36 Livache T, Fouque B, Roget A, Marchand J, Bidan G, Teoule R, Mathis G. Polypyrrole DNACHIP on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping. *Anal Biochem* 1998;255:188-194
- 37 Samir AA, Ropolo A, Grasso D, Tomasini R, Dagorn JC, Dusetti N, Iovanna JL, Vaccaro MI. Cloning and expression of the mouse PIP49 (Pancreatitis Induced Protein 49) mRNA which encodes a new putative transmembrane protein activated in the pancreas with acute pancreatitis. *Mol Cell Bio Res Commun* 2000;4:188-193
- 38 Eckmann L, Smith JR, Housley MP, Dwinell MB, Kagnoff MF. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria Salmonella. *J Biol Chem* 2000;275:14084-14094
- 39 Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, Tham KT, Camorlinga M, Blaser MJ, Falkow S, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;107:611-620
- 40 Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14668-14673
- 41 Ang S, Lee CZ, Peck K, Sindici M, Matrubutham U, Gleeson MA, Wang JT. Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infection And Immunity* 2001;69:679-1686
- 42 Maeda S, Otsuka M, Hirata Y, Mitsuno Y, Yoshida H, Shiratori Y, Masuho Y, Muramatsu M, Seki N, Omata M. cDNA microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:443-449
- 43 Reilly TP, Bourdi M, Brady JN, Pise-Masison CA, Radonovich MF, George JW, Pohl LR. Expression profiling of acetaminophen liver toxicity in mice using microarray technology. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:321-328
- 44 Waring JF, Ciurlionis R, Jolly RA, Heindel M, Ulrich RG. Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicol Lett* 2001;120:359-368
- 45 Zembutsu H, Ohnishi Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Katagiri T, Ueyama Y, Tamaoki N, Nomura T, Kitahara O, Yanagawa R, Hirata K, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res* 2002;62:518-527
- 46 Kihara C, Tsunoda T, Tanaka T, Yamana H, Furukawa Y, Ono K, Kitahara O, Zembutsu H, Yanagawa R, Hirata K, Takagi T, Nakamura Y. Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. *Cancer Res* 2001;61:6474-6479
- 47 Clarke PA, George M, Cunningham D, Swift I, Workman P. Analysis of tumor gene expression following chemotherapeutic treatment of patients with bowel cancer. In: 'Proc. Nature Genetics Microarray Meeting 99'. Scottsdale: Arizona, 1999:39
- 48 Cronin MT, Pho M, Dutta D, Frueh F, Schwarcz L, Brennan T. Utilization of new technologies in drug trials and discovery. *Drug Metab Dispos* 2001;29:586-590

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

• 消息 •

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

本刊讯 世界华人消化杂志 (原新消化病学杂志) 从 1993-2002 年的电子版全部出版. 世界华人消化杂志过去发行: 新消化病学杂志, 1993 (1-4 期); 新消化病学杂志, 1994(1-4 期); 新消化病学杂志, 1995(1-4 期); 新消化病学杂志, 1996(1-12 期); 新消化病学杂志, 1997(1-12 期); 华人消化杂志, 1998(1-12 期); 世界华人消化杂志, 1999(1-12 期); 世界华人消化杂志, 2000 (1-12 期); 世界华人消化杂志, 2001(1-12 期). 世界华人消化杂志, 2002(1-12 期). 当前发行世界华人消化杂志, 2003(1-7 期).

World Journal of Gastroenterology (原中国新消化病学杂志) 从 1995-2002 年的电子版全部出版. 过去发行: China Natl J New Gastroenterol, 1995 (1 期); China Natl J New Gastroenterol, 1996 (1-4 期); China Natl J New Gastroenterol, 1997(1-4 期); World J Gastroenterol, 1998 (1-6 期); World J Gastroenterol, 1999(1-6 期); World J Gastroenterol, 2000(1-6 期); World J Gastroenterol, 2001(1-6 期); World J Gastroenterol, 2002(1-6 期). 当前发行 World J Gastroenterol, 2003(1-7 期).

世界华人消化杂志网址: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>. World J Gastroenterol 网址: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>

(世界胃肠病学杂志社 2003-07-05)

NO 和 VIP 与胃肠电 - 机械活动的关系

章 敏, 曲瑞瑶

章敏, 曲瑞瑶, 首都医科大学生理教研室 北京市 100054
北京市中医局 1999-2002 资助项目
项目负责人: 曲瑞瑶, 100054, 北京市右安门外西头条 10 号, 首都医科大学生理
教研室. quruiyao@yahoo.com.cn
电话: 010-63051198
收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2002-10-31

摘要

一氧化氮(nitric oxide, NO)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)都属于胃肠道非肾上腺非胆碱能(NANC)神经释放的主要抑制性神经递质, 对胃肠道的电机械 - 活动起着重要的抑制性调节作用. NO和VIP在人和其他动物的胃肠道的神经丛中有共染现象, 但是对于NO和VIP在形态学上的共染现象及解剖结构上的联系的解释不一. 还有人认为肠道肽能神经发挥作用需通过NO中介, 或至少部分通过NO作为信使而发挥调节胃肠道功能的作用, 并提出了VIP-NO轴的概念. 不但在正常生理状态下, VIP和NO之间存在着密切关系, 而且在许多胃肠系统的疾病中NOS与VIP也出现同升, 同降. 对于NO和VIP的作用机制及二者相互影响的机制的研究必将有利于进一步提高对临床胃肠动力障碍疾病的认识, 以及指导开发针对性强, 副作用小的治疗胃肠动力疾病的药物.

章敏, 曲瑞瑶. NO 和 VIP 与胃肠电 - 机械活动的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1059-1063
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1059.asp>

0 引言

一氧化氮(nitric oxide, NO)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)都属于胃肠道非肾上腺非胆碱能(NANC)神经释放的主要抑制性神经递质. 近来分别关于NO及VIP的研究已经很多, 但关于NO和VIP之间的相互关系、作用的机制尚存在很多争议. 现就NO、VIP与胃肠电 - 机械活动的关系的研究现状作一综述.

1 NO、VIP 在胃肠道的分布及作用

NO是一种自由基性质的气体, 最初只是认为他是污染空气的常见有毒成分之一. 人们发现生物体内有NO起作用要追溯到1953年^[1]. 美国纽约州立大学药理系Furchgott教授发现乙酰胆碱作用于血管内皮, 产生一种非前列腺素类的弥散因子, 后者作用于邻近的平滑肌细胞而产生舒张反应. 1982年, 这种物质被命名为内皮舒张因子(endothelium-derived relaxing factor,

EDRF), 后研究发现EDRF和NO药理学作用极为相似. 1986年, Furchgott提出EDRF可能就是NO, 后被证实. 以后人们对NO不断进行研究. 发现NO的作用很广泛, 几乎对全身各个系统都有影响, 如: 消化、循环、呼吸系统, 中枢和外周神经系统及免疫系统^[2-22]. 体内NO是由一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)产生的. 在哺乳动物和人的整个消化道中都有NOS阳性神经元的分布, 且在降结肠最密集, 食管最稀疏. 在胃肠壁全层, 从黏膜层, 黏膜下层, 肌层, 浆膜层及黏膜下层神经丛和肌间神经丛均有NOS的分布. 其中以环行平滑肌处最多, 消化道中NOS神经的分布与该处的生理功能相吻合, 并可能与许多胃肠疾病的发生及发展密切相关^[23-29]. NO对整个消化道平滑肌都有舒张作用, 且对胃肠移行性复合运动(migrating motor complex, MMC)也有影响^[30]. Russo et al^[31]发现给健康成人患者静脉注射NOS抑制剂L-单甲基精氨酸(NG-methyl-L-arginine, L-NMMA) 4 mg·Kg⁻¹·h⁻¹, 监测4h十二指肠压和空肠压, 要比静脉注射盐水的志愿者的MMC III期第一阶段提前出现, 且MMC的周期长度也缩短. 但L-NMMA对总收缩的速度, 幅度, 持续时间, 收缩量, 移行长度及MMC III期起源点无影响. 这表明NO机制在调节人类快速小肠运动中起一定作用. NO不但对胃肠运动调节起着重要作用, 对胃肠电活动也有影响. 龙庆林发现给大鼠注射大剂量NOS抑制剂L-型精氨酸甲酯(L-NAME)后出现了明显的胃电节律失常, 而胃电节律失常模型组胃窦肌间神经丛的氮能神经含量明显增加. 所以内源性NO增多或过少均可导致明显的胃电节律失常^[32]. 在体外研究NO对豚鼠胃窦环行肌电活动和收缩运动的影响. 发现在豚鼠胃窦环行肌条上, NO供体硝普钠(0.5 μmol·L⁻¹)能显著抑制电活动快波和运动. 这种抑制作用不受河豚毒、阿托品、酚妥拉明和普萘洛尔(各1 μmol·L⁻¹)的影响, 但可被亚甲基蓝(5 μmol·L⁻¹)和氧合血红蛋白(5 μmol·L⁻¹)明显减弱(P < 0.01). 所以NO抑制豚鼠胃窦环行肌电活动和收缩运动. 这种抑制效应是通过NO对平滑肌细胞膜的直接作用和增加细胞内环磷酸鸟苷来实现的^[33]. 大鼠溃疡性结肠炎模型中, 结肠电基本电节律(basic electric rhythm, BER)及收缩性复合肌电(contractile electrical complexes, CEC)幅值均显著降低, 负载峰电的BER及CEC百分数明显减少, 大肠洗液NO产物亚硝酸盐(NOP)浓度则显著升高, 二者呈显著负相关, 应用中药胃肠康治疗后, 其结肠电及大肠洗液NOP浓度均趋于恢复^[34].

VIP最初是 Said et al 于 1960 年从猪小肠提取的一个直链 28 肽。VIP 广泛分布于中枢, 外周神经系统和胃肠道肌间, 黏膜下神经丛, 可扩血管, 舒张平滑肌及加强小肠分泌活动。参与肠道的吸收过程, 特别是抑制肠平滑肌的紧张性。VIP 同 NO 一起都是参与肠蠕动调节的重要成分^[35-54]。

最初人们认为在胃肠道运动的调节中, VIP 可能比 NO 更为重要, 但最近的一些研究提示 NO 可能起着更为重要的作用。VIP 阳性神经元胞体主要分布在胃肠道黏膜下丛, 肌间丛则相对较少, 而 NOS 则相反, 在肌间丛非常丰富, 在黏膜下丛非常少^[55]。这一现象提示在胃肠道中主要是 NO 而非以前认为的 VIP 对胃肠运动的调节有更重要的作用。在人反流性胃炎的病历中, 幽门松弛组胃窦局部黏膜 NO 水平高于幽门运动组和幽门闭合组, 而 VIP 的含量在三组之间无显著差异。表明幽门松弛的重要原因可能是局部 NO 分泌而非 VIP 的作用^[56]。

2 在胃肠电-机械活动调节中 NO 与 VIP 的关系

2.1 NOS 与 VIP 共染和递质共存研究 有关 NOS 与 VIP 共染的各家报道并不一致。Lefebvre et al^[57] 纵行肌间的大多数神经元为 NOS 与 VIP 共存。短暂的电刺激主要引起 NO 的释放, 产生短暂松弛, 而较持久的电刺激引起 NO 和 VIP 均释放, 产生持久的松弛。Nicola et al 用 NOS 抑制剂, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 神经元可以代表 NO 能神经元。在鸽子的整个胃肠道都有 NO 分布。在肠肌丛, 环行肌及黏膜下丛明显。于是设想氮能在鸽子胃肠道中属于肌肉调节及抑制性下传神经通路, 并且 VIP 与 NADPH 共存, 增加了这些神经传递者的抑制作用^[58]。Christos balaskas 发现在新孵出的小鸡中, 胃肠全段肠肌丛和黏膜下丛都表达 NADPH, NOS 和 VIP 放射活性。所有的 NADPH 阳性神经元都有 NOS 活性, 反之亦然; 大部分 VIP 阳性神经元也表达 NADPH, 只有少数表达 NADPH 而不表达 VIP。但 VIP 阳性, NADPH 阴性的神经元比例在黏膜下层比肠肌层多^[59]。E. Ekblad 研究显示 NOS 阳性神经末梢, 尤其是在肠环行肌, 常常有 VIP 与之共存^[60]。

目前越来越多的研究趋于支持有少量的 VIP 阳性神经元与 NOS 共染的观点。Keef et al^[61] 认为 NOS 和 VIP 在肠道部分神经元中定位相同, 指出他们是从肠道抑制性神经中释放的共同的神经递质。Vittoria 发现牛的氮能神经元依据其所含化学物质不同分为多个型, 不同类型神经元的大小, 形状, 着色密度都不同。其中有一型神经元 NOS 和 VIP 共存^[62]。Catharina 发现在鳄鱼胃肠道内少量的 NOS 阳性细胞也有 VIP 免疫活性, 而大多数 VIP 阳性细胞有 NOS 免疫活性^[63]。Catharina 还发现在非洲爪蛙的胃肠道中, 一些具有 NOS 免疫活性的纤维也具有 VIP 免疫活性, 但不是所有的 VIP 阳性纤维都表现 NOS 免疫活性^[64]。吴红金 et al 发现在大鼠肌间丛 VIP 阳性神经元胞体与 NOS 神经元胞体之比 1 : 21.5,

其中 19 % 的 VIP 阳性神经元与 NOS 共染, 常常发现 VIP 阳性神经末梢环抱 NOS 阳性神经元胞体。但 VIP 能神经元和 NOS 阳性神经元之间是否存在着突触联系尚需进一步证实^[65]。

对于 NOS 与 VIP 共染的意义目前解释不一, 可以主要分为两种观点: 第一种观点是 NO 不影响 VIP 的释放, NO 也不影响 VIP 的功能。其解释为: 虽然两递质共存于同一细胞, 但功能上是独立的, 是同时从神经细胞中释放出来, 发挥神经递质或调质的作用^[61]。电生理所见是基于整体或组织的, 而共染的细胞只是少数, 所以反映出来的现象并非能代表 NO 与 VIP 共存的意义, 问题的阐明有待于进行单细胞膜片钳技术与单细胞组织化学或免疫组织化学的联合研究。

第二种观点认为 NO 和 VIP 在结构上共染, 在生理功能上可能也有协同作用。从目前的研究成果看, 笔者认为第二种观点更为合理。VIP 和 NO 协同作用的部分机制可能是这样的: VIP 和 NO 共同作为 NANC 神经的抑制性递质, 当 NANC 神经兴奋时, 引起 VIP 释放及 NO 生成增加, NO 及 VIP 又通过相互间的作用更进一步的促进他们自身的生成。在胃平滑肌细胞, 结肠环行肌等部位, VIP 与其特异性受体结合, 诱发一个连锁反应: 钙离子内流的刺激使 NOS 的 Ca^{2+} /钙调蛋白活化, 于是 NO 生成, 鸟苷环化酶活化, cGMP 依赖的蛋白激酶活化; VIP 与其选择性受体结合, 则与 cAMP 依赖的蛋白激酶活化耦连; 蛋白激酶 G 和蛋白激酶 A 均参与 VIP 所致的平滑肌舒张反应。但他们的具体作用过程不十分明了, 可能是增加内质网摄取 Ca^{2+} 或 / 和减少内质网释放 Ca^{2+} , 并减少 Ca^{2+} 内流入细胞, 并改变肌球蛋白轻链激酶的活性以及收缩蛋白对 Ca^{2+} 的敏感性, 从而导致平滑肌舒张。Jin et al^[66] 发现胃环行肌松弛由 VIP 和 NO 介导, NOS 抑制剂 λ -NNA 阻断 NO 生成, 并部分抑制 VIP 释放及肌肉舒张。VIP 拮抗剂 VIP(10-28) (VIP 的 C 端的 19 肽) 部分抑制 NO 生成及舒张。外源性 VIP 也刺激胃肌细胞生成 NO, 增加细胞 cAMP 及 cGMP, 并引起肌肉松弛。

1992 年 Rattan et al^[66] 研究提出肠道肽能神经发挥作用需通过 NO 中介, 或至少部分通过 NO 作为信使而发挥调节胃肠道功能的作用, 并提出了 VIP-NO 轴的概念。Holle et al^[67] 从狗幽门动脉输入 VIP, 可以消除幽门部的收缩, 使用 NOS 抑制剂 L-NNME 并不能影响 VIP 的效应, 但能缩短 VIP 后效应时间。说明 VIP 对幽门的部分作用也是通过 NO 来完成的。所以我们认为对 NO 和 VIP 共染也可以理解为 NO 为终末神经递质, 即 VIP 通过或至少部分通过 NO 起作用, 所以二者会在形态学上有共染现象, 这也体现了结构与功能的统一。

2.2 NO 和 VIP 相互作用的分子生物学研究 为了解决 NO 和 VIP 相互作用机制的争议, 近年也有人在基因水平进行研究。体内合成 NO 的酶有三种: iNOS (诱生型一氧化氮合酶), eNOS (内皮型一氧化氮合酶) 和 nNOS (神

经型一氧化氮合酶). Dick et al 使用 iNOS, eNOS 和 nNOS 基因敲除的小鼠的分离平滑肌细胞和平滑肌条, 观察 NOS 抑制剂对 VIP 松弛效应的影响. 实验中发现敲除 eNOS 和 nNOS 基因的小鼠的分离细胞, VIP 的松弛效应可以被非选择性 NOS 抑制剂 L-NA 和选择性 iNOS 抑制剂 1 400 W 抑制约 70-95%. 而在敲除了 iNOS 基因小鼠的分离细胞中, VIP 仍能引起完全的松弛, 而不受 L-NA 或 1 400 W 的影响. 而基因敲除小鼠的平滑肌条上, VIP 的松弛效应不受 L-NA 或 1 400 W 的影响. 这些结果提示, 实验方法决定了 NOS 抑制剂对 VIP 松弛效应的影响. iNOS(可能是分离细胞过程中诱导产生的)可能与 VIP 引起的分离平滑肌细胞而非平滑肌条的舒张效应有关^[68].

3 NO 和 VIP 在胃肠系统疾病中的共同变化

不但在生理状态下, VIP 和 NO 之间存在着密切关系; 在许多胃肠系统的疾病中 NOS 与 VIP 也出现同升, 同降. 如: 在反流性食管炎患者食管壁黏膜内 NOS 和 VIP 阳性产物与正常组相比均显著增多^[69]. 肠易激综合征患者乙状结肠黏膜内的 NOS 和 VIP 含量, 便秘组高于正常组和腹泻组; 腹泻组略低于正常组^[70]. 在先天性巨结肠病患者的狭窄段结肠壁内均缺失 NOS 和 VIP 神经元胞体; 狭窄段结肠肌层内 NOS 和 VIP 阳性纤维也比“正常”结肠明显减少, 酶活性或免疫反应性也减弱^[71]. 魏春丽也发现小鼠肠型放射病时, NOS 和 VIP 都增加^[72]. 胃液体排空延迟的非溃疡性消化不良患者胃窦壁内 NOS、VIP 阳性神经纤维和末梢明显增多、活性增强^[73]. 在人类 2 型糖尿病小鼠模型中, 糖尿病小鼠与对照组比较在胃窦和十二指肠 VIP 和 NOS 都下降; 而在结肠都无变化^[74].

在胃肠疾病中, NOS 和 VIP 的变化并不总是一致. 本实验室工作实验性脾虚大鼠的结肠中, VIP 降低, 而 NOS 增高. 这也许是机体在疾病状态下, 抑制性神经递质仍能保持相对平衡的表现^[75]. 也有学者发现在糖尿病早期大鼠远端回肠和近端结肠肌间神经丛中 VIP-IP 阳性纤维增多, 而 NOS 阳性神经元和神经纤维数量减少. 其机制值得进一步探讨.

4 可能的临床应用前景和研究方向

NO 和 VIP 都是肠神经系统主要的抑制性神经递质. 产生 NO 的药物如三硝酸甘油酯, 硝普钠等已被证实是在胃肠动力疾病如贲门失弛缓症中的治疗作用. VIP 作为一种胃肠激素, 其激动剂或拮抗剂对治疗胃肠运动疾病也有良好的应用前景.

但值得注意的是 NO 和 VIP 在胃肠道的分布不同, 对胃肠肌肉运动和消化液分泌的调节作用也不同, 所以应针对不同的胃肠疾病选用不同的药物. 还应考虑到二者在胃肠道共存并可能协同作用, 所以应根据病情开发和使用能充分发挥或避免其协同作用的药物. 另外

还应考虑到 VIP 和 NOS 在全身很多系统都有分布, 所以将其作为胃肠系统药物时, 应避免他们对其他系统产生的副作用. 这就要求对二者在胃肠道的作用机制做更深一步的研究, 尤其不应忽视二者相互影响、相互作用的机制. 这必将有利于进一步提高对临床胃肠动力障碍疾病的认识, 以及指导开发针对性强, 副作用小的治疗胃肠动力疾病的药物.

5 参考文献

- 1 Gaumnitz E, Sweet MA, Sengupta A, Singaram C. Nitrinergic and peptidergic innervations and their inter-relationships in human colon. *Neuropeptides* 1995;29:1-9
- 2 Kaye DM, Parnell MM, Ahlers BA. Reduced myocardial and systemic L-Arginine uptake in heart failure. *Circ Res* 2002;91:1198-1203
- 3 Yamashiro S, Kuniyoshi Y, Arakaki K, Miyagi K, Koja K. The effect of insufficiency of tetrahydrobiopterin on endothelial function and vasoactivity. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;50:472-477
- 4 Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002;106:3073-3078
- 5 Bredt DS. Nitric oxide signaling specificity - the heart of the problem. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 1):9-15
- 6 Stumm MM, D' Orazio D, Sumanovski LT, Martin PY, Reichen J, Sieber CC. Endothelial, but not the inducible, nitric oxide synthase is detectable in normal and portal hypertensive rats. *Liver* 2002;22:441-450
- 7 Cotton JM, Kearney MT, Shah AM. Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? *Heart* 2002;88:564-566
- 8 El-Khatib AS. Possible modulatory role of nitric oxide in lung toxicity induced in rats by chronic administration of bleomycin. *Chemotherapy* 2002;48:244-251
- 9 Grasemann H, Storm Van 's Gravesande K, Buscher R, Knauer N, Silverman ES, Palmer LJ, Drazen JM, Ratjen F. Endothelial nitric oxide synthase variants in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:390-394
- 10 Shaul PW, Afshar S, Gibson LL, Sherman TS, Kerecman JD, Grubb PH, Yoder BA, McCurnin DC. Developmental changes in nitric oxide synthase isoform expression and nitric oxide production in fetal baboon lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L1192-1199
- 11 Dai ZK, Tan MS, Chai CY, Chen JJ, Jeng AY, Wu JR. Effects of increased pulmonary flow on the expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in the rat. *Clin Sci (Lond)* 2002;103(Suppl 48):289S-293S
- 12 Rabiller A, Nunes H, Lebec D, Tazi KA, Wartski M, Dulmet E, Libert JM, Mougeot C, Moreau R, Mazmanian M, Humbert M, Herve P. Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:514-517
- 13 Coleman JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* 2002;129:4-10
- 14 Hogman M, Holmkvist T, Walinder R, Merilainen P, Ludviksdottir D, Hakansson L, Hedenstrom H. Increased nitric oxide elimination from the airways after smoking cessation. *Clin Sci (Lond)* 2002;103:15-19
- 15 Flinger JM, Waldvogel AS, Pfister H, Jungi TW. Expression of inducible nitric oxide synthase in spontaneous bovine bronchopneumonia. *Vet Pathol* 1999;36:397-405
- 16 Cucchiario G, Tatum AH, Brown MC, Camporesi EM, Daucher JW, Hakim TS. Inducible nitric oxide synthase in the lung and exhaled nitric oxide after hyperoxia. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 1):L636-644
- 17 Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its

- use to prevent hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Paediatr Suppl* 2002;91:36-42
- 18 Lerouet D, Beray-Berthet V, Palmier B, Plotkine M, Margail I. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2002;958:166-175
- 19 Luth HJ, Munch G, Arendt T. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Res* 2002;953:135-143
- 20 Golikov PP, Nikolaeva NI, Gavrilenko IA, Matveev SB, Davydov BV, Marchenko VV, Smirnov SV, Lebedev VV, Golikov AP. Nitric oxide and lipid peroxidation as factors in endogenous intoxication in emergency states. *Patol Fiziol Eksp Ter* 2000;(2):6-9
- 21 Fatemi SH, Cuadra AE, El-Fakahany EE, Sidwell RW, Thuras P. Prenatal viral infection causes alterations in nNOS expression in developing mouse brains. *Neuroreport* 2000;11:1493-1496
- 22 Welch WJ, Wilcox CS. What is brain nitric oxide synthase doing in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:109-115
- 23 Furness JB, Li ZS, Young HM, Forstermann U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell Tissue Res* 1994;277:139-149
- 24 Liu TH, Robinson EK, Helmer KS, West SD, Castaneda AA, Chang L, Mercer DW. Does upregulation of inducible nitric oxide synthase play a role in hepatic injury? *Shock* 2002;18:549-554
- 25 Malmstrom RE, Bjorne H, Oldner A, Wanecek M, Fredriksson M, Lundberg JO, Weitzberg E. Intestinal nitric oxide in the normal and endotoxemic pig. *Shock* 2002;18:456-460
- 26 Bartho L, Benko R, Lazar Z, Illeenyi L, Horvath OP. Nitric oxide is involved in the relaxant effect of capsaicin in the human sigmoid colon circular muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002;366:496-500
- 27 Kong XY, Liao LM, Lei DL, Huang JF, Wen XD. Influence of lead on activity of nitric oxide synthase in neurons and vessel smooth muscle of small intestine in rats. *Hunan Yike Daxue Xue bao* 2000;25:135-137
- 28 Grisham MB, Pavlick KP, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Wolf RE. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. *J Invest Med* 2002;50:272-283
- 29 Tomita R, Fujisaki S, Ikeda T, Fukuzawa M. Role of nitric oxide in the colon of patients with slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2002;45:593-600
- 30 周吕,柯美云,李在疏. 胃肠动力学 - 基础与临床. 第1版. 科学出版社, 1999;3-13:227-245
- 31 Russo A, Fraser R, Adachi K, Horowitz M, Boeckstaens G. Evidence that nitric oxide mechanisms regulate small intestinal motility in humans. *Gut* 1999;44:72-76
- 32 龙庆林,王振华. 内源性一氧化氮与胃电节律失常关系的实验研究. 第三军医大学学报 2001;23:1065-1067
- 33 金景玉,李哲浩,李贞姬,金正元,金南革,李英,许文燮,李在疏. 一氧化氮对豚鼠胃窦环行肌活动和收缩运动的影响. 中国药理学报 2000;21:369-372
- 34 刘晓秋,李世英,连至诚. 溃疡性结肠炎大鼠大肠一氧化氮产物的检测及意义. 中国肛肠病杂志 1999;19:6-8
- 35 李林,胡道松,王红兵,茹立强. 豚鼠和大鼠小肠内 AChE 和 VIP 阳性神经的分布关系研究 - 酶组织化学与免疫组织化学结合法观察. 同济医科大学学报 1999;28:389-393
- 36 Hockerfelt U, Franzen L, Norrgard O, Forsgren S. Early increase and later decrease in VIP and substance P nerve fiber densities following abdominal radiotherapy: a study on the human colon. *Int J Radiat Biol* 2002;78:1045-1053
- 37 Hill JM, Mehnert J, McCune SK, Brenneman DE. Vasoactive intestinal peptide regulation of nerve growth factor in the embryonic mouse. *Peptides* 2002;23:1803-1808
- 38 Lundberg P, Lerner UH. Expression and regulatory role of receptors for vasoactive intestinal peptide in bone cells. *Microsc Res Tech* 2002;58:98-103
- 39 Hayashi S, Ueda M, Amaya F, Matusda T, Tamada Y, Iyata Y, Tanaka M. Serotonin modulates expression of VIP and GRP mRNA via the 5-HT(1B) receptor in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Exp Neurol* 2001;171:285-292
- 40 Ergun Y, Ogulener N, Dikmen A. Involvement of nitric oxide in non-adrenergic non-cholinergic relaxation and action of vasoactive intestinal polypeptide in circular muscle strips of the rat gastric fundus. *Pharmacol Res* 2001;44:221-228
- 41 Kang H, Byun DG, Kim JW. Effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on interferon-gamma and interleukin-4 production in severe atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:227-232
- 42 Berghorn KA, Li C, Nathanielsz PW, McDonald TJ. VIP innervation: sharp contrast in fetal sheep and baboon adrenal glands suggests differences in developmental regulation. *Brain Res* 2000;877:271-280
- 43 Montpetit CJ, Perry SF. Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated control of catecholamine release from chromaffin tissue in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Endocrinol* 2000;166:705-714
- 44 Gerhold LM, Horvath TL, Freeman ME. Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res* 2001;919:48-56
- 45 Groneberg DA, Springer J, Fischer A. Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:391-401
- 46 Hinson JP, Renshaw D, Carroll M, Kapas S. Regulation of rat adrenal vasoactive intestinal peptide content: effects of adrenocorticotropic hormone treatment and changes in dietary sodium intake. *J Neuroendocrinol* 2001;13:769-773
- 47 Xu CT, Pan BR, Wang YM, Zhang RY. Substance P, vasoactive intestinal peptide and leu-enkephalin in plasma and gastric juice of patients with precancerous lesions and gastric cancer. *China Natl J New Gastroenterol* 1995;1:27-29
- 48 陈芝芸,严茂祥,项柏康,占宏伟. 慢性应激大鼠血和结肠黏膜胃肠激素的变化. 世界华人消化杂志 2001;9:59-61
- 49 巩兰波,王孟春,陈澄,延锦春,姜若兰. 血管活性肠肽对胰腺癌细胞的生长调控. 世界华人消化杂志 2002;10:562-565
- 50 Lu SJ, Liu YQ, Lin JS, Wu HJ, Sun YH, Tan YB. VIP immunoreactive nerves and somatostatin and serotonin containing cells in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 1999;5:541-543
- 51 Zieck AJ, Okrasa S, Kalamarz H, Lakomy M, Kraeling RR. Concentration of neuropeptide Y, galanin, & bgr; -endorphin, vasoactive intestinal peptide and gonadotropin releasing hormone in the hypothalamus of gilts during the estrous cycle. *Neuroendocrinol Lett* 1999;20:397-403
- 52 Baranowska B, Chmielowska M, Radzikowska M, Borowiec M, Roguski K, Wasilewska-Dziubinska E. Effects of neuropeptide Y (NPY), galanin and vasoactive intestinal peptide (VIP) on pituitary hormone release and on ovarian steroidogenesis. *Neuroendocrinol Lett* 1999;20:385-389
- 53 Gozes I, Bassan M, Zamostiano R, Pinhasov A, Davidson A, Giladi E, Perl O, Glazer GW, Brenneman DE. A novel signaling molecule for neuropeptide action: activity-dependent neuroprotective protein. *Ann N Y Acad Sci* 1999;897:125-135
- 54 Brenneman DE, Hauser J, Phillips TM, Davidson A, Bassan M, Gozes I. Vasoactive intestinal peptide. Link between electrical activity and glia-mediated neurotrophism. *Ann N Y Acad Sci* 1999;897:17-26
- 55 吴红金,林传友,曹福元,胡道松,殷光甫,茹立强. 大鼠肠道内 NOS 与 AChE, VIP 阳性神经元的分布关系研究. 中国组织化学与细胞化学杂志 2000;9:187-190
- 56 戴益琛,陈文柳,张忠兵,沈建伟,左秀丽. 一氧化氮和肠血管活性肽对幽门功能的调节及其在胆汁返流中的作用. 临床消化病杂志 2000;12:13-15
- 57 Lefebvre RA, Smits GJ, Timmermans JP. Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br J Pharmacol* 1995;112:2017-2026
- 58 Mirabella N, Lamanna C, Assisi L, Botte V, Cecio A. The relationships of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-d to nitric oxide synthase, vasoactive intestinal polypeptide,

- galanin and vituitary adenylate activating polypeptide in pigeon gut neurons. *Neuroscience Letters* 2000;293:147-151
- 59 Balaskas C, Saffrey MJ, Burnstock G. Distribution and colocalization of NADPH-diaphorase activity, nitic oxide synthase immunoreactivity, and VIP immunoreactivity in the newly hatched chicken gut. *The Anatomical Record* 1995;243:10-18
- 60 Ekblad E, Mulder H, Uddman R, Sundler F. NOS-containing neurons in the rat gut and coeliac ganglia. *Neruropharmacology* 1994;33:1323-1331
- 61 Keef KD, Shuttleworth CW, Xue C, Bayguinov O, Publicover NG, Sanders KM. Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. *Neuropharmacology* 1994;33:1303-1314
- 62 Vittoria A, Costagliola A, Carrese E, Mayer B, Cecio A. Nitric oxide-containing neurons in the bovine gut, with special reference to their relationship with VIP and galanin. *Arch Histol Cytol* 2000;63:357-368
- 63 Olsson C, Gibbins I. Nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract of the estrarine crocodile, *Crocodylus porosus*. *Cell Tissue Res* 1999;296:433-437
- 64 Olsson C. Distribution and effects of PACAP, VIP, nitric oxide and GABA in the gut of the African clawed frog *Xenopus laevis*. *The J Experimental Biol* 2002;205:1123-1134
- 65 Jin JG, Murthy KS, Grider JR, Makhlof GM. Activation of distinct cAMP-and cGMP-dependent pathways by relaxant agents in isolated gastric muscle cell. *Am J Physiol* 1993;264:G470-G477
- 66 Rattan S, Chakder S. Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* 1992;262:G107-112
- 67 Holle GE, Steinbach E, Wunsch E, Holst JJ. Effect of 17-norleucine-VIP on gastroduodenal motility relative to serum VIP concentration and blockade of NOS. *Am J Physiol* 1995;269:133-143
- 68 Dick JM, Van Molle W, Brouckaert P, Lefebvre RA. Relaxation by vasoactive intestinal polypeptide in the gastric fundus of nitric oxide synthase-deficient mice. *J Physiol* 2002;538:133-143
- 69 于风海, 李兆申, 许国铭, 倪灿荣, 邹多武, 孙振兴, 屠振兴, 龚燕芳. 反流性食管炎患者食管壁内 NO 能、VIP 能神经的改变和相互关系. *解放军医学杂志* 2000;25:330-333
- 70 谢勇, 黄缘, 王崇文, 祝金泉, 张昆和, 黄德强, 陈江. 肠易激综合征乙状结肠黏膜内胃肠激素及一氧化氮的变化. *中国内镜杂志* 1997;3:17-18
- 71 曹福元, 胡道松, 殷光甫, 夏谷良, 王果, 茹立强. 先天性巨结肠病 NOS 阳性神经和 VIP 能神经的异常改变 - 酶组织化学与免疫组织化学联合法的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 1996;5:450-454
- 72 魏春丽, 马海昕, 范风云, 王志祥. 小鼠肠型放射病时小肠壁肥大细胞的动态变化及其与一氧化氮的关系. *第四军医大学学报* 1998;19:80-83
- 73 余跃, 侯晓华, 茹立强, 曹福元, 刘永革, 谢小平. 非溃疡性消化不良患者胃窦壁内 NO 能、VIP 能神经与胃排空关系的研究. *中华消化杂志* 1998;18:291-294
- 74 Spangeus A, El-Salhy M. Myenteric plexus of obese diabetic mice (an animal model of human type 2 diabetes). *Histol Histopathol* 2001;16:159-165
- 75 孟晓, 曲瑞瑶, 李梦燕, 刘学宗. 大鼠实验性脾虚证结肠电 - 机械活动及其与一氧化氮合酶的关系. *中国中西医结合杂志* 2001;21:69-70

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

• 消息 •

世界华人消化杂志获得 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)

TK基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展

刘占奎, 张超

刘占奎, 张超, 中国人民解放军第三军医大学西南医院普外科 重庆市 400038
全军医学科学研究十五重点课题, No.01Z069
项目负责人: 张超, 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普外科.
电话: 023-65399044
收稿日期: 2002-10-17 接受日期: 2002-11-16

摘要

胃癌是我国人群中发病率和死亡率均占第一位的恶性肿瘤, 近年来大肠癌的发病率呈明显上升趋势. 胃肠道肿瘤的治疗以手术治疗为主, 同是辅以化疗, 但化疗对肿瘤非特异性, 敏感性低, 全身副作用大, 效果欠佳, 5 a 生存率在 50% 左右. 肿瘤的基因治疗是近年来研究的热点, 尤其是 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究取得了令人瞩目的成就, 本文收集国内外近期文献, 就 TK 基因的作用机制、载体、靶向性表达、旁观者效应以及其在胃肠道肿瘤的应用进行了综述.

刘占奎, 张超. TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11(7):1064-1067

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1064.asp>

0 引言

“自杀基因治疗”作为一种新兴的基因治疗方法, 是众多基因治疗策略中效果最明显、最有前途的策略之一^[1-17]. 该疗法是利用基因工程技术, 将一些病毒或细菌基因组中前药转换酶基因(也叫自杀基因)导入肿瘤细胞, 该基因编码特殊的酶, 可将原先对哺乳动物细胞无毒性的前药, 在肿瘤细胞中代谢为毒性产物, 从而引起这些细胞的死亡, 所以又称为“病毒导向的酶解前药疗法”或“分子化疗”. 目前应用的自杀基因前药系统主要有以下几种^[18]: (1) 丙氧鸟苷 / 胸腺嘧啶脱氢酶系统(GCV/HSV-TK); (2) 5-氟胞嘧啶 / 胞嘧啶脱氨酶系统(5-FC/CD); (3) 6-巯基嘌呤 / 黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶系统(6TX/GPT); (4) 丙氧鸟苷 / 潮霉素磷酸转移酶 - 胸腺嘧啶脱氢酶融合蛋白系统(GCV/hytk); (5) 6-甲基嘌呤 - 2-脱氧核糖核苷酸 / 嘌呤核苷酸磷酸酶系统(Mep-DR/PNF); (6) 环磷酰胺 / 细胞毒素 P⁴⁵⁰2B1 系统(CPA/cyt P⁴⁵⁰2B1). 其中研究最深入、应用最广泛的是 GCV/HSV-TK 和 5-FC/CD^[19].

1 作用机制

TK 基因编码胸苷激酶, 该酶可将核苷类似物(NA)代谢为二磷酸化物, 后者在细胞内酶的作用下生成有毒的

三磷酸化物而发挥抗肿瘤作用. TK 酶能选择性地使抗病毒药物 GCV 磷酸化成为单磷酸化产物, 并在细胞内磷酸激酶的作用下, 形成三磷酸产物, 干扰、阻断 DNA 的正常合成和细胞增生^[20-24]. 病毒、细菌、哺乳动物细胞中均含有 TK 基因, 但不同来源的 TK 基因结构及蛋白产物的理化性质、生物功能有明显的差异. 在肿瘤的治疗中以 HSV-TK 和 VZV-TK 最为常用. 早在 1979 年人类就已经克隆出 HSV-TK 基因序列, HSV-TK 编码区共 1 128 个核苷酸, 编码 376 个密码子, 基因中无内含子, 其转录起始部有 107 个核苷酸的非翻译区. 用于 HSV-TK 基因治疗的前药有两类, 一是嘌呤核苷类似物, 包括 ACV 及其衍生物 GCV、PCV、BCV. 其中 GCV 对转基因瘤细胞的抑制作用比 ACV 强 100 倍, 故成为目前肿瘤 TK 基因治疗中最常用的前药^[25]. 另一类是嘧啶核苷类似物, 包括 BVDU、BVFL、ZVDL 等. 研究表明: BVDU 对哺乳动物细胞无毒性, 而其代谢产物可引起 DNA 合成受阻, 导致细胞死亡.

2 TK 基因治疗的载体

基因治疗的关键之一是如何将外源基因导入相应靶细胞并获得安全、有效的表达. 常用的基因转移方法可分为两类, 一类是非病毒载体介导的基因转移技术, 包括电穿孔技术、离子轰击基因转移技术(基因枪)、显微注射技术、DNA 直接注射术、脂质体介导的基因转移和受体介导的基因转移等. 在自杀基因治疗中, 利用脂质体包裹的目的基因转导有较多的报道. 由于脂质体对人体无毒, 无致瘤性, 易于大量制备, 有望成为一种较为理想的载体. 另一类为病毒介导的基因转移技术, 相对于非病毒而言, 其转染率高, 易于改造和操作, 且病毒基因组以转座子的方式整合, 其基因组不发生重排, 外源基因不会受影响. 在自杀基因治疗中, 经常使用的有逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等.

2.1 逆转录病毒(Retrovirus) 是人类基因治疗研究中使用最多的病毒, 该病毒为单链 RNA 病毒, 其特征是只转染处于分裂期的细胞, 且其基因能稳定地整合入宿主细胞染色体, 逆转录病毒转染宿主细胞时, 依赖被膜蛋白与细胞表面受体结合后穿透进入细胞质内, 在胞质中, 逆转录酶被激活, 以病毒 RNA 为模板逆转录为互补的 DNA, 再由依赖 DNA 的 DNA 聚合酶作用形成双链前病毒 DNA, 后者转运进入细胞核, 最终整合入宿主细胞染色体基因组内. 有人将 TK 基因逆转录病毒载体的包装细胞直接注射到小鼠结肠癌肝

转移灶, 辅以 GCV 治疗后, 瘤体明显缩小, 残余癌组织呈现大量纤维化. 逆转录病毒较突出的优势是他可以有效地整合入靶细胞基因组, 并稳定持久地表达所带的外源基因. 病毒基因组以转座子的方式整合, 其基因组不发生重排, 外源基因不会受影响. 近几年来, 人们在增强逆转录病毒的靶向性方面做了许多尝试, 并取得了一定成果. 逆转录病毒的宿主范围由病毒颗粒表面的包被蛋白(Env)决定, Env 来自何种病毒, 包装出的逆转录病毒颗粒就叫该病毒的假病毒(pseudotype). 通过改变 Env 蛋白可以改善载体细胞靶向性. 如用水泡性口炎病毒的 G 蛋白包装逆转录病毒基因组产生假病毒, 可以拓展逆转录病毒的靶细胞范围并赋予病毒颗粒新的特性^[9].

2.2 腺病毒载体(Adenovirus) 也是转基因治疗中较常用的一种有效运载工具. 他的宿主范围广, 分裂和非分裂细胞均能感染. 与逆转录病毒家族载体不同, 腺病毒基因组不能整合到宿主细胞基因组中, 而是以附加体的形式存在, 不随宿主细胞分裂而复制, 是典型的一过性表达(transient expression)载体, 治疗中有时需要反复转导. 这一特性对于免疫基因治疗来说是非常有利的, 用腺病毒载体将不会导致象能整合的载体那样, 使用后出现对免疫系统持久的刺激^[26]. 目前人们已构建出了删除病毒基因中, 所有开放阅读框架的新型重组腺病毒第三代腺病毒载体, 他仅含有必要的顺式元件(也就是 ITR 和邻近的包装信号序列). 需要在辅助病毒存在情况下, 在包装细胞中繁殖, 其安全性很高. 另外, 这种新一代腺病毒载体不但可容纳较大的外源基因(32 kb), 而且较容易获得高滴度(10⁹ cfu/mL). 现已成功地利用这种新型重组病毒, 将治疗基因转至血友病动物的体细胞中, 活性表达已持续数月^[27,28].

2.3 腺相关病毒(adeno associated virus, AAV) 在应用上较逆转录病毒和腺病毒要晚. 他属于细小病毒科, 是动物病毒中最小的一种, 基因组长 4.675 kb, 两侧是 145 kb 长的倒转末端重复序列(ITR), 其中外侧的 125 个核苷酸呈发夹结构, 在复制时有弱启动子作用.

3 靶向性表达

肿瘤自杀基因治疗研究的最终目的是用于临床, 其关键的一步是要求自杀基因准确、特异地表达于肿瘤局部, 避免进入正常组织细胞中而引起不良反应. 目前所用的靶向方法主要有靶向性转导和靶向性转录两种方式. (1) 靶向性转导: 普通病毒载体和脂质体等导入外源基因的方法都缺乏组织细胞特异性, 如果使这些载体表面带上肿瘤细胞特异性的识别分子, 通过这些分子引导载体到达特定肿瘤细胞, 从而将所携带动外源基因带入细胞内, 这方面的工作正在开展, 有可能为肿瘤基因治疗提供有效的基因靶向性载体. (2) 靶向性转录: 通过肿瘤组织特异性的调控元件与自杀基因相连接, 实现自杀基因靶向性表达, 辅以前药治疗后, 使肿瘤

环境中浓集毒性产物, 从而增强抗癌效果. Tanaka et al^[29] 将 HSV-TK 基因置于 CEA 启动子的下游, 用重组腺病毒载体转染结肠癌细胞株 MKN15 及胃癌细胞株 MKN28, 结果表明 TK 基因仅在 CEA 阳性细胞中表达, 增加癌细胞对 GCV 的敏感性, IC₅₀ 从 300 mmol/L(对亲本细胞) 下降到 2.1-5.8 mmol/L(对转基因细胞).

4 旁观者效应

早在 1986 年 Moolten et al^[30] 就观察到这一效应, 他将转导 TK 基因的纤维肉瘤细胞和非转导细胞混合培养, 发现 GCV 能杀灭大部分混合细胞. 随后许多人都在体外培养细胞和活体内肿瘤实验中观察到这一效应, 并命名为旁观者效应(bystander effect). Lechanteur et al^[31] 用逆转录病毒携带 HSV-TK 基因治疗 bd-ix 鼠结肠癌 DHD/K12 细胞腹膜种植瘤, 体外发现稳定表达 TK 基因的 DHD/K12 细胞被低浓度的 GCV 杀死. 旁观者效应是指在肿瘤自杀基因治疗过程中, 不仅已转染自杀基因的肿瘤细胞被杀死, 并且邻近的未转染自杀基因的肿瘤细胞也被杀死. 正是由于旁观者效应, 弥补了目的基因转染效率不高的缺点, 明显增加了抗肿瘤效果. 目前研究认为, 旁观者效应的机制主要是间隙连接信息交流(GJIC)、凋亡机制和免疫机制^[31]. (1) GJIC: 间隙连接是相邻细胞间由连接蛋白(connexin Cx)组成的通道, 每 6 个哑铃型的连接蛋白亚单位 Cx 组成一个连接子(connexin), 相邻两个细胞间的连接子相连形成间隙连接通道, 离子、小分子物质可通过该通道, 达到相邻细胞间的信息交流, 协调细胞间的功能^[32]. (2) 凋亡机制: 转基因细胞死亡后释放凋亡小体, 被周围细胞吞噬而引起凋亡, 通过阻断凋亡小体的转移可抑制旁观者效应. (3) 免疫机制: 通过激活免疫机制增强抗肿瘤作用, 表达外源基因的肿瘤细胞增强了自身的免疫原性, 同时体内通过释放细胞因子(IL-6 等), 或导入免疫相关因子 IL-2、IL-12、IFN、TNF 等, 以增强或诱发机体抗肿瘤免疫反应. 研究证实, 经基因治疗的瘤体内可见大量的 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞浸润^[33].

5 TK 基因应用于胃肠道肿瘤治疗

自从 1986 年 Moolten 首先应用 TK 基因进行肿瘤治疗研究以来, 该基因已被广泛用于各系统肿瘤治疗研究. 美国等国家正式批准该基因进入临床治疗肿瘤, 包括肝癌、黑色素瘤、前列腺癌、脑胶质瘤等. 现将 TK 基因在胃肠道肿瘤方面的研究综述如下.

5.1 胃癌 王毅 et al^[35] 应用 PA 317 细胞包装的逆转录病毒介导的 HSV-TK 基因系统, 转染 MKN28 人胃癌细胞株, 并观察 GCV 对转染 TK 基因的 MKN28 胃癌细胞的杀死作用, 结果显示: 逆转录病毒介导的 HSV-TK 基因系统对人胃癌细胞有较高的转染率, GCV 对转染阳性的胃癌细胞有显著的杀死作用. Yoshida et al^[36] 用逆转录病毒携带 HSV-TK 基因经脂质体包裹后转导人胃癌

细胞株 TMK-1, 给予不同浓度(0.1-100 mg/L)的 GCV 治疗, 转基因癌细胞(TMK TK)均有死亡, 并呈现时间剂量依赖关系, 将 1×10^6 个 TMK TK 细胞接种到 Bal b/c 裸小鼠皮下, 2 wk 后腹腔注射 GCV(20 mg/kg·d \times 14 d), 结果实验组中 13 只动物有 12 只瘤体直径由治疗前平均 65 mm 减少到 <1 mm, 取得了满意的疗效. Tanaka et al^[29,37]将癌胚抗原(CEA)启动子与 TK 基因相接, 构建特异性嵌合基因 pCEA/Tk, 用腺病毒载体将其导入 CEA 分泌型胃癌细胞株 MKN28 及 MKN45 和 CEA 非分泌型细胞 MKN1, 发现 GCV 对前两种细胞的半数抑瘤浓度(IC₅₀)分别为 21 mg 及 58 mg, 并发现有明显的旁观者效应(bystander effect), 而对 MKN1 的 IC₅₀ 则大于 300 mg. 随后将 2×10^6 个 MKN45 细胞接种到裸鼠皮下, 第 3 天瘤体直径达 3-4 mm, 将腺病毒载体直接注入瘤体, 经 GCV 作用后, 发现 TK 基因选择性表达于 30% 左右 CEA 阳性癌细胞, 瘤体生长明显受限. 郭善禹 et al^[32]应用逆转录病毒转导自杀基因 TK, 应用脂质体方法转导细胞因子基因 Mgm-CSF. 结果显示, 20% 的转 TK 基因可以杀伤 70-80% 以上的肿瘤细胞, 即表现了强大的“旁观者效应”.

5.2 大肠癌 于波 et al^[38]用腺病毒介导 HSV-TK 基因和人野生型 p53 基因共转染 SW837 直肠癌细胞, 该细胞 p53 基因第 248 密码子发生了突变, 结果显示, 突变的 p53 可促进肿瘤细胞的增生, 对抗 HSV-TK/GCV 的杀伤作用, 转染野生型 p53, 一方面发挥正常 p53 的癌功能, 对抗突变 p53, 同时也增强了 HSV-TK/GCV 的效能, 还表现了强大的“旁观者效应”.

6 联合基因治疗

将自杀基因与其他的目的基因联合应用以求增强疗效, 获得最佳抗肿瘤效果, 其中以自杀基因与细胞因子基因、放射线联合应用最为常见. Chen et al^[39]用携带 TK 基因及 mIL-2 基因的重组腺病毒载体直接注射入小鼠结肠癌的肝转移灶, 同时辅助以 GCV 治疗, 发现联合 HSV-TK/ mIL-2 基因或 HSV-TK/ Mgm-CSF 与单独使用 HSV-TK 比较, 残留瘤体明显缩小(P < 0.05). 并诱导出对远处接种瘤块显著的系统免疫反应, 抑制野生型细胞继发接种时的成瘤能力, 此免疫力与肿瘤细胞特异性 CD8⁺ 细胞的存在有关. 并且发现小鼠体内产生的抗肿瘤免疫更持久, 明显延长荷瘤动物的生存期. 顾琴龙 et al^[40]用 TK 基因联合 mIL-2/mGM-CSF 基因治疗小鼠模型胃癌, 得出了同样的结果.

总之, 肿瘤自杀基因治疗作为一种全新的肿瘤治疗手段, 已经进行了大量的细胞学和动物实验研究, 并且取得了可喜的成绩, 但要自杀基因用于临床治疗, 还有大量的工作要做, 今后的研究应寻找更多、更有效的自杀基因、构建更为有效的靶向性载体、提高基因靶向转染效率、选择简便实用的治疗策略、建立合理搭配的联合基因治疗方案等. 相信随着关键技术和一些问题

的逐步解决, 我们将能从各个方面更加精确地调控自杀基因的治疗, 自杀基因可以在治疗胃肠道肿瘤以及其他恶性肿瘤方面作出特殊的贡献.

7 参考文献

- 1 Wadhwa PD, Zielske SP, Roth JC, Ballas CB, Bowman JE, Gerson SL. Cancer gene therapy: scientific basis. *Annu Rev Med* 2002;53:437-452
- 2 Otsu M, Wada T, Candotti F. Gene therapy for primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:497-501
- 3 Cupp CL, Bloom DC. Gene therapy, electroporation, and the future of wound-healing therapies. *Facial Plast surg* 2002;18:53-57
- 4 Yamaoka T, Itakura M. Gene therapy for diabetes mellitus. *Curr Mol Med* 2001;1:325-327
- 5 Seto M, Yamazaki T, Sonoda J, Matsumine A, Shinto Y, Uchida A. Suppression of tumor growth and pulmonary metastasis in murine osteosarcoma using gene therapy. *Oncol Rep* 2002;9:337-340
- 6 Enlgemann C, Heslan JM, Fabre M, Lagarde JP, Klatzmann D, Panis Y. Importance, mechanisms and limitations of the distant bystander effect in cancer gene therapy of experimental liver tumors. *Cancer Lett* 2002;179:59-69
- 7 Okada Y, Okada N, Nakagawa S, Mizuguchi H, Kanehira M, Nishino N, Takahashi K, Mizuno N, Hayakawa T, Mayumi T. Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors. *Cancer Lett* 2002;177:57-63
- 8 Ruiz J, Mazzolini G, Sangro B, Qian C, Prieto J. Gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2001;19:324-332
- 9 Li S, Xia X, Zhang X, Suen J. Regression of tumors by IFN-alpha electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array. *Gene Ther* 2002;9:390-397
- 10 Manninen HI, Makinen K. Gene therapy techniques for peripheral arterial disease. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2002;25:98-108
- 11 Adachi O, Nakano A, Sato O, Kawamoto S, Tahara H, Toyoda N, Yamato E, Matsumori A, Tabayashi K, Miyazaki J. Gene transfer of Fc-fusion cytokine by in vivo electroporation: application to gene therapy for viral myocarditis. *Gene Ther* 2002;9:577-582
- 12 Johnson-Saliba M, Jans DA. Gene therapy: optimising DNA delivery to the nucleus. *Curr Drug Targets* 2001;2:371-399
- 13 Baum BJ, Kok M, Tran SD, Yamano S. The impact of gene therapy on dentistry: a revisiting after six years. *J Am Dent Assoc* 2002;133:35-44
- 14 Havlik R, Jiao LR, Nicholls J, Jensen SL, Habib NA. Gene therapy for liver metastases. *Semin Oncol* 2002;29:202-208
- 15 Li YM, Okegawa T, Lombardi DP, Frenkel EP, Hsieh JT. Enhanced transgene expression in androgen independent prostate cancer gene therapy by taxane chemotherapeutic agents. *J Urol* 2002;167:339-346
- 16 Rieger PT. The role of oncology nurses in gene therapy. *Lancet Oncol* 2001;2:233-238
- 17 Ohana P, Bibi O, Matouk I, Levy C, Birman T, Ariel I, Schneider T, Ayesh S, Giladi H, Laster M, De Groot N, Hochberg A. Use of H19 regulatory sequences for targeted gene therapy in cancer. *Int J Cancer* 2002;98:645-650
- 18 范应方, 黄宗海. 结肠癌基因治疗研究进展. *世界华人杂志* 2001;9:427-430
- 19 徐克成, 吴建文. 消化系统癌肿的自杀基因疗法. *世界华人消化杂志* 1997;7:679-684
- 20 Princen F, Lechanteur C, Lopez M, Gielen J, Bours V, Merville MP. Similar efficiency of DNA-liposome complexes and retrovirus-producing cells for HSV-tk suicide gene therapy of peritoneal carcinomatosis. *J Drug Target* 2000;8:79-89
- 21 Floeth FW, Shand N, Bojar H, Prissack HB, Felsberg J, Neuen-

- Jacob E, Aulich A, Burger KJ, Bock WJ, Weber F. Local inflammation and devascularization--in vivo mechanisms of the "bystander effect" in VPC-mediated HSV-Tk/GCV gene therapy for human malignant glioma. *Cancer Gene Ther* 2001;8:843-851
- 22 Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumour regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Research* 1993;53:5274-5283
- 23 Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA. In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Research* 1993;53:4619-4626
- 24 Crystal R, Hirschowitz E, Lieberman M, Daly J, Kazam E, Henschke C, Yankelevitz D, Kemeny N, Silverstein R, Ohwada A, Russi T, Mastrangeli A, Sanders A, Cooke J, Harvey BG. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the E. coli cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Human Gene Therapy* 1997;8:985-1001
- 25 Carrio M, Mazo A, Lopez-Iglesias C, Estivill X, Fillat C. Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thmidine kinase and connexin 26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy. *Int J Cancer* 2001;94:81-88
- 26 Addison C, Brociak T, Ralston R, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL. Intratumoural injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8522-8526
- 27 Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL, Kayda DB, Pinkstaff AM, Kaloss M, Tinlin S, Cameron C, Notley C, Hough C, Lillicrap D, Kaleko M, Connelly S. In vivo evaluation of an adenoviral vector encoding canine factor VIII: high-level, sustained expression in hemophilic mice. *Hum Gene Ther* 1999;10:1791-1802
- 28 Sandig V, Youil R, Bett AJ, Franlin LL, Oshima M, Maione D, Wang F, Metzker M, Savino R, Caskey CT. Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in virvo. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:1002-1007
- 29 Tanaka T, Kanai F, Lan KH, Ohashi M, Shiratori Y, Yoshida Y, Hamada H, Omata M. Adenovirus-mediated gene therapy of gastric carcinoma using cancer-specific gene expression in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:775-779
- 30 Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer RES* 1986;46:5276-5281
- 31 Lechanteur C, Princen F, Lo Bue S, Dertoz B, Fillet G, Gielen J, Bours V, Merville MP. HSV-1 thymidine kinase gene therapy for colorectal adenocarcinoma-derived peritoneal carcinomatosis. *Gene Ther* 1997;4:1189-1194
- 32 郭善禹, 顾琴龙, 朱正纲, 尹浩然, 林言箴. TK 基因 /9- 丙氧鸟苷联合 mGm - CSF 基因治疗胃癌. *中华实验外科杂志* 2000;17:297-299
- 33 Tanaka T, Yamasaki H, Mesnil M. Stimulation of intercellular communication of poor-communicating cells by gap-junction-competent cells enhances the HSV-TK/GCV bystander effect invitro. *Int J Cancer* 2001;91:538-542
- 34 Agard C, Ligeza C, Dupas B, Izembart A, El Kouri C, Moullier P, Ferry N. Immune-dependent distant bystander effect after adenovirus-mediated suicide gene transfer in a rat model of liver colorectal metastasis. *Cancer Gene Ther* 2001;8:128-136
- 35 王毅, 胡志前, 徐学俊, 王元和, 王强, 孔宪涛. 逆转录病毒介导的 HSV - TK 基因系统对人胃癌细胞的转染及杀伤作用. *第二军医大学学报* 2001;22:328-330
- 36 Yoshida K, Kawami H, Yamagnchi Y, Kuniyasu H, Nishiyama M, Hirai T, Yanagihara K, Tahara E, Toge T. Retrovirally transmitted gene therapy for gastric carcinoma using herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer* 1995;75:1167-1471
- 37 Tanaka T, Kanai F, Okabe S, Yoshida Y, Wakimoro H, Hamada H, Shiratori Y, LanK I, Shitobi M, Omata M. Adenovirus mediated prodrug gene therapy for carcinoma embryonic antigen producing human gastric carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1996; 56:1341-1345
- 38 于波, 李世拥, 安萍, 陈钢, 蔡惠云, 郭文华. 腺病毒介导 HSV - tk 联合野生型 p53 基因对直肠癌细胞的杀伤作用. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2001;8:69
- 39 Chen SH, Kosai K, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, Woo LC. Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 1996;56:3758-3762
- 40 顾琴龙, 郭善禹, 朱正纲, 尹浩然, 林言箴. TK 基因联合白介素 - 2 / 粒、巨噬细胞集落刺激因子基因治疗胃癌的实验研究. *中华消化杂志* 2001;21:138-141

自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用

陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎

陶惠, 朱道银, 重庆医科大学病原微生物教研室 重庆市 400042
邹全明, 毛旭虎, 中国人民解放军第三军医大学临床微生物和免疫学教研室 重庆市 400038
项目负责人: 陶惠, 400042, 重庆市渝中区, 重庆医科大学病原微生物教研室.
taohui6@yahoo.com.cn
电话: 023-65426343
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-10-21

摘要

Hp 胃部感染使中性粒细胞、巨噬细胞在胃黏膜聚集、激活并导致大量自由基释放。Hp 由于拥有自身 katA、SOD 等抗氧化酶系, 能有效解除自由基的毒性作用。但 Hp 感染所致的大量自由基生成在胃黏膜损害及胃癌发生中起重要作用, 自由基一方面导致胃黏膜细胞损伤、坏死形成溃疡, 另一方面使胃黏膜细胞增生/凋亡失衡、DNA 损害, 从而诱发胃癌。虽然抗氧化剂治疗 Hp 相关胃病目前多数集中在动物模型研究, 但却开辟了 Hp 相关胃病治疗的新思路, 将成为重要辅助治疗手段。

陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎. 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(7):1068-1072
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1068.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(Hp)感染是慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌发生的重要原因。但 Hp 的确切致病机制目前尚不完全清楚。近年来的研究表明, 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中起重要作用。本文就该方面的研究进展做一简要综述。

1 自由基的主要来源

Hp 进入胃内后, 首先通过其黏附素如 N-乙酰神经氨酸乳糖结合原纤维血凝素(HpaA)、胞外酶 S 样黏附素、Lewis B 血型抗原结合黏附素等黏附于胃上皮细胞^[1-4]。随后, Hp 释放细胞空泡毒素(VacA)、细胞毒相关蛋白以及中性粒细胞激活蛋白(HP-NAP)等白细胞趋化因子, 导致白细胞在胃黏膜浸润并激活^[4-8]。另一方面, Hp 黏附于胃上皮细胞后, 刺激其分泌白介素 8(IL-8)^[9,10]。他也是一种强有力的白细胞趋化因子, 可促进胃黏膜白细胞浸润和激活。大量的病理检验结果表明, Hp 感染后胃黏膜内白细胞数量明显增多, 包括中性粒细胞、单核细胞与淋巴细胞。淋巴细胞激活可分泌抗体, 参与局部黏膜体液免疫反应。中性粒细胞与巨噬细胞是机体细胞免疫的主要执行者, 被 Hp 感染后释放的 Hp-NAP 等趋化因子激活, 通过 MAPK、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol

3-kinase, PI3-K)等一系列信号通路, 促进 NADPH 氧化酶的聚集、装配, 同时激活黄嘌呤氧化酶, 最终导致大量氧自由基产生^[11,12]。大量研究结果表明, Hp 感染患者胃黏膜丙二醛(MDA)与脂质过氧化物(LPO)明显升高, 并与中性粒细胞及巨噬细胞浸润数量呈显著正相关。说明 Hp 感染后自由基主要来源是胃黏膜内中性粒细胞及巨噬细胞的呼吸爆发。其次, Hp 自身也可产生自由基, 并可直接导致共培养的胃癌细胞损害, 但有关机制尚不清楚^[13,14]。

最近研究还发现, 伴有 Hp 感染的消化性溃疡活动期患者, 血浆、胃液及胃黏膜组织的 NO 水平明显高于愈合后患者, 随着 Hp 根除, NO 水平明显降低, 表明 NO 可能在 Hp 相关胃病发病中起一定作用。进一步研究表明, 幽门螺杆菌感染时胃黏膜一氧化氮合酶(NOS)活性升高是导致 NO 合成增多的主要原因^[15,16]。其实质是胃黏膜浸润的中性粒细胞与巨噬细胞 NOS 激活。NO 是一种极不稳定分子, 可与氧自由基反应产生氮过氧化物阴离子(ONOO⁻), 它具有比 NO 和氧自由基更强的细胞毒性^[17]。所以 NO 也是一定意义上的自由基。

2 自由基与胃黏膜损伤

Hp 感染主要通过局部作用致病。定植于胃黏膜的幽门螺杆菌释放趋化因子, 导致大量中性粒细胞和巨噬细胞浸润。他们作为机体重要的免疫细胞, 其主要作用是通过呼吸爆发和脱颗粒杀灭病原体。这本是机体正常的免疫反应。但激活失控的中性粒细胞和巨噬细胞会大量释放氧自由基和多种蛋白水解酶, 破坏组织细胞, 造成炎症损伤, 甚至使黏膜炎症迁延和慢性化。

自由基是一类具有不成对电子的原子或分子, 化学性质异常活跃。机体内许多生物化学反应都会产生自由基, 但体内同时存在多种自由基清除剂可避免自由基对组织和细胞的氧化损害, 包括维生素 C、E 及谷胱甘肽、超氧化物歧化酶(SOD)等。Hp 感染后胃内自由基生成异常增多, 大量消耗自由基清除剂, 使组织、细胞抗氧化损害能力减弱^[18,19]。Beil et al^[20]报道, Hp 自身释放的自由基可使胃上皮细胞内谷胱甘肽含量明显降低。过多自由基导致胃上皮细胞脂质、蛋白质过氧化, 损害细胞结构和功能。Fosslien et al^[21]研究指出, Hp 介导的自由基生成可损害胃上皮细胞线粒体膜结构并使呼吸酶活性降低, 线粒体氧化磷酸化脱耦联。Hahm et al^[22]将胃黏膜细胞置于次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶反应体系中, 用标记在胃黏膜细胞上的⁵¹Cr 释放检测氧自由基

的细胞毒作用. 结果表明, 胃黏膜细胞出现自由基剂量依赖性毒性损害与脂质过氧化. 在人体实验进一步证实, Hp 感染患者胃黏膜损害程度与黏膜自由基含量呈明显正相关. 抗氧化药物治疗后, 胃黏膜活检组织自由基含量下降, 同时胃黏膜损害减轻^[23].

3 自由基与胃癌

幽门螺杆菌感染是胃癌发生的因素之一, 世界卫生组织已将其列为 I 类致癌因子. 但迄今为止, 有关其确切机制尚未完全明了. 目前主要提出两种可能机制: (1) 胃上皮细胞增生与凋亡失衡; (2) 上皮细胞 DNA 损伤. 长期 Hp 感染导致的胃黏膜内自由基大量生成不仅通过细胞毒作用导致细胞损伤, 还可通过生长、死亡信号的转导参与上皮细胞的增生、凋亡以调控炎症的发展. 同时细胞 DNA 损伤也可由自由基导致. 自由基在上述两种机制中均起重要作用.

3.1 自由基对胃黏膜细胞增生、凋亡的影响 众所周知, 高浓度自由基具有强烈的细胞毒作用. 但新近研究表明, 较低浓度的自由基对细胞增生具有促进作用. 李芸 et al^[24]报道, 小剂量超氧阴离子可诱使肝卵圆细胞增生、转化. 仲崇霞 et al^[25]研究发现低浓度的过氧化氢能促进 NIH3T3 细胞增生, 使其 MTT 计数增加、细胞周期 S 期比例增高、DNA 合成率增加. Hp 感染后胃黏膜上皮增生较未感染者明显加强, 根除 Hp 后细胞增生指数及细胞核抗原下降. 其机制可能与胃黏膜内自由基的不均匀分布有关. 在 Hp 感染部位, 白细胞浸润数量多, 自由基浓度高, 造成胃上皮细胞严重损害; 而在其周边部位, 自由基生成数量少或仅是由于自由基的弥散作用, 自由基浓度较低, 刺激胃黏膜上皮增生.

Hp 感染与细胞凋亡的研究首先由 Moss 报道, 他在研究中发现 Hp 阳性的十二指肠溃疡患者胃上皮存在大量凋亡细胞, 而 Hp 阴性的非溃疡性消化不良患者, 凋亡细胞少见, 根除 Hp 后细胞凋亡指数降为正常^[26]. 随后, 大量研究证实了 Hp 感染对胃黏膜上皮细胞凋亡的诱导作用. 但有关机制目前尚无定论. Hp 感染时胃黏膜内自由基大量生成. 自由基是目前公认的促凋亡因子, 通过介导细胞线粒体通透性转换 (mitochondrial permeability transition, MPT) 释放细胞色素 c 与凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF). 此二者均可直接或间接激活半胱氨酸 - 门冬氨酸特异蛋白酶 (caspase) 和核酸酶, 导致细胞凋亡^[27-30]. Betten et al^[31]研究发现幽门螺杆菌可释放一种天蚕抗菌肽样多肽 Hp(2-20), 对单核细胞具有趋化及激活作用, 并活化其 NADPH 氧化酶产生氧自由基, 诱导胃黏膜淋巴细胞凋亡. Lim et al^[17]研究表明, Hp 感染激活 NF- κ B 并介导 iNOS 激活, 使 NO 生成增加. 如前所述, NO 是一种氮中心自由基, 他可导致胃黏膜细胞凋亡^[32,33]. 采用反义寡核苷酸技术阻断 NF- κ B 使 NO 生成减少, 可明显抑制幽门螺杆菌所致的胃上皮细胞凋亡^[34].

虽然 Hp 感染对胃肠上皮坏死、增生与凋亡均有促进作用, 但三者可能常处于不平衡状态. Hp 感染部位经久不愈导致溃疡形成可能是黏膜上皮坏死与凋亡增加占优势所致. 目前研究认为, 肿瘤的发生与细胞异常增生/凋亡有关. 处于过度增生状态的细胞更易受致突变、致癌物的损伤而产生凋亡抗性的细胞群体, 从而破坏胃黏膜上皮细胞增生和死亡的动态平衡. 同时, 细胞增生加速上皮更新, 促进胃黏膜肠化形成, 也可增加胃癌发生的危险性. 维生素 C 是强抗氧化剂, 能阻断胃内亚硝酸胺和肠道诱变因子的形成, 具有肯定的防癌作用^[35]. 有研究表明, Hp 阳性者胃液中维生素 C 及过氧化物歧化酶含量明显低于正常人, 表明 Hp 感染后炎症反应中释放的细胞因子和氧自由基破坏了机体的防癌与抗癌机制^[36]. 可见, Hp 感染时胃肠黏膜内自由基的堆积, 一方面导致上皮细胞凋亡与增生平衡失调, 细胞癌变概率增加; 另一方面, 自由基耗竭维生素 C 及过氧化物歧化酶, 使防癌能力减弱. 此二者是 Hp 感染导致上皮癌变的重要原因.

3.2 自由基导致 DNA 损伤 肿瘤的实质是一种基因病. 环境因素通过与体内基因相互作用并引起其结构、表达和功能异常时, 细胞出现癌变. 目前研究表明, Hp 感染是胃癌发生的重要原因, 胃上皮细胞 DNA 氧化损伤增加是 Hp 感染导致胃癌发生的主要机制之一. Hp 感染时胃黏膜内自由基大量生成, 对上皮细胞 DNA 造成严重损害, 主要表现为使核膜溶解、核酸解链、碱基突变和氢键破坏^[37,38]. Obst et al^[39]研究表明, 将胃黏膜细胞与 Hp 提取液共孵育, 可诱导胃黏膜上皮细胞自由基大量生成, 细胞谷胱甘肽减少, DNA 断裂及 DNA 合成加强. 而自由基清除剂 MnTBAP (一种可通透细胞的 SOD 类似物)、依布硒啉及大剂量的过氧化氢酶可完全阻断 Hp 提取液对 DNA 合成的加强作用, 并明显减轻细胞 DNA 损害. Smoot et al^[40]研究进一步表明, Hp 所致氧自由基可使上皮细胞 8-羟基脱氧鸟嘌呤 (8-OH-dG) 含量增加, 8-OH-dG 是 DNA 氧化损伤的标志物. 而谷胱甘肽过氧化物酶及 SOD 可降低上皮细胞对自由基的敏感性, 减少 8-OH-dG 含量, 提示 Hp 可能通过改变上皮细胞谷胱甘肽过氧化物酶及 SOD 的活性, 从而增加 DNA 损伤和上皮癌变. Hp 感染诱导生成的活性氧及氮自由基还可造成 DNA 突变及细胞分化不良, 在胃上皮癌前期病变中起重要作用^[41-44]. Kuniyasu et al^[45]研究报道, Hp 诱导生成的氧自由基和 NO 可能通过增加端粒末端转移酶活性, 使端粒复位、上皮化生、p53 突变、DNA 甲基化增加及复制错误, 并最终使上皮细胞癌变. NO 增多还可使胃黏膜内产生亚硝基化合物和硝酸盐等物质增多, 他们均可致 DNA 损伤和胃癌发生^[46-50].

4 Hp 抗氧化杀伤的机制

Hp 感染主要导致以中性粒细胞和巨噬细胞浸润为特征的炎症反应. 激活的炎症细胞通过呼吸爆发产生大量氧

自由基, 企图杀灭侵入的 Hp^[51]. NO 及 NO 与自由基反应后生成的氮过氧化阴离子也能不可逆地抑制 Hp 呼吸. 但 Hp 却能在这一高浓度自由基环境中生存并造成胃黏膜损害, 提示 Hp 本身具有强大的抗氧化损害能力. 研究表明, Hp 含超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(katA)等抗氧化酶系, 可有效解除自由基的细胞毒作用^[52-54].

生理条件下, Hp 即可合成过氧化氢酶, 且其活性明显高于空肠弯曲菌等相关种类细菌. 显著的过氧化氢酶活性是 Hp 的明显特征之一^[55-57]. katA 由含铁原子和卟啉基团的四个相同亚单位组成, 每一亚单位含 505 个氨基酸, 分子量 50-60 kD. 绝大多数细菌的过氧化氢酶位于细胞质, 以保护其 DNA 免受过氧化氢的损伤, 而 Hp 的过氧化氢酶除分布于胞质、胞周质外, 还通过某种未明的机制位于细菌表面, 表面定位使过氧化氢酶在 Hp 抵御吞噬细胞攻击中起十分重要的作用^[58-60]. Ramarao et al^[51,61]将野生型 Hp 和无 katA 活性的 Hp 突变株 P20 分别与中性粒细胞共孵育, 15 min 后突变株存活率急剧下降, 而野生型无明显改变. Hazell et al^[55]研究表明, Hp 在含血清培养基中生长时 katA 活性可达很高的水平. 同时 katA 在广泛的 pH 范围内均具有活性^[59,62]. 这些特点可能使其更利于在炎症渗出及胃的酸性环境中发挥作用^[51,63]. katA 催化过氧化氢生成分子氧和水, 使过氧化氢不能与某些金属离子反应生成羟自由基, 从而解除氧自由基对 Hp 的杀伤, 使 Hp 能在富含超氧离子的环境中生存, 这是 Hp 逃避中性粒细胞和巨噬细胞氧化杀伤的重要机制之一^[64,65].

超氧化物歧化酶普遍存在目前发现的幽门螺杆菌菌株, 主要分布于细菌表面^[66,67]. Nagata et al^[68]研究发现 Hp 自身 SOD 在其抵抗 NO 杀伤中起重要作用. Seyler et al^[69]采用基因突变技术消除 Hp SOD 活性, 发现野生型 Hp 可于 120 ml/L O₂ 浓度环境正常生长, 而突变型 Hp 在 50-60 ml/L 的 O₂ 条件即可出现活性降低, 生长受抑, 且对 H₂O₂ 敏感性升高, DNA 自发突变增加. 研究还发现, 23 只喂以突变型 Hp 的小鼠仅一只 Hp 阳性, 而 17 只喂以野生型 Hp 的小鼠中有 15 只获得感染, 提示 SOD 与 Hp 在胃黏膜的黏附与定植也密切相关. 该研究小组认为, SOD 也是 Hp 的毒力因子, 对于 Hp 在胃黏膜定植及氧化应激环境生存与生长至关重要. SOD 可催化超氧阴离子自由基(O₂⁻)相互作用生成过氧化氢与分子氧, 过氧化氢再经 katA 催化生成水和分子氧, 从而彻底清除自由基.

5 幽门螺杆菌相关胃病的抗氧化治疗前景

对于幽门螺杆菌相关胃病的治疗, 根除幽门螺杆菌已成为目前的首选方法. 如前所述, 自由基损伤在胃黏膜损害及胃癌发生中起重要作用. 自由基可致细胞脂质过氧化, 破坏线粒体和溶酶体, 使细胞丧失修复能力. 应用抗氧化药物清除黏膜自由基, 有利于减轻炎症反应, 恢复上皮细胞修复能力, 从而促进溃疡愈合; 另一

方面, 自由基清除可减少细胞 DNA 损伤和上皮癌变, 预防胃癌的发生. 抗氧化剂应用有望成为幽门螺杆菌相关胃病的重要辅助治疗手段.

维生素 C 是目前常用的抗氧化药物. 他可改变某些化学致癌剂的性质, 抑制内源性亚硝酸盐合成, 有利于胃癌的预防. 梁后杰 et al^[70]研究表明, 维生素 C 治疗可明显减轻 Hp 感染大鼠肠黏膜氧化损伤、上皮化生和胃黏膜癌前期变. 但 Everett et al^[71]应用维生素 C、E 治疗 Hp 阳性胃炎患者却未能获得理想的效果. 其原因可能与胃液 pH 有关. 一些胃炎或溃疡患者胃酸分泌不足, 不利于维生素 C 抗氧化作用的发挥. 虽然抗氧化剂治疗 Hp 相关胃病目前多数集中在动物模型研究, 但却开辟了 Hp 相关胃病治疗的新思路. 更重要的是, 许多中草药成分(如绿茶、银杏提取物等)具有抗氧化活性, 他们可能在 Hp 相关胃病治疗中具有较好的应用前景.

6 参考文献

- 1 McGee DJ, Mobley HL. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 241:155-180
- 2 Dundon WG, de-Bernard M, Montecucco C. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2001;290:647-658
- 3 Lundstrom AM, Blom K, Sundaeus V, Bolin I. HpaA shows variable surface localization but the gene expression is similar in different *Helicobacter pylori* strains. *Microb Pathog* 2001;31: 243-253
- 4 Domingo D, Alarcon T, Sanz JC, Villar H, Hernandez JM, Sanchez J, Lopez-Brea M. The *Helicobacter pylori* adhesion gene: relation with the origin of the isolates and associated disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999;17:342-346
- 5 Yoshikawa T, Naito Y. The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. *Free Radic Res* 2000;33:785-794
- 6 Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C, Rossi F. The neutrophil-activating protein (Hp-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000;191:1467-1476
- 7 Naito Y, Yoshikawa T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2002;33:323-336
- 8 Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112:92-99
- 9 Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J* 2002;368: 121-129
- 10 Shiotani A, Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Saeed MA, Qureshi WA, Graham DY. NSAID gastric ulceration: predictive value of gastric pH, mucosal density of polymorphonuclear leukocytes, or levels of IL-8 or nitrite. *Dig Dis Sci* 2002;47:38-43
- 11 Jung HK, Lee KE, Chu SH, Yi SY. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1336-1340
- 12 Kountouras J, Chatzopoulos D, Zavos C. Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. *Hepatogastroenterology* 2001;48:743-751
- 13 Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H,

- Padilla PI, Wada A, Hirayama T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:629-632
- 14 Santra A, Chowdhury A, Chaudhuri S, Das Gupta J, Banerjee PK, Mazumder DN. Oxidative stress in gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Indian J Gastroenterol* 2000;19:21-23
- 15 Kodama K, Sumii K, Kawano M, Kido T, Nojima K, Sumii M, Haruma K, Yoshihara M, Chayama K. *Helicobacter pylori* infection increases serum nitrate and nitrite more prominently than serum pepsinogens. *Helicobacter* 2002;7:9-13
- 16 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells: possible role of interferon-gamma in polarized nitric oxide secretion. *Helicobacter* 2002;7:116-128
- 17 Lim JW, Kim H, Kim KH. NF-kappaB, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med* 2001;31:355-366
- 18 Chuang CH, Sheu BS, Huang AH, Yang HB, Wu JJ. Vitamin C and E supplements to lansoprazole-amoxicillin-metronidazole triple therapy may reduce the eradication rate of metronidazole-susceptible *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2002; 7:310-316
- 19 Akyon Y. Effect of antioxidants on the immune response of *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:438-441
- 20 Beil W, Obst B, Sewing KF, Wagner S. *Helicobacter pylori* reduces intracellular glutathione in gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci* 2000;45:1769-1773
- 21 Fosslien E. Mitochondrial medicine-molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31: 25-67
- 22 Hahm KB, Park IS, Kim YS, Kim JH, Cho SW, Lee SI, Youn JK. Role of rebamipide on induction of heat-shock proteins and protection against reactive oxygen metabolite-mediated cell damage in cultured gastric mucosal cells. *Free Radic Biol Med* 1997;22:711-716
- 23 Pignatelli B, Bancel B, Plummer M, Toyokuni S, Patricot LM, Ohshima H. *Helicobacter pylori* eradication attenuates oxidative stress in human gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1758-1766
- 24 李芸, 廖钢陵, 邓建籽, 吴元德. 超氧阴离子自由基促肝卵圆细胞株 WB-F344 增生、转化作用的研究. *中国医学科学院学报* 2000; 22:106-110
- 25 仲崇霞, 葛淑君, 程时, 陶家平. 锌⁷⁺-金属硫蛋白对过氧化氢引起的 NIH3T3 细胞增生的抑制作用. *基础医学与临床* 2000;20:57-59
- 26 Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996;38: 498-501
- 27 Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 2001;6:77-90
- 28 Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Krett N, Halgren R, Rosen S, Kufe D, Kharbanda S, Anderson K. Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 1997;272:29995-29997
- 29 Habibovic S, Hrgovic Z, Bukvic I, Hrgovic I. Molecular mechanisms in apoptosis. *Med Arh* 2000;54:33-40
- 30 Cande C, Ceconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 2002;115:4727-4734
- 31 Betten A, Bylund J, Christophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, Dahlgren C. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 2001;108:1221-1228
- 32 Neu B, Randkofer P, Neuhofer M, Voland P, Mayerhofer A, Gerhard M, Schepp W, Prinz C. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G309-G318
- 33 Holian O, Wahid S, Atten MJ, Attar BM. Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G809-G816
- 34 Mahr S, Neumayer N, Gerhard M, Classen M, Prinz C. IL-1beta-induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF-kappaB, and Bax protein. *Gastroenterology* 2000;118:515-524
- 35 Liu SL, Shi DY, Pan XH, Shen ZH. Inhibition of proliferation and expression of N-ras in hepatoma cells by antioxidation treatment. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33: 463-466
- 36 张志广, 闻淑军, 卢向东, 王洪礼. 幽门螺杆菌感染患者胃液及血浆中维生素 C 含量的变化. *天津医药* 2002;30:26-27
- 37 华杰松. 幽门螺杆菌: 细胞增生和细胞凋亡在胃癌发生中的作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:647-648
- 38 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌与胃癌的关系. *世界华人消化杂志* 2001; 9:1045-1049
- 39 Obst B, Wagner S, Sewing KF, Beil W. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* 2000; 21:1111-1115
- 40 Smoot DT, Elliott TB, Verspaget HW, Jones D, Allen CR, Vernon KG, Bremner T, Kidd LC, Kim KS, Groupman JD, Ashktorab H. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis* 2000;21:2091-2095
- 41 Abe T, Shimoyama T, Fukuda S, Nakaji S, Sugawara K, Saito Y. Effects of *Helicobacter pylori* in the stomach on neutrophil chemiluminescence in patients with gastric cancer. *Luminescence* 2000;15:267-271
- 42 Bagchi D, McGinn TR, Ye X, Bagchi M, Krohn RL, Chatterjee A, Stohs SJ. *Helicobacter pylori*-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 2002;47:1405-1412
- 43 Nakamura A, Park A, Nagata K, Sato EF, Kashiba M, Tamura T, Inoue M. Oxidative cellular damage associated with transformation of *Helicobacter pylori* from a bacillary to a coccoid form. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1611-1618
- 44 Farinati F, Cardin R, Degan P, Rugge M, Mario FD, Bonvicini P, Naccarato R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1998;42:351-356
- 45 Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H, Tahara E. *Helicobacter pylori* infection and carcinogenesis of the stomach. *Langenbecks Arch Surg* 2000;385:69-74
- 46 Pignatelli B, Bancel B, Esteve J. Inducible nitric oxide synthase, anti-oxidant enzymes and *Helicobacter pylori* infection in gastritis and gastric precancerous lesions in humans. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:439-447
- 47 Hahm KB, Lee KJ, Kim JH, Cho SW, Chung MH. *Helicobacter pylori* infection, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. *Dig Dis Sci* 1998;43:72S-77S
- 48 Tari A, Kodama K, Kurihara K, Fujihara M, Sumii K, Kajiyama G. Does serum nitrite concentration reflect gastric carcinogenesis in Japanese *Helicobacter pylori*-infected patients? *Dig Dis Sci* 2002;47:100-106
- 49 Son HJ, Rhee JC, Park DI, Kim YH, Rhee PL, Koh KC, Paik SW, Choi KW, Kim JJ. Inducible nitric oxide synthase expression in gastroduodenal diseases infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2001;6:37-43
- 50 Goto T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Yoshihara M, Sumii K, Hayakawa N, Kajiyama G. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999;5:1411-1415
- 51 Ramarao N, Gray Owen SD, Meyer TF. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol Microbiol* 2000;38:103-113
- 52 Mori M, Suzuki H, Suzuki M, Kai A, Miura S, Ishii H. Catalase and superoxide dismutase secreted from *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1997;2:100-105
- 53 Lamarque D, Moran AP, Szepes Z, Delchier JC, Whittle BJ. Cytotoxicity associated with induction of nitric oxide synthase in rat duodenal epithelial cells in vivo by lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori*: inhibition by superoxide dismutase. *Br J Pharmacol* 2000;130:1531-1538

- 54 Bereswill S, Neuner O, Strobel S, Kist M. Identification and molecular analysis of superoxide dismutase isoforms in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;183:241-245
- 55 Hazell SL, Evans DJ Jr, Graham DY. *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol* 1991;137:57-61
- 56 Harris AG, Hinds FE, Beckhouse AG, Kolesnikow T, Hazell SL. Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein', KapA (HP0874). *Microbiology* 2002;148:3813-3825
- 57 Suzuki N, Wakasugi M, Nakaya S, Kokubo N, Sato M, Kajiyama H, Takahashi R, Hirata H, Ezure Y, Fukuda Y, Shimoyama T. Catalase, a specific antigen in the feces of human subjects infected with *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:784-788
- 58 Phadnis SH, Parlow MH, Levy M, Ilver D, Caulkins CM, Connors JB, Dunn BE. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun* 1996;64:905-912
- 59 Odenbreit S, Wieland B, Haas R. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol* 1996;178:6960-6967
- 60 Radcliff FJ, Hazell SL, Kolesnikow T, Doidge C, Lee A. Catalase, a novel antigen for *Helicobacter pylori* vaccination. *Infect Immun* 1997;65:4668-4674
- 61 Ramarao N, Meyer TF. *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. *Infect Immun* 2001;69:2604-2611
- 62 Nilius M, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* enzymes. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10(Suppl 1):65-71
- 63 Stark RM, Greenman J, Millar MR. Physiology and biochemistry of *Helicobacter pylori*. *Br J Biomed Sci* 1995;52:282-290
- 64 Allen LA. The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:273-277
- 65 Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 1997;40:25-30
- 66 Klinowski E, Broide E, Varsano R, Eshchar J, Scapa E. Superoxide dismutase activity in duodenal ulcer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:1151-1155
- 67 Spiegelhalder C, Gerstenecker B, Kersten A, Schiltz E, Kist M. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun* 1993;61:5315-5325
- 68 Nagata K, Yu H, Nishikawa M, Kashiba M, Nakamura A, Sato EF, Tamura T, Inoue M. *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J Biol Chem* 1998;273:14071-14073
- 69 Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* 2001;69:4034-4040
- 70 梁后杰, 刘为纹, 房殿春, 门荣甫, 王俊茹, 周子成. 幽门螺杆菌提取液诱发大鼠胃癌前病变及维生素C的拮抗作用. *解放军医学杂志* 1996;21:456-457
- 71 Everett SM, Drake IM, White KL, Mapstone NP, Chalmers DM, Schorah CJ, Axon AT. Antioxidant vitamin supplements do not reduce reactive oxygen species activity in *Helicobacter pylori* gastritis in the short term. *Br J Nutr* 2002;87:3-11



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

