

科学研究的设计和方法中的科学性

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, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师. 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科完成博士后研究. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制, 出版专著5部, 发表论文及综述300篇. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫病学分会常委、解放军医学会传染病专业委员会委员, 《中华传染病杂志》副主编、《胃肠病学和肝病学杂志》副主编、《传染病信息》杂志副主编、《热带病与寄生虫病杂志》副主编, 《中华肝病杂志》、《世界华人消化杂志》编委等.
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: 2003-12-10 接受日期: 2004-04-16

摘要

生物学和医学的研究发展很快, 不断有新的理论和技术出现, 推动着生物学和医学领域的不断发展. 现代分子生物学技术和理论为肝脏病学的研究提供了前所未有的机遇. 由于发展不平衡, 对于新理论和新技术的接受程度和推广还有一段艰难的过程. 在这一过程中, 不可避免地存在一些认识上的误差和偏差. 因此本文选取3个有代表性的例子, 阐明科学研究的设计和方法中的科学性.

成军. 科学研究的设计和方法中的科学性. 世界华人消化杂志 2004;12(7): 1513-1516

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1513.asp>

0 引言

我作为几家杂志的编委, 经常会审阅来自不同单位的稿件, 在审阅过程中发现了一些问题. 本文的目的是提出一些问题, 供编者、读者作为参考, 共同提高我们科研设计的水平和学术论文的质量. 关于正确理解现代分子生物学理论和技术在生物医学研究领域中的应用, 有许多鲜明的例子, 本文主要选取3个有代表性的例子, 说明在科研设计和学术论文鉴赏过程中常见的误区.

1 研究基因转录水平主要考虑的是启动子的转录活性在审稿过程中, 我接到一篇研究核苷类似物拉米夫定(lamivudine)抑制乙型肝炎病毒(HBV)X基因的研究报道. 基本的研究方法和过程如下: 首先利用分子生物学技

术, 构建HBV X基因的真核表达载体, 如具有巨细胞病毒(CMV)早期即刻基因启动子的pcDNA3, 然后用这一载体转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 建立稳定转染细胞系, 在细胞系的培养上清中加入拉米夫定, 利用半定量的逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术, 检测HBV X基因的转录物水平, 并进行半定量分析, 结果证明HBV X基因的转录物水平有显著降低, 结论是拉米夫定对于HBV X基因的转录具有显著的抑制作用. 这一篇文章的设计存在严重的问题, 对于分子生物学的基本原理的理解有偏差, 是不能发表的.

首先我们必须明白, 基因的转录调节是在基因启动子指导下进行的, 基因转录水平的高低受到许多因素的影响, 但是主要决定于启动子在这一系统中的转录活性, 而与启动子指导的目的基因的性质没有太多的关系^[1-12]. 这样的设计更多的是研究了拉米夫定对于CMV早期即刻基因启动子转录活性的抑制作用, 而与HBV X基因的转录没有关系. 如果本实验的目的基因换成别的什么基因, 所得到的结果也同样不能说明目的基因的变化. 例如这一实验中我们将HBV X基因换成报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT), 那么岂不是可以得出结论拉米夫定可以抑制氯霉素乙酰转移酶的表达了吗? 显然这是不合适的.

关于转录水平的研究, 正确的研究方法设计应该是特定基因的启动子序列与报告基因构件成报告基因表达载体, 转染合适细胞系, 共同转染其他的表达质粒, 或者在细胞培养上清中加入某些药物(如拉米夫定), 以研究基因表达或药物对于该基因转录表达的影响^[13-15]. 要研究什么基因的转录表达, 即选择该基因的启动子基因序列, 而不是选择其编码基因序列. 目前报告基因表达载体的构建与细胞转染模型的建立是研究基因表达调控非常常用和成熟的研究技术和策略, 常用的报告基因包括CAT、 β -半乳糖苷酶(β -gal, β -galactosidase)、萤虫素酶(Luc, luciferase)、和绿色荧光蛋白(GFP, green fluorescence protein)等. 报告基因CAT的检测有酶联免疫黏附法(ELISA)、同位素分析法, β -gal的检测有ELISA法和免疫组织化学染色法, Luc的表达可用化学发光法, 而GFP是惟一可以在活细胞中进行观察的报告基因类型. 以上报告基因类型可以根据具体的研究条件和研究的目的进行选择. 但是, 无论采用的是何种类型的报告基因, 其表达水平并不代表报告基因的调控, 而是代表了报告基因上游的启动子的转录活性水平. 利用报告基因表达载体的研究技

术, 具有很多的优点, 其一可以避开内源和外源基因表达水平的影响. 例如, 研究一种基因的转录水平表达而进行报告基因表达载体的构建和细胞转染, 如果表达产物是基因编码产物本身, 就难以区别内源性基因的编码水平或者是外源转染基因的表达水平. 采用报告基因就可以解决这一问题, 因为采用的报告基因类型是细胞本身不表达的产物, 因此, 对于报告基因编码产物的检测水平可以精确地反映基因启动子的转录活性, 不会受到内源性基因表达产物水平的影响. 第二, 如果研究不同基因启动子的转录活性, 采取本身基因表达产物的检测方法, 必须建立各种基因表达产物的检测方法, 有些基因的表达产物的检测技术还不具备, 或者很难建立, 但是如果采用报告基因的研究策略就很容易解决这一问题, 只要建立稳定的报告基因表达的检测技术就可以应用不同基因启动子转录活性的检测和研究. 这也正是基因转录表达研究策略中非常成熟和公认的做法^[16-18].

2 肝炎病毒准种特点是一个不能忽视的问题

乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒(HCV)存在状态时准种(quasispecies)状态, 这是一个不能忽略的问题^[19-31]. 在研究抗病毒治疗前后的病毒的基因序列改变的研究中尤其要注意病毒基因准种的特点. 例如, 一篇论文研究慢性乙型肝炎的抗病毒治疗前后的病毒基因序列的改变, 治疗前留取患者的血清, 抗病毒治疗后再一次留取血清, 由两份血清提取HBV DNA, 应用聚合酶链反应(PCR)技术进行扩增, 扩增的HBV DNA片段进行克隆化, 各挑取1个克隆进行序列分析, 结果发现2个序列存在差别, 因此就判定抗病毒治疗前后病毒的基因序列发生了改变, 而且认为这种改变与抗病毒治疗的效应有关. 如果慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗前后的HBV基因序列始终各自都是均一的病毒基因序列, 或许这种研究方法是可行的, 但是, 事实上HBV基因序列有准种特点, 就是说慢性乙型肝炎患者血清中的病毒, 其基因序列, 不同的病毒株之间十分相似, 但又不同, 这种相似性达到95%以上, 差别占总核苷酸数的5%以下, 这种差别较小, 还不足以分成不同的血清型, 也不足以分成不同的基因型, 但这种差别又是客观存在的. 病毒株之间的差别是一个较为普遍的现象, 甚至在患者的血清中很难找到2株序列完全一致的病毒. 因此, 我们对于HBV在患者血清中的存在状态, 应该是把HBV看成是由不同的基因序列的HBV组成的一个病毒群, 而且随着病毒自身复制过程的变化, 以及机体的免疫力和抗病毒药物应用的情况, 各种病毒在病毒中所占的比例在时时刻刻的变动之中^[32-35]. 因此, 准种概念之所以十分重要, 就是改变了以往人们对于HBV存在状态的看法, 换了一种角度来看HBV的存在状态, 更为客观和准确. 利用准种的观点来看上述研究结果, 就不难看出这种科研设计的局限性. 如果慢

性乙型肝炎患者血清中HBV的拷贝数在 10^{11} 拷贝/mL, 而且各株病毒间的序列都是不同的, 那么在治疗前随机扩增、克隆、测序一个克隆, 仅仅代表的是该病毒株而已, 与其他病毒无关, 没有多少普遍的意义. 如果治疗后, 也是随机挑取一个病毒基因序列进行测定, 也是同样的道理. 但是, 治疗前后研究同一个病毒的可能性只有 $1/10^8$, 换句话说这是不可能的. 因此, 在治疗前后, 根本就是对于2株肯定不一样的病毒基因序列进行比较, 这样的结果与治疗的效应又有何干? 因此, 不能对于治疗前后各1个或少数的病毒基因序列进行测定来研究抗病毒治疗前后病毒基因序列的改变, 这种差别根本就不可能与治疗的效应有关.

类似的例子还有很多. 有些有心人对于血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)正常的HBV无症状携带者(ASC)进行研究, 观察病情变化过程中病毒基因序列的改变. 也是在ALT治疗前获取一个HBV基因克隆进行序列测定, 在治疗后又获取一个克隆进行测序, 并且将ALT正常和ALT升高2个时间点的HBV基因序列进行比较, 并且将这种差别, 解释为HBV感染者从ALT正常状态到ALT升高状态转变过程中的HBV基因序列的变化及其规律, 殊不知2次获得HBV病毒株根本就是不同的病毒, 序列本来就不同, 这样的比较不但没有意义, 还会误导HBV基因序列变化与病情变化之间相关性的研究. 如果将HBV基因准种特点考虑进去, 就不难理解这样的科研设计的局限性, 就可以避免类似的错误或不足之处. 因此, 关于HBV准种研究的结果, 尽管这一概念十分浅显, 容易理解, 但是对于我们认识HBV的存在状态, 进行合理的科研设计, 提高学术论文的鉴赏水平, 都具有十分重要的意义. 同样的道理, 关于HCV和人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)的类似研究, 也必须将病毒基因的准种特点考虑进去, 事实上, 关于HBV准种特点的研究就是采用了在HCV、HIV-1的研究中所采用的准种概念.

研究病情变化前后, 或者是研究治疗前后病毒基因序列的改变, 应该将准种特点考虑进去, 因此不能通过单个或少数的几个克隆的序列分析进行判断^[36-38]. 正确的做法是对于病毒的准种群进行研究, 从优势种群的漂变(shift)规律来解释病毒基因序列的改变与病情变化和治疗疗效之间的关系. 由于病毒的准种特点, 由于病毒的基因序列的异质性(heterogeneity)广泛存在, 应用目前少数克隆的序列分析技术是不可能解决的. 近年来基因芯片(DNA chips)这类高通量分析技术的出现为研究这一课题提供了前所未有的机遇. 可以通过基因芯片的高通量研究, 对于HBV基因准种的特点进行研究, 阐明HBV基因的变化与临床病情之间的相互关系、与抗病毒治疗疗效之间的相互关系.

3 结合蛋白和受体的区别

利用配体蛋白分子进行筛选, 一方面可能会得到受体

蛋白分子, 另一方面也会得到蛋白结合蛋白. 如果只是发现一种配体蛋白结合的蛋白, 还不足以肯定这种蛋白就是配体蛋白的受体蛋白分子, 还需要有另外的足够的研究证据, 否则就会不完整, 就会导致错误的结论.

研究蛋白蛋白之间相互结合的技术相当多^[39-51]. 研究细胞内蛋白与蛋白质间的结合与相互作用的技术, 主要有哺乳动物细胞双杂交、活细胞的激光共聚焦显微技术、酵母双杂交技术等; 研究体外蛋白与蛋白之间相互作用的技术包括体外免疫共沉淀技术、放射性配体分析技术、拖拉(pull down)技术等^[52-59]. 作为受体蛋白, 必须具备与配体分子之间的结合, 还必须具备跨膜的分布特征, 与配体分子结合以后介导信号转导过程. 配体分子与受体分子之间存在结合的现象, 但是同时也会存在与其他蛋白结合的现象. 因此, 仅仅只有与配体分子结合的能力还不够, 还必须阐明配体结合蛋白的分子结构与性质, 才能决定配体蛋白结合的蛋白分子究竟是否是受体分子. 如果明白这一点, 就不会在仅仅证明有配体分子结合活性的情况下, 就匆匆断定这就是配体分子的受体分子. 这样的研究结果, 必须具备重组的实验证据, 否则仅仅靠蛋白之间的这种结合就判定是配体的受体分子就显得证据不足, 可能会导致错误的结论.

我们利用酵母双杂交技术对于各种肝炎病毒的结构和非结构蛋白的结合蛋白进行了系统的筛选, 从理论上讲, 如果“诱饵”质粒表达的是肝炎病毒的包膜蛋白, 那么就有可能筛选得到肝炎病毒的特异性受体分子, 因为筛选的惟一要求是在酵母细胞中存在蛋白与蛋白之间的相互结合^[60-66]. 但是, 我们所筛选得到都是结合蛋白, 都不是受体蛋白, 可见结合蛋白与受体蛋白之间的差别.

研究一种配体分子蛋白的受体的研究策略, 可以参考发现HIV-1第二受体分子的研究策略. 首先对于配体分子的细胞系通过流式细胞学技术进行分选、富集, 从这样的细胞系中分离纯化总mRNA, 可以很好地保证受体蛋白编码基因的mRNA的丰度. 然后应用这样的mRNA逆转录后建立真核细胞表达载体, 转染不表达配体蛋白分子的细胞系, 然后利用配体分子与转染细胞系结合的磁珠细胞分离方法, 富集配体分子结合的转染细胞系, 从中提取质粒DNA, 以大肠杆菌扩增质粒, 重复细胞转染, 配体分子结合细胞的筛选等步骤, 最终获得配体分子结合的受体分子结合蛋白编码基因. 无论采用什么样的筛选技术和流程, 最终的判断筛选分子是否是受体分子, 在没有确定其分子结构及功能之前, 任何草率的结论都是一种误导, 应该特别小心^[67-69].

现代分子生物学的理论和技术, 极大地推动了现代肝脏病学的研究和进展. 同时也在不断地修正着我们对于肝脏病学的概念和理论. 在这一探索过程中, 不可避免地存在着一些偏差, 甚至是错误^[70-72]. 我们要勇于提出这些不足或者是错误之处, 只要我们认识到了错误

或不足之处之所在, 我们的认识就会提高一步, 我们的学科建设才会更快进步.

4 参考文献

- 1 成军. 丙型肝炎病毒致病的分子生物学机制. 解放军医学杂志 2003;28:23-27
- 2 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003; 11:373-377
- 3 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896
- 4 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11: 1083-1090
- 5 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. 世界华人消化杂志 2003;11:1073-1080
- 6 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-761
- 7 成军. 坚持相对稳定的科研方向是关键. 世界华人消化杂志 2003; 11:1857-1861
- 8 成军. 肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制研究策略. 中西医结合肝病杂志 2003;14:321-323
- 9 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
- 10 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调NIP3基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:951-954
- 11 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白WEE1基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:947-950
- 12 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘连蛋白B1链基因启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:955-958
- 13 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;11:959-962
- 14 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶N调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1131-1134
- 15 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 表达谱基因芯片技术研究膦甲酸钠上调细胞凋亡蛋白酶激活因子-1基因的表达. 中西医结合肝病杂志 2003;14:351-354
- 16 洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白上调NS3TP6基因启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2004; 12:813-816
- 17 王建军, 李宝伟, 成军, 刘妍, 徐志强, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 表达谱基因芯片技术研究甘草甜素上调白介素-18基因的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:855-858
- 18 成军. 乙型肝炎病毒准种研究的意义. 中华传染病杂志 2001;19: 197-198
- 19 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. 中华内科杂志 2000;39:838-839
- 20 董菁, 成军, 王勤环, 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
- 21 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 22 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒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
- 23 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 24 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 皇甫竞坤, 王刚, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前C/C基因准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 25 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 李莉, 张国庆, 斯崇文. 乙型肝炎病毒C基因启动子区准种与变异特点的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:264-266
- 26 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎

- 病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
- 27 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
- 28 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 王业东, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 29 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 30 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 31 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 韩萍, 牟劲松, 李克, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 32 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
- 33 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒前 C/C 基因准种与变异特点的研究. 中华微生物学与免疫学杂志 2002;22:27
- 34 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
- 35 成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚. 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式. 世界华人消化杂志 2003;11:1238-1240
- 36 成军. 从乙型肝炎病毒准种特点看抗病毒治疗的艰巨性. 新医学 2004;35:(待发表)
- 37 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
- 38 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
- 39 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
- 40 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
- 41 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
- 42 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 蛋白结合蛋白. 解放军医学杂志 2003;28:31-33
- 43 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcsp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 44 陈天艳, 成军, 张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:451-455
- 45 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 46 陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒 e 抗原结合蛋白 E-19 的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1118-1121
- 47 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1122-1125
- 48 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:765-777
- 49 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5B 结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:768-770
- 50 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 陈天艳, 刘妍, 钟彦伟, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 结合蛋白 37 基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:774-776
- 51 成军. 病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究新探讨. 传染病信息 2003;16:6-8
- 52 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 猪丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 同源基因的克隆化研究. 生物学杂志 2003;20:10-13, 33
- 53 梁耀东, 成军, 李强, 王琳, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 酵母双杂交技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:1866-1869
- 54 梁耀东, 陆荫英, 成军, 李强, 王琳, 吴君, 程明亮. 酵母双杂交技术筛选肝细胞中与乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 C-12 相互作用蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1862-1865
- 55 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白细胞 HCV NS3 蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:1897-1900
- 56 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 应用淋巴细胞表达型 cDNA 文库的酵母双杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;14:345-348
- 57 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 成军, 李莉, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白基因. 中华传染病杂志 2004;22:47-49
- 58 陆荫英, 刘妍, 李克, 成军, 王琳. 乙型及丙型肝炎受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 58 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1126-1130
- 60 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
- 61 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
- 62 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 63 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;16:351-354
- 64 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 65 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白的筛选. 中华肝脏病杂志 2003;11:8-10
- 66 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 67 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1242-1245
- 68 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1114-1117
- 69 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清. 乙型肝炎病毒 X 蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2003;11:1940-1942
- 70 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
- 71 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
- 72 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003

SLP-2基因在食管鳞癌中的差异表达及其生物信息学分析

张立勇, 王涛, 丁芳, 刘仲敏, 刘芝华, 李衍达

张立勇, 李衍达, 清华大学自动化系生物信息学教育部重点实验室
北京市 100084
王涛, 丁芳, 刘仲敏, 刘芝华, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021
项目负责人: 李衍达, 100084, 北京市海淀区清华园, 清华大学自动化系生物信息学教育部重点实验室. daulyd@tsinghua.edu.cn
电话: 010-62782409 传真: 010-62784047
收稿日期: 2004-03-18 接受日期: 2004-04-13

Differential expression and bioinformatics analysis of SLP-2 gene in esophageal squamous cell carcinoma

Li-Yong Zhang, Tao Wang, Fang Ding, Zhong-Min Liu, Zhi-Hua Liu, Yan-Da Li

Li-Yong Zhang, Yan-Da Li, Ministry of Education Key Laboratory of Bioinformatics, Department of Automation, Tsinghua University, Beijing 100084, Beijing, China
Tao Wang, Fang Ding, Zhong-Min Liu, Zhi-Hua Liu, National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute/Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Correspondence to: Yan-Da Li, Ministry of Education Key Laboratory of Bioinformatics, Department of Automation, Tsinghua University, Beijing 100084, China. daulyd@tsinghua.edu.cn
Received: 2004-03-18 Accepted: 2004-04-13

Abstract

AIM: One of the differentially expressed genes, SLP-2 (stomatin-like protein 2, SLP-2), was obtained from esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patient-matched tissues using cDNA microarrays, which was overexpressed in ESCC tissues compared with their normal counterparts. This study was to confirm overexpression of SLP-2 in ESCC, to construct tissue expression pattern of SLP-2 in different embryonic tissues and to carry out bioinformatics analysis.

METHODS: Overexpression of SLP-2 in esophageal squamous cell carcinoma was confirmed by RT-PCR and Northern blot. Tissue expression pattern was constructed by RT-PCR. And the biological property was analyzed by bioinformatic softwares.

RESULTS: RT-PCR and Northern blot showed that SLP-2 was overexpressed in ESCC tissues and distributed in different embryonic tissues. Relatedness between members of the stomatin superfamily was compared using CLUSTAL procedure. Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) software predicted that it possessed a PHB domain (prohibitin homologue) and a coiled coil.

CONCLUSION: cDNA microarray is a powerful tool for screening differentially expressed genes. SLP-2 is overexpressed in ESCC tissues and expressed in different embryonic tissues. The biological property is analyzed by bioinformatic softwares. Our study lays a good foundation

for elucidation the molecular mechanism of initiation and progression of ESCC.

Zhang LY, Wang T, Ding F, Liu ZM, Liu ZH, Li YD. Differential expression and bioinformatics analysis of SLP-2 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1517-1521

摘要

目的: 应用cDNA微阵列从食管鳞癌配对组织中得到一批在食管鳞癌中差异表达的基因, 其中包括 SLP-2. 他在食管鳞癌组织中的表达比其在配对的正常组织中高6倍以上. 验证 SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达的结果, 构建组织表达谱, 同时对其进行生物信息学分析.

方法: 利用 RT-PCR 和 Northern blot 对 SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达的结果进行验证, 构建组织表达谱. 利用 CLUSTAL 和 SMART 软件对 SLP-2 进行生物信息学分析.

结果: RT-PCR 和 Northern blot 表明, SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达, 并在多种组织中表达. CLUSTAL 软件分析表明, SLP-2 蛋白是 stomatin 超家族的一员, 但缺少 stomatin 超家族所特有的 N-端疏水性结构域. SMART 软件分析表明, SLP-2 蛋白具有一个 PHB 结构域和一个螺旋丰富的区域.

结论: cDNA 微阵列是筛选差异表达基因的有力工具. SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达, 并在多种组织中都有表达. 生物信息学分析表明其缺少 stomatin 超家族所特有的 N-端疏水性结构域, 具有一个 PHB 结构域和一个螺旋丰富的区域, 为阐明 SLP-2 参与肿瘤发生发展的分子机制奠定了良好的基础.

张立勇, 王涛, 丁芳, 刘仲敏, 刘芝华, 李衍达. SLP-2 基因在食管鳞癌中的差异表达及其生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1517-1521
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1517.asp>

0 引言

深入研究食管癌发生发展的分子机制, 对于阐明肿瘤发生发展的机制、设计新的抗食管癌药物和有针对性地进行个体治疗至关重要. 食管癌的发生发展是一个多因素、多基因参与的多步骤的复杂生物学过程^[1-7]. 虽然在基因表达异常、分离表达失调蛋白和肿瘤排斥抗原等方面有所进展, 但对食管癌的发生发展机制的认识仍有待于进一步阐明^[8-11]. 利用 cDNA microarray 技术发现了一些在食管癌中差异表达的基因^[8, 12-13]. 我们首次

发现SLP-2(stomatin-like protein 2)在食管鳞癌中高表达。目前尚无 SLP-2 与肿瘤相关研究的报道,利用 RT-PCR 和 Northern blot 对 SLP-2 在食管鳞癌组织中高表达的结果进行验证,构建组织表达谱。利用 CLUSTAL 和 SMART 软件对 SLP-2 进行生物信息学分析,为进一步阐明 SLP-2 参与肿瘤发生发展的分子机制打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 配对的食管鳞癌组织标本取自中国医学科学院协和医院和肿瘤医院,由2位以上资深病理学专业人员确诊,所有患者均未经放化疗。胎儿组织取自中国医学科学院协和医院,为6月龄女性。所有组织经液氮速冻后,-80 冰箱冻存备用。从-80 冰箱中取出食管癌组织及其配对的手术切除组织,加入适量液氮后迅速研成粉末。总RNA的提取按照 TRIzol 试剂盒(Gibco)说明书进行。用 DEPC 处理的去离子水溶解 RNA,12 g/L 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检查总RNA的完整性。紫外分光光度计测定RNA的含量(A₂₆₀值)和纯度(A₂₆₀/A₂₈₀比值)后,-80 保存备用。

1.2 方法 cDNA 第一链的合成按照 Transcriptase Super Script II™ Preamplification System for First Strand cDNA 试剂盒(Gibco)说明书进行。PCR 总反应体系为 25 μL,其中含 1-4 μL 模板,SLP-2 上游引物序列为:5' - GTGACTCTCGACAATGTAAC-3';下游引物序列为:5' - TGATCTCATAACGGAGGCAG -3',各 0.4 μmol/L, dATP, dCTP, dGTP, dTTP 每种 0.2 mmol/L, 1×PCR 缓冲液,1.5 mM MgCl₂, 1.5 U Taq 酶。PCR 反应在 PE9600 型 PCR 仪上进行,扩增条件为:94 预变性 5 min; 94 30 s, 57 30 s, 72 30 s, 27 个循环,72 延伸 5 min。以 GAPDH 作为内对照。扩增产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后置于 Fluo-S Mutilmager 凝胶扫描仪中进行检测。Northern blot 采用 Primer-a-Gene® (Promega) 探针标记系统,用 α-32P-dCTP 标记的 SLP-2 片段作为探针,按照说明书对食管鳞癌配对组织总 RNA 印迹进行杂交。

生物信息学分析从美国国家生物技术信息中心(National center for biotechnology information, NCBI)蛋白

质数据库中调取 stomatin 超家族不同成员的氨基酸序列,利用 CLUSTAL 软件对其进行同源性预测相关性分析。NCBI 蛋白质数据库中调取 SLP-2 蛋白的氨基酸序列,利用 SMART 软件对其进行结构域预测。

2 结果

2.1 SLP-2 基因在食管鳞癌中高表达 与相应配对正常食管上皮相比,SLP-2 在食管鳞癌组织中表达上调(74%, 40/54, 图 1)。Northern blot 结果表明,SLP-2 在食管鳞癌组织中表达上调(77%, 10/13, 图 2)。

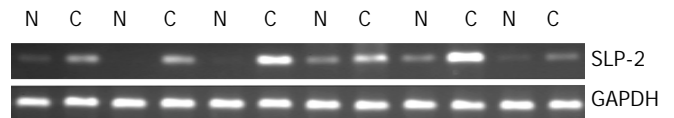


图 1 半定量 RT-PCR 检测 SLP-2 在食管鳞癌配对组织中的差异表达。N: 正常食管上皮; C: 配对的肿瘤组织。

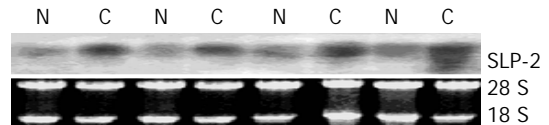


图 2 Northern blot 检测 SLP-2 在食管鳞癌配对组织中的差异表达。N: 正常食管上皮; C: 配对的肿瘤组织。

2.2 SLP-2 基因在多种胎儿组织中表达 取新鲜胎儿的不同组织,分别提取总RNA。逆转录成cDNA后,以 SLP-2 引物对 cDNA 进行半定量 RT-PCR 反应,以 GAPDH 作为内对照。结果表明,在 mRNA 水平上,SLP-2 在胎儿脑、肾脏、肺、胸腺、气管、食管黏膜、胃、肌肉、心脏、结肠、脾脏、小肠、胆囊等组织中广泛表达,其中在脑和肾脏等组织中表达量很低(图 3)。

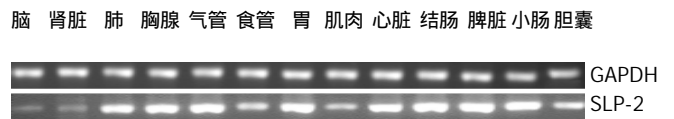
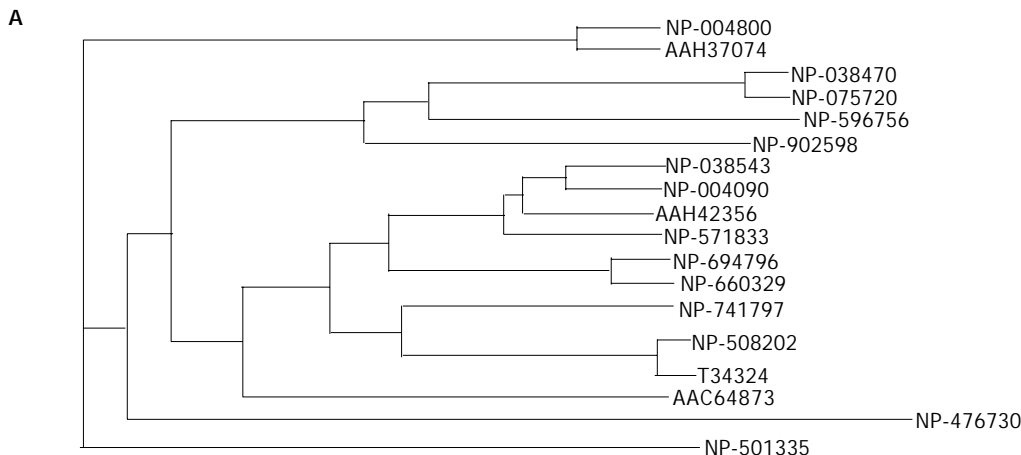


图 3 半定量 RT-PCR 检测 SLP-2 在胎儿组织中的表达。



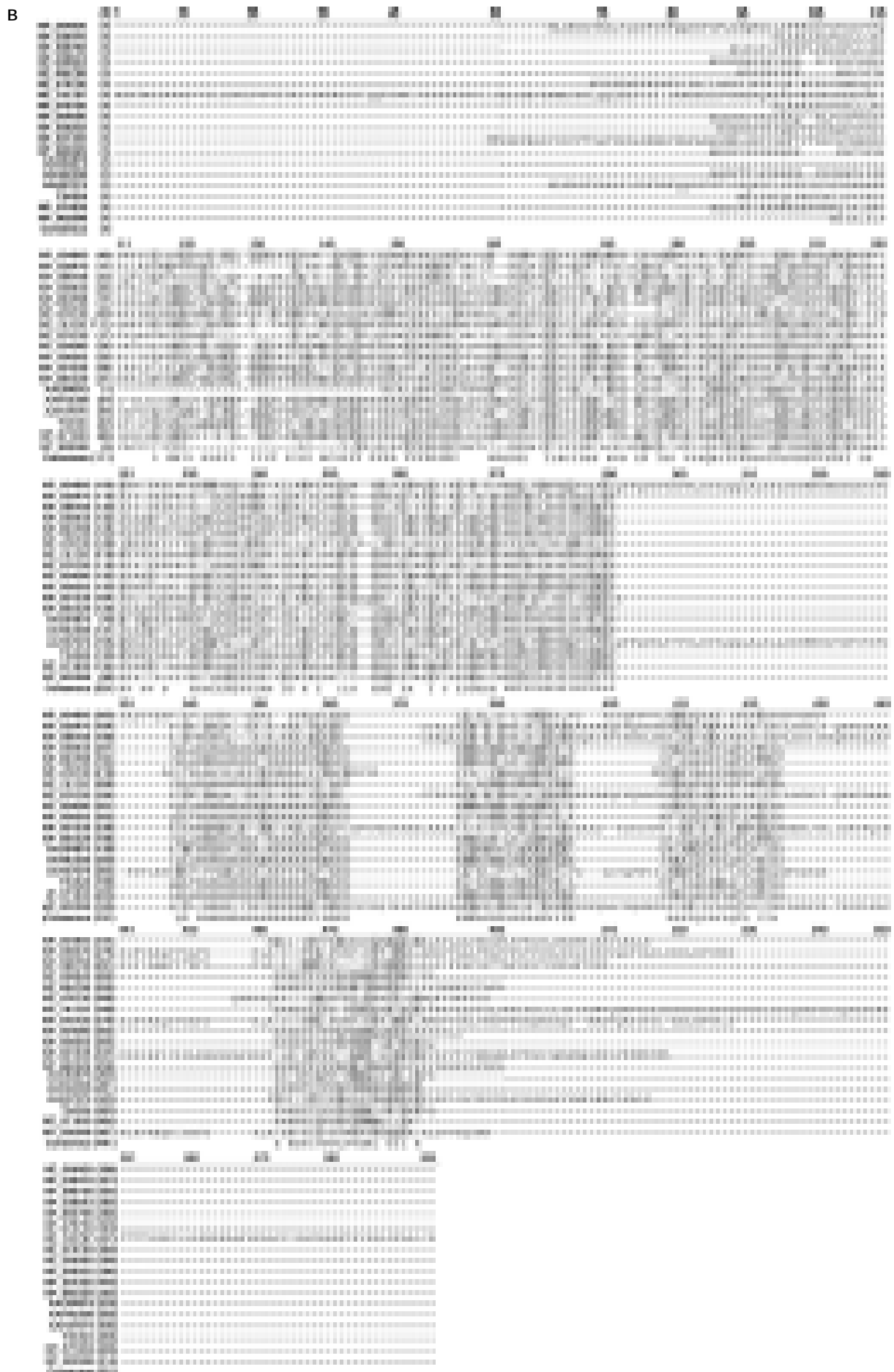


图4 SLP-2超家族不同成员的相关性. A: CLUSTAL软件预测SLP-2超家族不同成员的相关性; B: CLUSTAL软件分析SLP-2超家族不同成员的同源性.

表1 stomatin 超家族的不同成员

蛋白质	登录号	物种来源	氨基酸数目
stomatin	NP_004090	Homo sapiens	288 aa
stomatin	NP_038543	Mus musculus	284 aa
stomatin	NP_571833	Danio rerio (zebrafish)	284 aa
UNC-1	NP_508202	Caenorhabditis elegans	285 aa
	T34324	Caenorhabditis elegans	282 aa
MEC-2	NP_741797	Caenorhabditis elegans	481 aa
UNC-24	NP_501335	Caenorhabditis elegans	415 aa
SLP-1	NP_004800	Homo sapiens	398 aa
SLP-1	AAH37074	Mus musculus	399 aa
SLP-1	NP_476730	Drosophila melanogaster	322 aa
SLP-2	NP_038470	Homo sapiens	356 aa
SLP-2	NP_075720	Mus musculus	353 aa
SLP-3	NP_660329	Homo sapiens	291 aa
SLP-3	NP_694796	Mus musculus	287 aa
slp	AAC64873	Rhizobium etli	222 aa
	AAH42356	Xenopus laevis	281 aa
	NP_596756	Schizosaccharomyces pombe	354 aa
	NP_902598	Chromobacterium violaceum ATCC 12472	313 aa

2.3 SLP-2 超家族不同成员的相关性 从NCBI蛋白质数据库中调取 stomatin 超家族不同成员的氨基酸序列(表1),利用 CLUSTAL 软件对其进行相关性分析.结果表明,所有这些 stomatin 的同源蛋白和来自其他物种(如小鼠和斑马鱼)的 stomatin 在结构上都具有典型的N-端疏水性结构域和决定 stomatin 基因家族的一致氨基酸序列(如RX2(L/I/V)(S/A/N)X6(L/I/V)DX2TX2WG(L/I/V)(K/R/H)(L/I/V)X(K/R)(L/I/V)E(L/I/V)(K/R). SLP-2 蛋白具有 stomatin 基因家族所共有的一致序列,但不具有 stomatin 基因超家族所共有的N-端疏水性结构域(图4A,4B).

2.4 SLP-2 蛋白的结构域 从NCBI蛋白质数据库中调取 SLP-2 蛋白的氨基酸序列,利用 SMART 软件对其进行结构域预测.结果表明,SLP-2 蛋白具有一个 PHB 结构域(多肽链的52位氨基酸至211位氨基酸之间的肽段)和一个富含螺旋的区域(多肽链的231位氨基酸至252位氨基酸之间的肽段).

3 讨论

Stomatin 基因定位于 9q34.1, 编码 M_r31 000 的整合膜蛋白^[14-15]. Stomatin 蛋白在结构上具有由 23 个氨基酸残基组成的特征性 N-端疏水性结构域,这个结构域附近的 Cys²⁹ 是主要的棕榈酰化位点^[15-16]; 跨膜片段的远端氨基酸序列是亲水性的,可能形成双向 β-折叠和 α-螺旋结构; C-端结构域朝向胞质^[15]. Stomatin 蛋白的 Ser⁹ 可以被磷酸化,含有这个磷酸化位点的 N-端序列邻近 N-端疏水性结构域,并朝向胞质^[15,17]. 在脊椎动物中发现的 stomatin 的同源物有 SLP-1 (stomatin-like protein 1, SLP-1)、SLP-2 和 SLP-3 (stomatin-like protein 3, SLP-3)^[15,18]. SLP-1 与 UNC-24 最为相似,主

要分布于脑,而不出现于成熟红细胞中^[15,19]. SLP-3 是从嗅觉上皮中分离的嗅觉神经元蛋白^[18]. 所有这些 stomatin 的同源蛋白和来自其他物种(如小鼠和斑马鱼)的 stomatin 在结构上都具有典型的N-端疏水性结构域和决定 stomatin 基因家族的一致氨基酸序列. 这表明 stomatin 及其同源物可能作为离子通道和细胞骨架之间的连接分子,从而影响通道的稳定性和质膜的组织^[15].

SLP-2 是从人心脏 cDNA 文库中得到的 stomatin 的同源物,是 stomatin 基因超家族的一员^[15,20]. SLP-2 基因定位于 9p13.1,由 10 个外显子和 9 个内含子组成,长约 3 250 bp,编码长约 1.5 kb 的 mRNA,指导有 356 个氨基酸组成的多肽链的合成^[15,20]. SLP-2 蛋白由 3 个主要的结构域组成: N-端 α-螺旋区、由 α-螺旋和 β-折叠交替组成的结构域和 C-端结构域. SLP-2 蛋白在人体组织中广泛分布.它具有 stomatin 基因家族所共有的一致序列,但不具有 stomatin 基因超家族所共有的 N-端疏水性结构域. 与人 SLP-1 不同,他也出现在成熟红细胞膜中,并且与血影蛋白-肌动蛋白细胞骨架相结合,也可能与其他膜整合蛋白结合,但其本身并不整合到膜双层中. SLP-2 可能作为外周膜蛋白将 stomatin 或其他整合膜蛋白与细胞骨架联系起来,从而调控离子通道的传导、鞘脂和富含胆固醇的脂质筏的组织^[15,20].

SLP-2 mRNA 编码区中有 3 个潜在的翻译起始位点,可能负责组织特异性的翻译. COS 细胞的 Western blot 结果显示,SLP-2 蛋白呈现 3 条带, M_r 分别为 45 500, 44 600 和 34 300^[15,20],表明 SLP-2 具有潜在的生物学功能.应用 cDNA microarray 技术比较分析了食管鳞癌/正常配对组织的基因表达谱,首次发现 SLP-2 在食管鳞癌中表达上调.目前尚无 SLP-2 参与肿瘤发生的相关报道. RT-PCR 和 Northern blot 验证了在食管鳞癌组织中高表达,并在多种组织中都有表达. SLP-2 生物信息学分析表明,SLP-2 蛋白具有一个 PHB 结构域,这个结构域是 prohibitin 的同源物.这些都为阐明 SLP-2 与食管鳞癌发生发展的关系奠定了良好的基础.

4 参考文献

- 1 王群,杨翠红,周津,王秀琴,周传农,刘芝华,吴旻. 食管癌表达上调基因 EC45 cDNA 的克隆. 自然科学进展 2001;11:217-221
- 2 Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, Liu Y, Wang HX, Liu F, Wang K, Zhang DC, Wang Y, Wu M, Qian XH, Zhao XH. Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol* 2003;9:650-654
- 3 Zhao XJ, Li H, Chen H, Liu YX, Zhang LH, Liu SX, Feng QL. Expression of e-cadherin and β-catenin in human esophageal squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:225-232
- 4 Wang HT, Kong JP, Ding F, Wang XQ, Wang MR, Liu LX, Wu M, Liu ZH. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA Microarray. *World J Gastroenterol* 2003;9:392-398
- 5 Zhang W, Bailey-Wilson JE, Li W, Wang X, Zhang C, Mao X, Liu Z, Zhou C, Wu M. Segregation analysis of esophageal cancer in a moderately high-incidence area of northern China.

- Am J Hum Genet* 2000;67:110-119
- 6 Wang DX, Li W. Advances on pathogenesis of esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1029-1030
 - 7 Hu SP, Yang HS, Shen ZY. Study on etiology of esophageal carcinoma: retrospect and prospect. *Zhongguo Aizheng Zazhi* 2001;11:171-174
 - 8 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
 - 9 Pawletz CP, Ornstein DK, Roth MJ, Bichsel VE, Gillespie JW, Calvert VS, Vocke CD, Hewitt SM, Duray PH, Herring J, Wang QH, Hu N, Linehan WM, Taylor PR, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Petricoin EF 3rd. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:6293-6297
 - 10 Zhou G, Li H, DeCamp D, Chen S, Shu H, Gong Y, Flaig M, Gillespie JW, Hu N, Taylor PR, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Petricoin EF 3rd, Zhao Y. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:117-124
 - 11 Cui YP, Wang JB, Zhang XY, Bi MX, Guo LP, Lu SH. Using yeast two-hybrid system to identify ECRG2 associated proteins and their possible interactions with ECRG2 gene. *World J Gastroenterol* 2003;9:1892-1896
 - 12 Zhou J, Zhao LQ, Xiong MM, Wang XQ, Yang GR, Qiu ZL, Wu M, Liu ZH. Gene expression profiles at different stages of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:9-15
 - 13 Su H, Hu N, Shih J, Hu Y, Wang QH, Chuang EY, Roth MJ, Wang C, Goldstein AM, Ding T, Dawsey SM, Giffen C, Emmert-Buck MR, Taylor PR. Gene expression analysis of esophageal squamous cell carcinoma reveals consistent molecular profiles related to a family history of upper gastrointestinal cancer. *Cancer Res* 2003;63:3872-3876
 - 14 Stewart GW. Stomatin. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:271-274
 - 15 Wang Y, Morrow JS. Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin (band 7.2b) present in erythrocytes and other tissues. *J Biol Chem* 2000;275:8062-8071
 - 16 Snyers L, Umlauf E, Prohaska R. Cysteine 29 is the major palmitoylation site on stomatin. *FEBS Lett* 1999;449:101-104
 - 17 Salzer U, Ahorn H, Prohaska R. Identification of the phosphorylation site on human erythrocyte band 7 integral membrane protein: implications for a monotopic protein structure. *Biochim Biophys Acta* 1993;1151:149-152
 - 18 Goldstein BJ, Kulaga HM, Reed RR. Cloning and characterization of SLP-3: a novel member of the stomatin family expressed by olfactory receptor neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003;4:74-82
 - 19 Seidel G, Prohaska R. Molecular cloning of hSLP-1, a novel human brain-specific member of the band 7/MEC-2 family similar to *Caenorhabditis elegans* UNC-24. *Gene* 1998;225:23-29
 - 20 Owczarek CM, Treutlein HR, Portbury KJ, Gulluyan LM, Kola I, Hertzog PJ. A novel member of the STOMATIN/EPB72/mec-2 family, stomatin-like 2 (STOML2), is ubiquitously expressed and localizes to HSA chromosome 9p13.1. *Cytogenet Cell Genet* 2001;92:196-203

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004 年版(第四版)。本版核心期刊研究, 被列为“2001 年国家社会科学基金项目”。该书定于 2004 年 7 月由北京大学出版社出版。

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

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

携带mIL-12基因的增生型腺病毒对小鼠移植胃癌的治疗作用

薛绪潮, 方国恩, 王星华, 刘芳, 毕建威, 曹贵松, 钱其军

薛绪潮, 方国恩, 毕建威, 曹贵松, 中国人民解放军第二军医大学附属
长海医院普外科 上海市 200433
王星华, 钱其军, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆医院病
毒-基因治疗实验室 上海市 200438
刘芳, 济南军区联勤部药材仓库门诊部 山东省济南市 250022
薛绪潮, 男, 1963-09-26生, 河南省鲁山县人, 汉族. 1987年第一军医大学
本科毕业, 2002年第二军医大学博士研究生毕业, 副教授. 主要从事胃肠外
科疾病研究.
国家自然科学基金国际合作重大项目资助, No.30120160823
国家“863”高技术研究发展计划基金资助, No. 2001AA217031
项目负责人: 钱其军, 200438, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学东方
肝胆医院病毒-基因治疗实验室. qianqj@yahoo.com
电话: 021-25070836 传真: 021-35030677
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-04

Therapeutic effect of replication-competent adenovirus-mediated transfer of interleukin-12 gene on the mouse transplanted gastric cancer *in vivo*

Xu-Chao Xue, Guo-En Fang, Xing-Hua Wang, Fang Liu, Jian-Wei Bi, Gui-Song Cao, Qi-Jun Qian

Xu-Chao Xue, Guo-En Fang, Jian-Wei Bi, Gui-Song Cao, Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Xing-Hua Wang, Qi-Jun Qian, Viro-Genetherapy Laboratory, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
Fang Liu, Clinic, Depository of Medicinal Materials, Combined Service Force Division, Jinan Military Area, Jinan 250022, Shandong Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30120160823, and the National “863” High-tech Research and Development Plan Foundation, No. 2001AA217031
Correspondence to: Dr. Qi-Jun Qian, Viro-Genetherapy Laboratory, Eastern Hepatobiliary Hospital, Shanghai Second Military Medical University, Shanghai 200438, China. Qianqj@yahoo.com
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-03-04

Abstract

AIM: To study the treatment of the replication-competent adenovirus-mediated transfer of interleukin-12 gene in the mouse transplanted with gastric cancer *in vivo*, and to explore the new therapeutic approach of gastric cancer.

METHODS: The efficacy of CNHK200-mIL-12, ONYX-015, Ad-mIL-12 was tested in nude mice and 615 mice with subcutaneous human SGC-7901 and MFC 615 mice carcinomas. The immunological mechanism in xenografts gastric tumor of mice was further analyzed.

RESULTS: The replication-competent adenovirus-mediated transfer of interleukin-12 gene slowed down the tumor progress. This might be caused by the proliferation of the replication-competent adenovirus. Ad-mIL-12 had little

effect on the transplanted tumor in nude mice. While 615 mice bearing MFC gastric cancer presented the best anti-cancer effects. Administration of Ad-mIL-12 was showed to delay the growth of transplanted MFC tumor markedly ($P < 0.001$), and mediate complete regression of 3/10 established tumor. In the setting of CNHK200-mIL-12, the regression ratio was 4/10. Significantly prolonged survival was observed in both Ad-mIL-12 and CNHK200-mIL-12 experimental groups of MFC gastric tumor bearing mice. The analysis of the immunological mechanism in xenografts gastric tumor of mice 615 showed that the expression of IL-12 by CNHK200-mIL-12 and Ad-mIL-12 could greatly stimulate the immune response against the transplanted gastric tumor. It was found that these therapies could enhance the natural killer cell activity and specific cytotoxic T cell activity. The CD4⁺ and CD8⁺ T cell infiltrated into the tumor more significantly than that in the group of ONYX-015 and control ($P < 0.001$).

CONCLUSION: The replication-competent adenovirus can specifically replicate in tumor cells and kill the tumor cells. IL-12 is an effective cytokine stimulating anticancer immune responses. When combined, it is complementary resulting in a significantly improved treatment outcome.

Xue XC, Fang GE, Wang XH, Liu F, Bi JW, Cao GS, Qian QJ. Therapeutic effect of replication-competent adenovirus-mediated transfer of interleukin-12 gene on the mouse transplanted gastric cancer *in vivo*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1522-1526

摘要

目的: 研究携带mIL-12基因的增生型腺病毒对小鼠移植胃癌的治疗效果及其作用机制, 探讨胃癌治疗的新思路及途径.

方法: 以E1B55KDa缺失的增生型腺病毒ONYX-015、带有小鼠IL-12(mIL-12)基因的增生型腺病毒CNHK200-mIL-12以及非增生型腺病毒Ad-mIL-12治疗SGC-7901 BALB/C裸鼠及MFC 615小鼠胃癌移植模型, 从肿瘤大小及动物生存期等方面评价治疗效果; 并检测各治疗组的CD4⁺和CD8⁺淋巴细胞水平及NK和CTL细胞的杀伤活性, 探讨其免疫学作用机制.

结果: 实验证实增生型腺病毒(ONYX-015, CNHK200-mIL-12)可以有效地杀伤裸鼠体内的SGC-7901胃癌细胞, 但是不足以使其完全消退, 仅起到延缓生长的作用. 荷瘤615小鼠在注射Ad-mIL-12后部分(3/10)肿瘤消退, 余者(7/10)生长明显减慢, 肿瘤无破溃, 生存期明显延长; CNHK200-mIL-12治疗组部分肿瘤(4/10)停止生长, 1 wk

后开始缩小, 10-14 d 完全消退, 其余小鼠肿瘤(6/10)生长明显减慢, 肿瘤无破溃, 生存期明显延长. 免疫学检测发现各腺病毒治疗组的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞水平以及 NK、CTL 细胞的杀伤活性均高于对照组, 尤以携带 IL-12 基因者明显(P < 0.001).

结论: 以增生型腺病毒为载体携带 IL-12 基因可大量杀伤肿瘤细胞并与增生型腺病毒协同发挥抗肿瘤活性.

薛绪潮, 方国恩, 王星华, 刘芳, 毕建威, 曹贵松, 钱其军. 携带 mIL-12 基因的增生型腺病毒对小鼠移植胃癌的治疗作用. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1522-1526

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1522.asp>

0 引言

胃癌是一种高发、高恶性度、预后不良的恶性肿瘤, 目前主要以手术切除, 辅以放疗、化疗及免疫治疗等进行综合治疗. 由于胃癌起病隐匿, 早期诊断困难, 常延误治疗, 发现时往往已是中晚期, 而且手术完全切除率低, 复发率高, 术后放化疗的效果也不理想, 尤其对于晚期或有远处转移的患者, 尚缺乏有效的治疗手段, 亟需探索治疗胃癌的新方法^[1-7]. 随着人们对于肿瘤组织认识的不断深入以及细胞生物学、分子生物学的迅猛发展, 肿瘤的基因治疗成为当前研究的热点. IL-12 具有强大的抗肿瘤活性, 研究表明经 IL-12 可使肿瘤明显消退, 转移率和复发率降低, 还可拮抗肿瘤新生血管^[8-15]. 我们利用携带小鼠 IL-12 (mIL-12) 基因的增生型腺病毒对小鼠移植胃癌进行治疗观察, 并进一步探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ONYX-015(美国加州大学 Berk AJ 教授惠赠)及 CNHK200-mIL-12, Ad-mIL-12(本实验室构建^[16]), 经扩增、纯化, 用 Ad-buffer 调整病毒滴度为 1×10^{13} pfu/L. 其中 ONYX-015, CNHK200-mIL-12 为增生型腺病毒, Ad-mIL-12 为复制缺陷型腺病毒. 人胃癌细胞株 SGC-7901 及 615 小鼠胃癌细胞株 MFC 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心. 大鼠抗小鼠 CD4, CD8 单抗、FITC 标记的兔抗大鼠二抗购自美国 Pharmingen 公司. 10 g/L 钨酸溶液、25 g/L 戊二醛溶液、40 g/L 甲醛、醋酸铀等购自上海化学试剂有限公司. 615 小鼠, 4-6 周龄, 50 只, 体质量 18-23 g; Balb/c 裸鼠, 4-6 周龄, 50 只, 体质量 18-20 g, 均购自上海毕凯公司. 透射电镜、游标卡尺、二氧化碳孵箱、离心机、恒温水浴箱等.

1.2 方法 SGC-7901 用 100 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养, MFC 用 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养. 体外培养并收集胃癌细胞株 SGC-7901 细胞, 调整细胞悬液浓度 5×10^{10} /L, 于 Balb/c 裸鼠右季肋部皮下接种(0.1 mL/只), 7 d 后成瘤, 观察计算肿瘤体积, 计算

公式 $a \times b^2 \times 0.5$ (a 为肿瘤最大径, b 为前者垂直径). 收集体外培育小鼠细胞株 MFC 细胞, 调整细胞悬液浓度至 1×10^{11} /L, 于 615 鼠右季肋部皮下接种(0.1 mL/只), 5-7 d 后成瘤, 同样方法计算肿瘤体积. 615 小鼠共 60 只, 右季肋部皮下注射 1×10^7 MFC 细胞, 5 d 后肿瘤可见形成, 最大径约 5 mm, 随机分为 Ad-buffer (空白对照)、ONYX-015 及 Ad-mIL-12、CNHK200-mIL-12 四组, 每组 15 只; 分别于瘤内注射 Ad-buffer, ONYX-015, CNHK200-mIL-12 及 Ad-mIL-12 病毒悬液 100 μ L, 每天注射 1 次, 共 5 次(病毒总量为 5×10^9 pfu); 每周测量肿瘤大小 1 次, 取最大径(a)及其垂直径(b), 计算肿瘤体积; 治疗 1 wk 后, 每组取 5 只动物, 折颈处死, 切取肿瘤组织及脾脏进行免疫功能指标检测. 每组余 10 只荷瘤鼠观察生存情况. Balb/c 裸鼠治疗组 40 只, 皮下接种 SGC-7901, 肿瘤生长至 5-6 mm 后, 随机分为 4 组. 治疗方法同上. 观察荷瘤鼠治疗后生存情况.

1.2.1 NK 和 CTL 细胞活性检测 采用 4 h ⁵¹Cr 释放法. 经不同治疗的荷瘤小鼠 5 只, 杀死后取脾脏, 制备脾细胞悬液. 将 3×10^6 的脾细胞与 3×10^5 的 YAC-1 细胞置于 37^o 培养 2 h, 检测 NK 细胞活性. 将肿瘤细胞与脾细胞按 1:20 的比例混合, 加入重组的人 IL-2 200 ku/L, 置 50 mL/L CO₂, 37^o 中孵育 6 d, 分离淋巴细胞, Na⁵¹CrO₄ 标记的 MFC 细胞作为靶细胞, 效靶比 1:50 及 1:25, 检测 CTL 活性. 杀伤率 = (实验组 cpm - 自然释放组 cpm) / (最大释放组 cpm - 自然释放组 cpm) \times 100%.

1.2.2 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞流式细胞仪检测 取 615 小鼠肿瘤组织, 剪成小块, 过不锈钢网, 制备成单细胞悬液. PBS 洗 2 遍, 调整细胞浓度至 10^8 /L, 加入大鼠抗小鼠 CD4 和 CD8 单抗, 4^o 孵育 30 min, PBS 洗 2 遍, 再加入 FITC 标记的兔抗大鼠二抗, 4^o 孵育 30 min, PBS 洗 2 遍, 最后将细胞悬浮于 0.2 mL PBS 中, 进行流式细胞学分析, 检测 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞.

统计学处理 以一个重复测量的双因素方差分析及 Kaplan-Meier 生存分析.

2 结果

胃癌细胞株 SGC-7901 接种 Balb/c 裸鼠, 7-9 d 成瘤. MFC 细胞株接种 615 小鼠 5 d 即成瘤, 且肿瘤生长较快.

2.1 ONYX-015, CNHK200-mIL-12, Ad-mIL-12 对 Balb/c 裸鼠 SGC-7901 移植瘤的治疗 对照组肿瘤生长迅速, ONYX-015, CNHK200-mIL-12 治疗组, 在治疗期内肿瘤生长明显减慢, 有些肿瘤停止生长, 少数肿瘤缩小, 未见肿瘤消退现象, 与空白对照组及 Ad-mIL-12 相比, 差异显著(P < 0.05, 图 1). 对照组与 Ad-mIL-12 相比肿瘤生长速度相近, 无显著差异. 各试验组的生存期相比较, Ad-mIL-12 治疗组生存期未见延长, 二者相比差异不显著(t = 0.009, P > 0.05); ONYX-015,

CNHK200-mIL-12 组间差异不显著($t=5.73, P>0.05$, 图2). ONYX-015, CNHK200-mIL-12 组与对照组及 Ad-mIL-12 治疗组生存期相比差异显著.

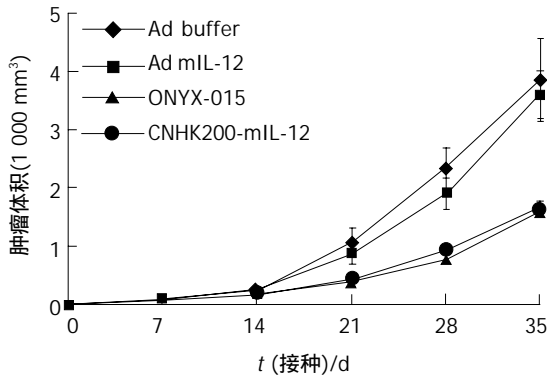


图1 裸鼠SGC-7901 移植瘤生长曲线.

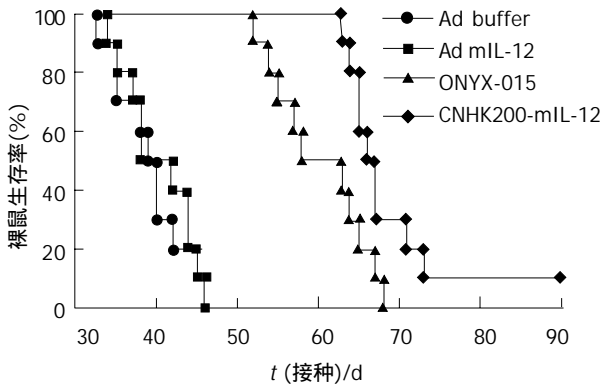


图2 接种SGC-7901 的裸鼠生存曲线.

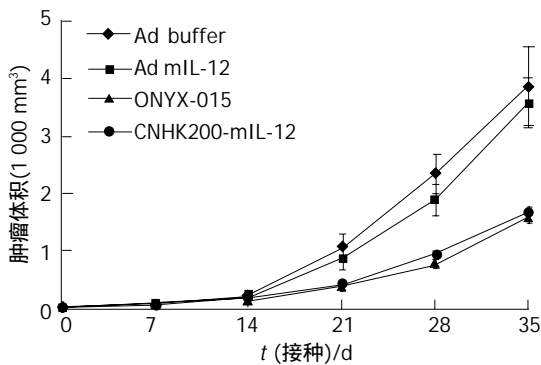


图3 615 小鼠 MFC 移植肿瘤的生长曲线.

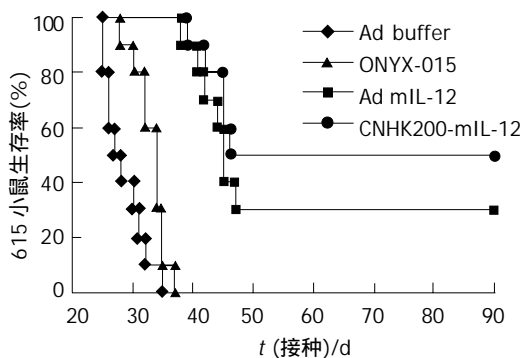


图4 接种 MFC 的 615 小鼠生存曲线.

2.2 ONYX-015, CNHK200-mIL-12, Ad-mIL-12 对 615 小鼠 MFC 移植瘤的治疗 Ad buffer 对照组, 肿瘤快速生长, 生存期短, 分别于接种肿瘤后 25-34 d 内死亡. 而 ONYX-015 治疗组小鼠肿瘤生长减慢, 肿瘤破溃延迟, 生存期比 Ad-buffer 组稍延长. CNHK200-mIL-12 治疗组实行治疗后 4 例肿瘤停止生长, 1 wk 后开始缩小, 10-14 d 完全消退. 6 例肿瘤生长明显减慢, 肿瘤无破溃, 生存期明显延长(图 3, 4). 但 CNHK200-mIL-12 治疗组 615 小鼠在治疗后及肿瘤消退后一段时间内均表现一些毒副作用. 如精神萎靡不振, 毛发失去光泽, 凌乱, 进食减少, 腹泻, 体重下降. 停止治疗 2 wk 左右后开始逐渐恢复正常, 肿瘤消退后, 小鼠可长期存活, 最长观察 6 mo 仍健康生存. 治疗后 6 wk, 对经治疗肿瘤消失的 615 小鼠再次于对侧皮下注射 1×10^7 MFC 细胞悬液, 观察 2 wk 未见成瘤. 证明经 CNHK200-mIL-12 治疗后 615 小鼠获得对 MFC 移植瘤免疫力. Ad-mIL-12 治疗组 7/10 肿瘤生长明显减慢, 肿瘤无破溃, 生存期明显延长, 3 例治疗后肿瘤消退, 与对照组相比具有显著差异.

2.3 ONYX-015, Ad-mIL-12, CNHK200-mIL-12 治疗后荷瘤 615 小鼠 NK 细胞和 CTL 细胞活性 单用 ONYX-015 可使荷瘤 615 小鼠 NK 和 CTL 活性比未治疗组略升高, 与对照组相比无显著差异; Ad-mIL-12、CNHK200-mIL-12 治疗后对荷瘤 615 小鼠 NK 和 CTL 活性较对照及 ONYX-015 升高更明显, 相比差异显著 ($P < 0.01$, 图 5, 6).

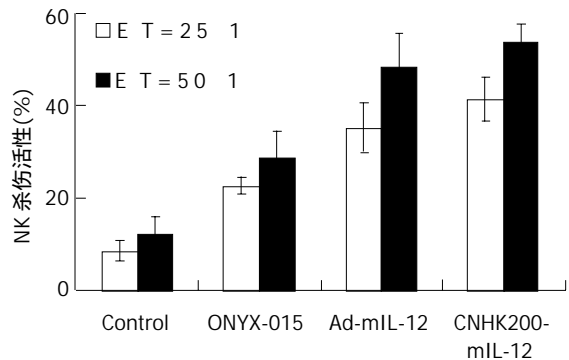


图5 荷瘤 615 小鼠 NK 细胞活性的变化.

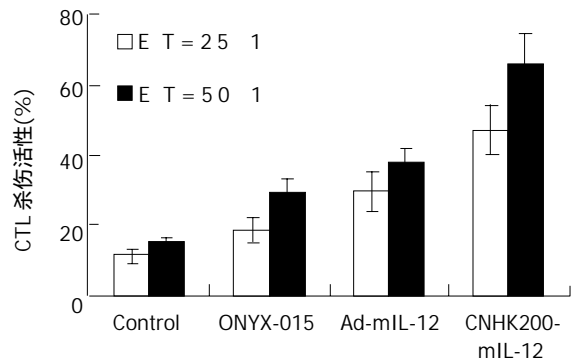


图6 ONYX-015, CNHK200-mIL-12 治疗后荷瘤 615 小鼠 CTL 细胞活性.

2.4 ONYX-015, Ad-mIL-12, CNHK200-mIL-12 治疗后荷瘤 615 小鼠 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞 MFC 细胞株为 615 小鼠自身胃癌肿瘤体外建株得来, 肿瘤恶性程度高, 生长迅速. 对裸鼠成瘤进行 ONYX-015, CNHK200-mIL-12, Ad-mIL-12 治疗后, 流式细胞仪检测显示, CNHK200-mIL-12, Ad-mIL-12 治疗组 CD4⁺, CD8⁺ 细胞阳性率增高, ONYX-015 次之, 对照组阳性率低(图 7).

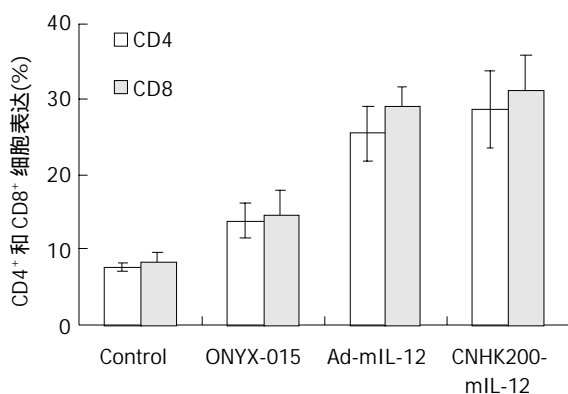


图 7 荷瘤 615 小鼠 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的表达.

3 讨论

传统基因治疗的非增生型病毒载体存在着转染效率低下、靶向性差等一些缺点^[17]. 增生型病毒利用肿瘤细胞与正常细胞之间一些结构或代谢途径上的差异, 使其可以特异性的靶向肿瘤细胞内复制. E1B-55KDa蛋白缺失的腺病毒感染 p53 功能正常的细胞后, 其 E1A 激活宿主细胞的 p53 途径, 该细胞将发生凋亡, 病毒不能有效复制, 而在 p53 功能异常的细胞(50%左右肿瘤细胞的 p53 功能异常)内则可以复制增生并最终将其裂解^[18]. ONYX-015 联合化疗治疗头颈部肿瘤已进入临床试验阶段, 并显示出良好的抗肿瘤能力和安全性^[19-23]. 但是由于肿瘤细胞的高度异质性、人体内普遍存在着腺病毒中和抗体以及肿瘤组织内部常有出血、坏死、纤维化等一些原因, ONYX-015 单剂应用的临床有效率仅为 15%^[24-25]. 因此, 联合其他一些治疗手段对于病毒治疗来说是非常重要和必要的. 除联合化疗外, 以增生型病毒作为转染抗癌基因的平台进行抗肿瘤治疗(我们称之为病毒-基因治疗), 也是一种非常有前景的治疗方案^[26-31]. 我们利用抗癌机制与 ONYX-015 相同的增生型腺病毒载体 CNHK200 携带小鼠 IL-12 基因治疗胃癌, 充分利用增生型病毒体积小、弥散能力强以及可以特异地在肿瘤细胞内复制等一些特点, 将抗癌基因携带至肿瘤病灶局部大量表达, 协同发挥抗肿瘤功能.

人腺病毒感染动物细胞(正常或肿瘤)后缺乏复制增生能力, 因此目前尚无理想的动物模型用于增生型腺病毒的体内实验^[32-33]. 为解决这一问题, 我们在本研究中选用两种不同的动物模型, 其中 615 小鼠具有正常的免疫功能, 可观察 IL-12 在体内的作用情况, 但不能用

于观察增生型腺病毒对肿瘤细胞杀伤情况; Balb/c 裸鼠 T 细胞免疫缺陷, 可以接种人肿瘤细胞, 因此可以观察病毒的复制增生对肿瘤的治疗作用, 但不适于观察目的基因的免疫效应对肿瘤的作用. 将二者结合起来即可较为全面地评估携带目的基因的增生型腺病毒对肿瘤的治疗作用. 通过实验我们观察到, 荷瘤 615 小鼠在注射腺病毒后肿瘤生长减缓、生存期延长. 进一步的免疫学检测发现各治疗组的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞水平以及 NK、CTL 细胞的杀伤活性均高于对照组, 尤以携带 IL-12 基因者明显. 这表明有免疫功能的动物感染腺病毒后, 会产生针对腺病毒的免疫反应, 并清除被感染的细胞, IL-12 则可以明显地放大这种免疫反应的效果. 在我们的实验中, 部分 615 小鼠移植瘤经携带 mIL-12 基因的腺病毒治疗后消退, 于其他部位再次注射 MFC 细胞不能成瘤, 这充分显示出 IL-12 强大的抗肿瘤活性及其抗肿瘤复发的功能. 另外, 通过我们的实验还证明了利用增生型腺病毒特异性靶向肿瘤细胞复制的特点可以有效地杀灭裸鼠体内的 SGC-7901 胃癌细胞. 同时, 我们发现单以增生型腺病毒不足以使其完全消退, 仅起到延缓生长的作用. 这可能是由于肿瘤组织内部存在着大量的纤维间隔以及坏死组织限制了腺病毒的感染能力造成的. 我们认为以增生型腺病毒为载体携带 IL-12 基因治疗肿瘤, 一方面可以利用增生型腺病毒特异地靶向肿瘤细胞复制、增生并最终将其裂解的特点, 大量杀伤肿瘤细胞; 另一方面可使 IL-12 基因在肿瘤病灶形成的局部高度表达发挥抗肿瘤活性, 而不增加其在系统中的水平(这一点对于 IL-12 这种剂量依赖型的细胞因子是非常重要的^[34-36]), 减少副作用^[37]. 当然, 我们在实验的过程中也注意到 CNHK200-mIL-12 治疗组 615 小鼠在治疗后及肿瘤消退后一段时间内均表现精神萎靡不振、毛发失去光泽、进食减少、腹泻、体重下降等一些毒副作用. 这说明增生型腺病毒载体的靶向性还有待于进一步的提高, 也为我们下一步的研究工作指明了方向.

4 参考文献

- 1 Wu GH, Zhang YW, Wu ZH. Modulation of postoperative immune and inflammatory response by immune-enhancing enteral diet in gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2001;7:357-362
- 2 Shi XY, Zhao FZ, Dai X, Ma LS, Dong XY, Fang J. Effect of jianpiyiwei capsule on gastric precancerous lesions in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:608-612
- 3 Yu Y, Zhang YC, Zhang WZ, Shen LS, Hertzog P, Wilson TJ, Xu DK. Ets1 as a marker of malignant potential in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2154-2159
- 4 Zhang J, Su XQ, Wu XJ, Liu YH, Wang H, Zong XN, Wang Y, Ji JF. Effect of body mass index on adenocarcinoma of gastric cardia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2658-2661
- 5 Guo HQ, Guan P, Shi HL, Zhang X, Zhou BS, Yuan Y. Prospective cohort study of comprehensive prevention to gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:432-436
- 6 Gulmann C, Hegarty H, Grace A, Leader M, Patchett S, Kay E. Differences in proximal (cardia) versus distal (antral) gastric carcinogenesis via the retinoblastoma pathway. *World J Gastroenterol* 2004;10:17-21

- 7 Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L, Liu YX. Correlation of tumor-positive ratio and number of perigastric lymph nodes with prognosis of patients with surgically-removed gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10:182-185
- 8 Su W, Ito T, Oyama T, Kitagawa T, Yamori T, Fujiwara H, Matsuda H. The direct effect of IL-12 on tumor cells: IL-12 acts directly on tumor cells to activate NF-kappaB and enhance IFN-gamma-mediated STAT1 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:503-512
- 9 Zhang R, DeGroot LJ. Genetic immunotherapy of established tumours with adenoviral vectors transducing murine interleukin-12 (mIL12) subunits in a rat medullary thyroid carcinoma model. *Clin Endocrinol (oxf)* 2000;52:687-694
- 10 Barajas M, Mazzolini G, Genove G, Bilbao R, Narvaiza I, Schmitz V, Sangro B, Melero I, Qian C, Prieto J. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology* 2001; 33:52-61
- 11 杨家和, 钱其军, 吴孟超, 郭亚军, 白介素-12: 重要的免疫调节因子. *世界华人消化杂志* 1999;7:71-72
- 12 魏道严, 戴冰冰, 王中和, 陈诗书. 腺病毒载体介导 mIL-12 基因治疗联合放射治疗小鼠肝癌的研究. *中华放射医学与防护杂志* 2001;21:279-281
- 13 Yamazaki M, Zhang R, Straus FH, Messina M, Robinson BG, Hashizume K, DeGroot LJ. Effective gene therapy for medullary thyroid carcinoma using recombinant adenovirus inducing tumor-specific expression of interleukin-12. *Gene Ther* 2002;9:64-74
- 14 Nasu Y, Bangma CH, Hull GW, Lee HM, Hu J, Wang J, McCurdy MA, Shimura S, Yang G, Timme TL, Thompson TC. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for prostate cancer: suppression of orthotopic tumor growth and pre-established lung metastases in an orthotopic model. *Gene Ther* 1999;6:338-349
- 15 Duda DG, Sunamura M, Lozonschi L, Kodama T, Egawa S, Matsumoto G, Shimamura H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S. Direct *in vitro* evidence and *in vivo* analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* 2000;60:1111-1116
- 16 薛绪潮, 方国恩, 张琪, 薛惠斌, 毕建威, 曹贵松, 钱其军. 增生型腺病毒载体介导 mIL-12 基因对胃癌细胞的杀伤作用(英文). *第二军医大学学报* 2004;25:75-79
- 17 Galanis E, Vile R, Russell SJ. Delivery systems intended for *in vivo* gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001;38:177-192
- 18 Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-376
- 19 Ganly I, Kirn D, Eckhardt G, Rodriguez GI, Soutar DS, Otto R, Robertson AG, Park O, Gullely ML, Heise C, Von Hoff DD, Kaye SB, Eckhardt SG. A Phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:798-806
- 20 Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Blackburn A, Romel L, Randlev B, Kaye S, Kirn D. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:289-298
- 21 Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 2000;6:879-885
- 22 Kirn D. Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:525-538
- 23 Makower D, Rozenblit A, Kaufman H, Edelman M, Lane ME, Zwiebel J, Haynes H, Wadler S. Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. *Clin Cancer Res* 2003;9:693-702
- 24 Heise C, Williams A, Olesch J, Kirn D. Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects. *Cancer Gene Ther* 1999;6:499-504
- 25 Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Maples P, Romel L, Randlev B, Reid T, Kaye S, Kirn D. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 2000;60:6359-6366
- 26 Steinwaerder DS, Carlson CA, Otto DL, Li ZY, Ni S, Lieber A. Tumor-specific gene expression in hepatic metastases by a replication-activated adenovirus vector. *Nat Med* 2001;7:240-243
- 27 钱其军, 刘新垣, 吴孟超. 肿瘤的基因-病毒治疗的研究热点. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2001;8:77-79
- 28 Kurihara T, Brough DE, Kovacs I, Kufe D. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest* 2000;106:763-771
- 29 Yu DC, Sakamoto GT, Henderson DR. Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Res* 1999;59:1498-1504
- 30 Wildner O, Blaese RM, Morris JC. Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 1999;59:410-413
- 31 Wildner O, Morris JC. The role of the E1B 55 kDa gene product in oncolytic adenoviral vectors expressing herpes simplex virus-tk: assessment of antitumor efficacy and toxicity. *Cancer Res* 2000;60:4167-4174
- 32 Prince GA, Porter DD, Jenson AB, Horswood RL, Chanock RM, Ginsberg HS. Pathogenesis of adenovirus type 5 pneumonia in cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *J Virol* 1993; 67:101-111
- 33 Torres JM, Alonso C, Ortega A, Mittal S, Graham F, Enjuanes L. Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol* 1996;70:3770-3780
- 34 Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* 2000; 65:2665-2670
- 35 Mazzolini G, Narvaiza I, Perez-Diez A, Rodriguez-Calvillo M, Qian C, Sangro B, Ruiz J, Prieto J, Melero I. Genetic heterogeneity in the toxicity to systemic adenoviral gene transfer of interleukin-12. *Gene Ther* 2001;8:259-267
- 36 Asselin-Paturel C, Megherat S, Vergnon I, Echchakir H, Dorothee G, Blesson S, Gay F, Mami-Chouaib F, Chouaib S. Differential effect of high doses versus low doses of interleukin-12 on the adoptive transfer of human specific cytotoxic T lymphocyte in autologous lung tumors engrafted into severe combined immunodeficiency disease-nonobese diabetic mice: relation with interleukin-10 induction. *Cancer* 2001; 91:113-122
- 37 Car BD, Eng VM, Lipman JM, Anderson TD. The toxicology of interleukin-12: a review. *Toxicol Pathol* 1999;27:58-63

Stat3 反义寡核苷酸对人胃腺癌 MKN45 细胞相关信号传导影响的研究

俞丽芬, 吴云林, 乔敏敏, 钟捷, 涂水平

俞丽芬, 吴云林, 乔敏敏, 钟捷, 涂水平, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科 上海市 200025
俞丽芬, 女, 1970-10-28 生, 浙江省萧山市人, 汉族, 2004 年上海第二医科大学医学博士, 主治医师, 讲师。
上海市科学技术委员会基金资助课题, No.024119114
项目负责人: 俞丽芬, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科. graceyu1028@sohu.com
电话: 021-64370045-665242 传真: 021-64373909
收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-16

Effect of Stat3 antisense oligonucleotide on signal transduction pathway related to human stomach adenocarcinoma MKN45 cell line

Li-Fen Yu, Yun-Lin Wu, Min-Min Qiao, Jie Zhong, Shui-Ping Tu

Li-Fen Yu, Yun-Lin Wu, Min-Min Qiao, Jie Zhong, Shui-Ping Tu, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China
Supported by Shanghai Science and Technology Committee Foundation, No.024119114
Correspondence to: Dr. Li-Fen Yu, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital of Shanghai Second Medical University, 197 Ruijiner Road, Shanghai 200025, China. graceyu1028@sohu.com
Received: 2004-03-05 Accepted: 2004-03-16

Abstract

AIM: To investigate the effect of antisense oligonucleotide (as-ODN) of Stat3 on the cell proliferation of human stomach adenocarcinoma cell line MKN45 and to determine the novel molecular target for treatment of gastric cancer.

METHODS: Stat3 as-ODN, a mixed backbone oligonucleic acid (MBO), was transfected into MKN45 cells mediated by liposomal reagent. The effect on cell proliferation was examined by MTT method. After transfection of Stat3 as-ODN, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and Western blot were used to detect the Stat3 DNA-binding activity and the expression of phospho-Stat3 protein, respectively.

RESULTS: Stat3 as-ODN could significantly inhibit the proliferation of MKN45 cells. After transfection of Stat3 as-ODN, both the constitutive activation of Stat3 and the expression of phospho-Stat3 protein were decreased 50.65% and 78.86%, respectively.

CONCLUSION: Stat3 as-ODN could remarkably inhibit the signal transduction of Stat3 in MKN45 cells. Activated Stat3 signaling in human stomach adenocarcinoma cell line provides a novel molecular target for therapeutic intervention of gastric cancer.

Yu LF, Wu YL, Qiao MM, Zhong J, Tu SP. Effect of Stat3 antisense oligonucleotide on signal transduction pathway related to human stomach adenocarcinoma MKN45 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1527-1530

摘要

目的: 通过研究 Stat3 反义寡核苷酸对人胃腺癌 MKN45 细胞增生活性的影响, 寻求胃癌治疗中相关信号传导途径的新靶点。

方法: Stat3 反义寡核苷酸是一种混合骨架寡核苷酸(MBO), 采用脂质体介导的方式将其转染人胃腺癌细胞株 MKN45; 通过 MTT 法观察转染前后对细胞增生状态的影响; 凝胶阻滞电泳(EMSA)和 Western blot 方法观察转染前后 Stat3 DNA 的结合活性和磷酸化 Stat3 蛋白表达的变化。

结果: Stat3 反义寡核苷酸对 MKN45 细胞的增生有明显抑制作用; 转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中 Stat3 信号的组成性激活水平和磷酸化 Stat3 蛋白的表达分别下降了 50.65% 及 78.86%。

结论: Stat3 反义寡核苷酸能显著抑制 MKN45 细胞中 Stat3 信号的传导, 胃癌细胞株中活化的 Stat3 信号可作为胃癌治疗新的分子靶点。

俞丽芬, 吴云林, 乔敏敏, 钟捷, 涂水平. Stat3 反义寡核苷酸对人胃腺癌 MKN45 细胞相关信号传导影响的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(7): 1527-1530
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1527.asp>

0 引言

信号传导及转录活化因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)是细胞因子和生长因子受体信号的下游效应物。目前在哺乳动物中已鉴定出 STAT 家族的 7 个成员, 即 Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b 和 Stat6。信号通常产生于细胞膜表面的受体, 然后传输至细胞核内, STAT 在细胞核内与特异性的 DNA 启动子结合, 调节相关基因的表达^[1]。Stat3 蛋白是近年来研究异常活跃的转录因子, 目前已确认 Stat3 信号途径是多种人类肿瘤干预治疗有效的分子靶之一^[1-4], 但是国内外关于 Stat3 在消化系统疾病中的研究才刚刚起步, 发展前景广阔。反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, as-ODN)是人工合成并经化学修饰

的寡核苷酸片段,能通过自身设计的特定序列与靶 mRNA 结合,在基因水平干扰致病蛋白的产生.由于其高度的选择性和较低的副作用,as-ODN 类药物已成为近年来药物研究和开发的热点^[5-7].国内文献报道的反义寡核苷酸几乎均为硫代修饰的寡核苷酸,而我们所采用的反义寡核苷酸为混合骨架寡核苷酸(mixed backbone oligonucleic acid, MBO),在安全性和有效性方面要优于第一代反义寡核苷酸.作者拟通过探讨 Stat3 反义寡核苷酸对人胃癌 MKN45 细胞增生活性的影响,寻求胃癌治疗中相关信号传导途径的新靶点.

1 材料和方法

1.1 材料 脂质体转染试剂盒(Oligofectamine),Invitrogen 公司;转染细胞的寡核苷酸由上海博亚生物工程有限公司合成与纯化,为全硫代修饰,并在末端各 5 个碱基的 2'-O 位上进行了甲氧基修饰;Stat3 反义寡核苷酸序列 5'-GCT CCA GCA TCT GCT GCT TC-3',错配寡核苷酸序列 5'-GCT CCA ATA CCC GTT GCT TC-3'^[8]. 四氮唑盐(MTT),上海实生细胞生物技术有限公司.二甲亚砜(DMSO),德国 Merck 公司.细胞核蛋白抽提试剂盒和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒, Pierce 公司; [γ -³²P] dATP, PerkinElmer 公司; Stat3 双链脱氧寡核苷酸探针由上海生工公司合成, PAGE 纯化,序列如下:正义链 5'-TCG ACA TTT CCC GTA AAT C-3',反义链 5'-GAT TTA CGG GAA ATG TCG A-3'; EMSA 试剂盒, Promega 公司; MicroSpin™ G-25 柱, Amersham Biosciences 公司.兔抗人多克隆抗体 Phospho-Tyr705-Stat3, Cell Signaling 公司; β -actin 单克隆抗体, Sigma 公司; 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG, Santa Cruze 公司; MagicMarker, Invitrogen 公司; Hybond-C 膜, Amersham Biosciences 公司.

1.2 方法 低分化人胃癌细胞株 MKN45 由本实验室传代培养,细胞在含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中生长,细胞培养条件为 37℃, 50 mL/L CO₂. 脂质体转染按照试剂盒说明的操作步骤进行,分为反义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组、空脂质体组和对照组,以无血清培养基稀释至所需浓度, 37℃ 孵育 4 h,然后按比例加入等体积的 300 mL/L 胎牛血清,使培养基的终浓度恢复为 100 mL/L 胎牛血清.

1.2.1 细胞生长曲线 取对数生长期的 MKN45 细胞用 RPMI 1640 培养基稀释成为含细胞 0.5×10^7 /L 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,培养 24 h 使之贴壁;弃旧培养液后,分别将 Stat3 反义寡核苷酸、错配寡核苷酸和脂质体以无血清培养基稀释至所需浓度加入反义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组和空脂质体组内,其余步骤按操作说明进行,对照组加 100 mL/L 胎牛血清 RPMI 1640 培养基.分别于转染后 24 h, 48 h, 72 h 弃培养液,每孔加入 1 g/L 的 MTT 100 μ L,继续培养 4 h,每孔加入 DMSO 200 μ L,酶标仪于 570 nm 处测定各孔吸

光度 A 值,绘制生长曲线.

1.2.2 凝胶迟滞电泳 细胞核蛋白的抽提和蛋白浓度测定步骤均按照 Pierce 公司的操作说明进行,分为反义寡核苷酸组、错配寡核苷酸组、空脂质体组和对照组.探针按照凝胶迟滞电泳(EMSA)试剂盒说明进行 γ -³²P-dATP 标记,终浓度为 1.75 fmol/L.根据蛋白浓度,在同一实验中取等量的核蛋白样品.结合反应体系包括核蛋白 10 μ g, 5 \times 结合缓冲液.于室温中向上述反应体系加入同位素标记的寡核苷酸探针 1 μ L,总反应体系为 20 μ L,冰上孵育 30 min 后上样.制备 50 mL/L 非还原聚丙烯酰胺凝胶,电泳缓冲液为 1 \times TBE,电流 20 mA,预电泳 1 h 后加样;再电泳 90 min 后干胶仪干胶、压片、-80℃ 曝光 24-72 h 后显影.运用美国 Bio-Rad 公司的 Fluor-S™ Multimager 扫胶仪,以 Quantity one 软件进行灰度分析比较.

1.2.3 Western blot 法 以 100 μ g 胞核蛋白为加样量进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移至 hybond-C 膜;以 β -actin 监测各泳道蛋白加样量是否均等;以 MagicMarker 确定目标蛋白的分子质量;以 TBS 对膜进行漂洗,室温下封闭 1 h (封闭液含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS);膜与磷酸化多克隆抗体 Stat3 (稀释度 1:200) 室温下共同孵育 2 h;膜与碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 室温下共同孵育 1 h,最后进行蛋白条带的显色.运用美国 Bio-Rad 公司的 Fluor-S™ Multimager 扫胶仪,以 Quantity one 软件进行灰度分析比较.

2 结果

2.1 转染 Stat3 反义寡核苷酸后对 MKN45 细胞增生的影响 MTT 法显示转染不同浓度的 Stat3 反义寡核苷酸后, MKN45 细胞的增生水平受到不同程度的抑制.当反义寡核苷酸的浓度为 300 nmol/L 时 MKN45 细胞的生长受到明显抑制(生长抑制率为 54.72%,表 1),而对照组、空脂质体组和转染错配寡核苷酸组细胞的生长情况未受显著影响,抑制作用在转染后 48 h 最强.

2.2 转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中 Stat3 组成性激活状态的变化 凝胶迟滞电泳(EMSA)结果显示转染 Stat3 反义寡核苷酸(浓度为 300 nmol/L)后, MKN45 细胞中 Stat3 DNA 的结合活性水平较对照组下调了 50.65%,而相应的空脂质体组和转染错配寡核苷酸组的变化却不明显(图 1).

2.3 转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中磷酸化 Stat3 蛋白(P-Stat3)表达的变化 磷酸化 Stat3 抗体能与磷酸化的 Stat3 酪氨酸 705 位点反应,提示检测的是 Stat3 的活性状态.对 Western blot 的电泳结果进行蛋白条带灰度分析后发现,转染 Stat3 反义寡核苷酸(浓度为 300 nmol/L)后, MKN45 细胞中 P-Stat3 蛋白的表达较对照组减少了 78.86%,而空脂质体组和转染错配寡核苷酸组的 P-Stat3 蛋白表达变化不明显(图 2).

表 1 不同浓度的 Stat3 反义寡核苷酸转染后 48h 对 MKN45 细胞增生的影响 (mean±SD)

浓度(nmol/L)	0	150	200	250	300	350
570nm的吸光值	0.53±0.07	0.33±0.03	0.40±0.06	0.29±0.03	0.24±0.03	0.30±0.04



图 1 EMSA 电泳显示转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中 Stat3 组成性激活水平的变化. 1: 对照组; 2: 空脂质体组; 3: 竞争性探针; 4: 错配寡核苷酸组; 5: 反义寡核苷酸组.

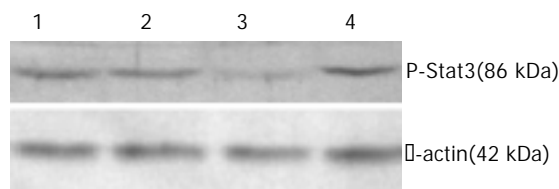


图 2 Western blot 电泳显示转染反义寡核苷酸后 MKN45 细胞中磷酸化 Stat3 蛋白表达的变化. 1: 空脂质体组; 2: 错配寡核苷酸组; 3: 反义寡核苷酸组; 4: 对照组.

3 讨论

相对正常的细胞和组织而言,大多数人类原发癌灶及肿瘤细胞株中都有STAT的组成性激活.目前国外有关STAT信号传导途径的研究正蓬勃发展,但大部分多集中在恶性血液系统疾病(白血病、淋巴瘤和多发性骨肉瘤)和头颈部肿瘤、乳癌和前列腺癌等方面^[3-4,9-11],有关该信号途径与消化系统疾病的关系报道相对甚少^[12-17].Stat3在胃癌细胞株方面的研究仅有日本学者的一篇报道^[18],着重探讨了MEK-ERK途径.许多研究表明,作为STAT家族一员的Stat3能编码凋亡抑制剂和细胞周期调节剂,通过上调Bcl-x_L、Mcl-1、cyclins D1/D2和c-myc基因的作用参与肿瘤的形成^[2-3],提示通过抑制Stat3信号途径的组成性激活,可抑制体内外肿瘤细胞的生长,为人类肿瘤的干预治疗提供了一种新的方式.

我们采用的反义寡核苷酸是一种混合骨架寡核苷酸(MBO),由DNA片段和RNA片段组合形成.不仅对整个序列进行了全硫代修饰,而且在序列两侧末端各5个碱基的2'-O位上进行了甲氧基修饰(RNA水平).反义DNA和RNA通过和细胞内基因或mRNA结合后,可封闭基因的转录或降解mRNA.据文献报道,MBO在PS-ODN的基础上降低了硫代磷酸二酯键的数量,减少了免疫反应,降低了体内降解速度并改变了核酸降解物的种类,从而减少了由硫代导致的副反应,提高了和RNA的结合能力并提高了RNase降解mRNA的能力.

采用反义寡核苷酸或非显性Stat3蛋白Stat3 β 阻断Stat3的DNA结合,进一步确定了Stat3在肿瘤形成过程中的重要作用^[4,11].马向涛 et al^[19]应用阳离子脂质体介导Stat3反义寡核苷酸转染人结肠癌SW480与HCT116细胞,阻断其Stat3通路,探讨了Stat3信号传导通路对结肠癌细胞G₁-S期调控的可能机制.结果发现,转染Stat3反义寡核苷酸后结肠癌细胞增生受抑制,Stat3,p-Stat3,G₁期cyclins,CDK_s表达水平下降,p21与p27表达水平上升.认为Stat3信号传导通路可能通过调节CDK/cyclin复合物与CKI成员之间的平衡而调节结肠癌细胞G₁-S期的转换.

EMSA方法具有所需细胞核蛋白量少(5-20 μ g)、灵敏度和特异性高、能检测Stat3与DNA的结合活性等特点,是研究核转录因子的首选方法.此外以混合骨架寡核苷酸直接干预Stat3信号的活化,当Stat3反义寡核苷酸的浓度为300 nmol/L时MKN45细胞的生长受到明显抑制(细胞的生长抑制率>50%),而对照组、空脂质体组和转染错配寡核苷酸组细胞的生长情况未受显著影响,抑制作用在转染后48h最强.转染反义寡核苷酸后,MKN45细胞中Stat3信号的组成性激活水平和磷酸化Stat3蛋白的表达明显下降,提示Stat3反义寡核苷酸能显著抑制MKN45细胞中Stat3信号的传导.

癌症患者可能会对任何一种单一的治疗如酪氨酸激酶抑制剂产生耐受,因此需要更为有效的治疗措施.在药物开发过程中,通过对STAT结构和活性的关系研究,需设计特异性的分子检测手段应用于药物的改进中,评估Stat3 DNA的结合活性以及对相关基因的调控能力.临床上,通过对肿瘤患者的活检,应用免疫组织化学方法观察Stat3的酪氨酸磷酸化形式的表达情况,为监测Stat3信号的有效抑制提供适宜的分子标志.总之,开发肿瘤治疗分子靶点Stat3的抑制剂,有助于进一步探究该蛋白在人类肿瘤中所起的重要作用.

4 参考文献

- Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19:2468-2473
- Turksoy J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000;19:6613-6626
- Bowman T, Garcia R, Turksoy J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-2488
- Song JJ, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 2000;19:2489-2495
- 王宏光, 李开宗, 龚科峰, 陈丹, 王春梅. 反义寡核苷酸在肝癌细胞中的分布及作用. *第四军医大学学报* 2002;23:1944-1947
- 王宏光, 李开宗, 龚科峰. 血管内皮生长因子反义寡核苷酸抑制肝癌的血管形成. *中华普通外科杂志* 2001;16:222-224
- 王雪琴, 杨林西, 韩跃武. 细胞周期素D1反义寡核苷酸对胃癌细胞株BGC-823的作用. *中国癌症杂志* 2003;13:222-224

- 8 Karras JG, McKay RA, Lu T, Pych J, Frank DA, Rothstein TL, Monia BP. STAT3 regulates the growth and immunoglobulin production of BCL(1) B cell lymphoma through control of cell cycle progression. *Cell Immunol* 2000;202:124-135
- 9 Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene* 2000;19:2511-2522
- 10 Lin TS, Mahajan S, Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 2000;19:2496-2504
- 11 Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:2499-2513
- 12 Starkel P, Bishop K, Horsmans Y, Strain AJ. Expression and DNA-binding activity of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic cirrhosis compared to normal liver and primary biliary cirrhosis in humans. *Am J Pathol* 2003;162:587-596
- 13 Tacchini L, Fusar-Poli D, Sironi M, Mantovani A, Bernelli-Zazzera A. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in rat liver after heat shock and reperfusion stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:316-323
- 14 Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, Eriksen KW, Woetmann A, Odum N. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:16777-16781
- 15 Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG, Yin Z, Kano A, Iwamoto Y, Li E, Craft JE, Bothwell AL, Fikrig E, Koni PA, Flavell RA, Fu XY. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1879-1884
- 16 Matsui T, Kinoshita T, Hirano T, Yokota T, Miyajima A. STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J Biol Chem* 2002;277:36167-36173
- 17 冯德云, 郑晖, 蒋海鹰, 颜亚辉, 谭怡, 程瑞雪. STAT3磷酸化与 c-fos 和 c-jun 蛋白表达在肝细胞癌发生中的作用. 湖南医科大学学报 2001;26:17-19
- 18 Kanai M, Konda Y, Nakajima T, Izumi Y, Kanda N, Nanakin A, Kubohara Y, Chiba T. Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) inhibits STAT3 activity involved in gastric cancer cell proliferation via MEK-ERK-dependent pathway. *Oncogene* 2003;22:548-554
- 19 马向涛, 王杉, 杜如昱, 叶颖江, 王殊, 严飞飞, 崔志荣. Stat3 信号传导通路对结肠癌细胞 G₁-S 期的调控. 北京大学学报(医学版) 2003;35:50-53

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

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

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

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

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

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

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

转化生长因子 β II 型受体在胃癌组织中表达的研究

张朋彬, 李宜辉, 徐采朴

张朋彬, 李宜辉, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院消化内科
重庆市 400037
徐采朴, 中国人民解放军第三军医大学西南医院消化内科 重庆市 400038
张朋彬, 男, 1966-04-13 生, 汉族, 河北省宁晋县人. 1999 年第三军医大学
新桥医院消化内科博士毕业, 主要从事消化道疾病的诊治.
项目负责人: 张朋彬, 40037, 重庆市新桥, 中国人民解放军第三军医大学新
桥医院消化内科. zpb666@sina.com
电话: 023-68774665
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-02-18

Expression of transforming growth factor β type II receptor in gastric carcinoma tissue

Peng-Bin Zhang, Yi-Hui Li, Cai-Pu Xu

Peng-Bin Zhang, Yi-Hui Li, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China
Cai-Pu Xu, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Peng-Bin Zhang, Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China. zpb666@sina.com
Received: 2004-02-11 Accepted: 2004-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of transforming growth factor β type II receptor (TGF β IIIR) in the gastric carcinoma tissue.

METHODS: Expression of TGF β IIIR was studied in 20 cases of normal gastric tissues and 74 gastric carcinoma tissues by immunohistochemical method.

RESULTS: In normal gastric tissue, TGF β IIIR was mainly expressed in the lower part of the gland, especially in the cytoplasm, and the expression was significantly decreased in well and moderately differentiated adenocarcinoma tissues ($P < 0.05$), and in poorly differentiated and mucinous or signet ring cell carcinoma tissues ($P < 0.01$) as compared with normal mucosa.

CONCLUSION: Decreased expression of TGF β IIIR may play a role in the development of gastric cancer.

Zhang PB, Li YH, Xu CP. Expression of transforming growth factor β type II receptor in gastric carcinoma tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1531-1533

摘要

目的: 研究转化生长因子 β (TGF β)II型受体在胃癌组织中的表达及其意义。

方法: 应用免疫组织化学方法,对20例正常胃粘组织及74例胃癌组织(高中分化腺癌32例,低分化腺癌23例,黏

液腺癌14例,印戒细胞癌5例) TGF β II型受体的表达情况进行了研究。

结果: 在正常胃黏膜组织, TGF β II型受体主要表达于腺体的体底部; 在胃高中分化腺癌组织中, TGF β II型受体表达减少($P < 0.05$, vs 正常胃黏膜); 在低分化腺癌及黏液印戒细胞癌中, 其表达明显减少(P 均 < 0.01 , vs 正常胃黏膜)。

结论: TGF β II型受体表达的减少可能在胃癌的发生发展中起了一定的作用。

张朋彬, 李宜辉, 徐采朴. 转化生长因子 β II 型受体在胃癌组织中表达的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1531-1533

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1531.asp>

0 引言

转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β)是一具有多功能的细胞因子^[1-4], 对细胞的生长分化具有重要的调节作用. 他可抑制多种细胞的生长, 并对一些肿瘤细胞具有生长抑制作用^[5-6]. 我们利用免疫组织化学方法, 对 TGF β II 型受体(TGF β II receptor, TGF β IIIR)在胃癌组织中的表达进行了研究如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我院 1999/2001 年手术切除胃癌石蜡标本 74 例, 高分化腺癌 32 例, 低分化腺癌 23 例, 黏液腺癌 14 例, 印戒细胞癌 5 例. 男 54 例, 女 20 例, 平均年龄 57.4 岁. 以癌旁正常胃黏膜组织 20 例作为正常对照. 标本连续切 5 μ m 厚切片, 供 HE 染色及免疫组织化学用。

1.2 方法 免疫组织化学采用 ABC 法, TGF β IIIR 抗体(兔抗人, 即用型)及 ABC 试剂盒均购自武汉博士德公司. 切片常规脱蜡水化, 30 mL/L H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶, 胰酶消化, 正常血清封闭, 加入 TGF β IIIR 4 过夜, 生物素化羊抗兔 IgG 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, ABC 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水、透明、封片. 以细胞质和 / 或细胞膜有棕黄色沉淀者为表达阳性细胞. 随机计数 100 个细胞, 观察其表达阳性率, 结果表示为无表达(-), 1-33% 阳性为(+), 34-66% 阳性为(++) >67% 阳性为(+++).

统计学处理 计数资料, 采用 χ^2 检验。

2 结果

在正常胃黏膜组织, 以腺体的颈部为界, TGF β IIIR 基

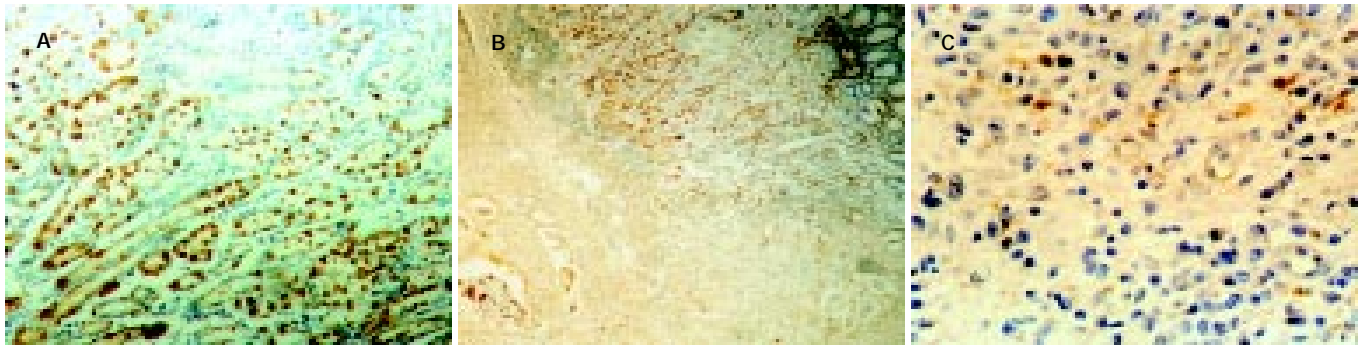


图1 A:正常胃黏膜组织, ABC × 100; 图B:高分化胃癌组织, ABC × 100; 图C: 低分化腺癌组织, ABC × 200.

本集中表达于腺体的中下部, 尤以壁细胞表达最为明显. 而在腺体表面的黏液细胞则几乎无表达(图1A). 在表达细胞中, TGFβIIIR 表达于细胞质及细胞膜上, 与TGFβ的表达非常相似. 在胃癌组织中, TGFβIIIR 的表达明显减少, 与正常胃黏膜组织相差非常显著(高中分化腺癌 $P < 0.05$, 低分化腺癌与黏液印戒细胞癌均 $P < 0.01$, 表1), 但与组织分化无关($P > 0.05$, 图1B, 图1C).

表1 TGFβIIIR 在正常胃黏膜组织及胃癌组织中的表达

组织学类型	n	TGFβIIIR 表达		
		+	++	+++
正常胃黏膜组织	20		13	7
高中分化腺癌 ^a	32	10	18	4
低分化腺癌 ^b	23	8	15	
黏液印戒细胞癌 ^b	19	11	8	

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 正常胃黏膜.

3 讨论

在信号传导时TGFβ首先与细胞膜上TGFβIIIR结合, 后者使I型受体加入这一复合体并被活化. 活化的受体通过激活细胞内Smad蛋白而将TGFβ信号传到细胞核. 在信号传导中, I型或II型受体的异常表达均可使TGFβ的信号传递中断或减弱^[7-9]. TGFβ除对正常细胞具有生长抑制作用外, 对癌细胞的生长也具有抑制作用, 并可引起癌细胞发生凋亡^[10-16]. 在肿瘤治疗中, 一些药物的部分疗效是通过诱导产生TGFβ而达到治疗目的的^[17-18]. 动物实验证明, TGFβ可抵抗化学诱癌剂的诱癌作用^[19]. 当TGFβIIIR表达异常, 造成TGFβ信号传递中断时, 则癌细胞就逃脱了TGFβ的抑制作用, 修复TGFβ信号后, 癌细胞又受到了TGFβ的抑制^[20-21].

表达异常的TGFβIIIR多是由于其基因709-718区的多聚腺苷酸Poly(A)₁₀中的腺苷酸的插入或缺失所造成. 该区域腺苷酸的插入或缺失, 使TGFβIIIR基因发生框架移动, 产生异常的II型受体或使其转录中断^[22-29]. 这种现象与微卫星不稳定性(microsatellite instability, MI)有关. 微卫星是指基因组中散在的较短的重复序列, 他在DNA复制时容易产生错配现象, 即易发生碱基的插

入或缺失, 这种错配可由体内的错配修复系统(mismatch repair, MMR)来纠正. 当该系统有缺陷, 不能纠正DNA的复制错误时, 便出现MI, 使相关基因自发突变率升高^[30-33]. Johansdottir et al^[34]发现, 在高MI患者TGFβIIIR突变率高达62%, 但该突变与肿瘤类型无关. 但也有研究发现, TGFβIIIR异常表达更多见于低分化腺癌及印戒细胞癌^[28]. Yang et al^[35]发现TGFβIIIR表达异常的胃癌细胞不受TGFβ抑制, 当对该细胞进行TGFβIIIR基因转染后, TGFβ又重新能够抑制该细胞的生长.

我们通过免疫组织化学方法, 发现在胃癌组织中, TGFβIIIR的表达明显减少($P < 0.01$), 说明TGFβ的信号传导出现了障碍, 阻断或减弱了TGFβ对胃癌细胞的生长抑制作用. 但TGFβIIIR的表达与胃癌组织分化程度无明显关系. TGFβIIIR表达的减少, 使胃细胞逃脱TGFβ的生长抑制作用, 对胃癌的发生发展起了一定的促进作用.

4 参考文献

- Xiong B, Gong LL, Zhang F, Hu MB, Yuan HY. TGF beta1 expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue. *World J Gastroenterol* 2002;8:496-498
- Xiong B, Yuan HY, Hu MB, Zhang F, Wei ZZ, Gong LL, Yang GL. Transforming growth factor-beta1 in invasion and metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:674-678
- Lu JP, Mao JQ, Li MS, Lu SL, Hu XQ, Zhu SN, Nomura S. In situ detection of TGF betas, TGF beta receptor II mRNA and telomerase activity in rat cholangiocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:590-594
- Shen H, Huang GJ, Gong YW. Effect of transforming growth factor beta and bone morphogenetic proteins on rat hepatic stellate cell proliferation and trans-differentiation. *World J Gastroenterol* 2003;9:784-787
- Mehra A, Wrana JL. TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol* 2002;80:605-622
- 陈修熙, 来茂德. 转化生长因子TGF-beta研究进展. *世界华人消化杂志* 2000;8:1405-1409
- Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002;296:1646-1647
- 张朋彬, 徐采朴. 转化生长因子β与胃癌. *华人消化杂志* 1998;6:630-631
- Pinto M, Oliveira C, Cirnes L, Carlos Machado J, Ramires M, Nogueira A, Carneiro F, Seruca R. Promoter methylation of TGFbeta receptor I and mutation of TGFbeta receptor II are frequent events in MSI sporadic gastric carcinomas. *J Pathol* 2003;200:32-38
- Fukushima T, Mashiko M, Takita K, Otake T, Endo Y, Sekikawa K, Takenoshita S. Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7

- genes in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22:315-320
- 11 Wong SF, Lai LC. The role of TGFbeta in human cancers. *Pathology* 2001;33:85-92
 - 12 Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003;94:230-234
 - 13 Katakura Y, Nakata E, Tabira Y, Miura T, Teruya K, Tsuchiya T, Shirahata S. Decreased tumorigenicity in vivo when transforming growth factor beta treatment causes cancer cell senescence. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67:815-821
 - 14 Yoo YD, Choi JY, Lee SJ, Kim JS, Min BR, Lee YI, Kang YK. TGF-beta-induced cell-cycle arrest through the p21(WAF1/CIP1)-G1 cyclin/Cdks-p130 pathway in gastric-carcinoma cells. *Int J Cancer* 1999;83:512-517
 - 15 Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschman T. Transforming growth factor beta1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res* 1999;59:3379-3386
 - 16 Reiss M. TGF-beta and cancer. *Microbes Infect* 1999;1:1327-1347
 - 17 Tavassoli M, Soltaninia J, Rudnicka J, Mashanyare D, Johnson N, Gaken J. Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF-beta1. *Carcinogenesis* 2002;23:1569-1575
 - 18 Hoffmann TK, Bojar H, Eckel J, van Lierop A, Balz V, Friebe-Hoffmann U, Hauser U, Bier H. Effects of tamoxifen on human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Anticancer Drugs* 2002;13:521-531
 - 19 Salatino M, Labriola L, Schillaci R, Charreau EH, Elizalde PV. Mechanisms of cell cycle arrest in response to TGF-beta in progesterin-dependent and -independent growth of mammary tumors. *Exp Cell Res* 2001;265:152-166
 - 20 Franchi A, Gallo O, Sardi I, Santucci M. Downregulation of transforming growth factor beta type II receptor in laryngeal carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2001;54:201-204
 - 21 Ramachandra M, Atencio I, Rahman A, Vaillancourt M, Zou A, Avanzini J, Wills K, Bookstein R, Shabram P. Restoration of transforming growth factor Beta signaling by functional expression of smad4 induces anoikis. *Cancer Res* 2002;62:6045-6051
 - 22 Kim JJ, Baek MJ, Kim L, Kim NG, Lee YC, Song SY, Noh SH, Kim H. Accumulated frameshift mutations at coding nucleotide repeats during the progression of gastric carcinoma with microsatellite instability. *Lab Invest* 1999;79:1113-1120
 - 23 Iacopetta BJ, Soong R, House AK, Hamelin R. Gastric carcinomas with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF-beta type II receptor, IGFII receptor, and BAX genes. *J Pathol* 1999;187:428-432
 - 24 Saeterdal I, Gjertsen MK, Straten P, Eriksen JA, Gaudernack G. A TGF betaRII frameshift-mutation-derived CTL epitope recognised by HLA-A2-restricted CD8+ T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:469-476
 - 25 房殿春, 周晓东, 罗元辉, 王东旭, 鲁荣, 杨仕明, 刘为纹. 胃癌微卫星不稳定性 and 抑癌基因杂合缺失. *世界华人消化杂志* 1999;7:479-481
 - 26 Miyajima A, Asano T, Seta K, Asano T, Kakoi N, Hayakawa M. Loss of expression of transforming growth factor-beta receptor as a prognostic factor in patients with renal cell carcinoma. *Urology* 2003;61:1072-1077
 - 27 Kim JJ, Baek MJ, Kim L, Kim NG, Lee YC, Song SY, Noh SH, Kim H. Accumulated frameshift mutations at coding nucleotide repeats during the progression of gastric carcinoma with microsatellite instability. *Lab Invest* 1999;79:1113-1120
 - 28 Takeno S, Wirtz HC, Lickvers K, Noguchi T, Scheven M, Willers R, Gabbert HE, Mueller W. Transforming growth factor beta type II receptor expression in gastric cancer: evidence for two independent subgroups. *Anticancer Res* 2002;22:2247-2252
 - 29 Nerlich AG, Sauer U, Ruoss I, Hagedorn HG. High frequency of TGF-beta-receptor-II mutations in microdissected tissue samples from laryngeal squamous cell carcinomas. *Lab Invest* 2003;83:1241-1251
 - 30 Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447-2454
 - 31 Duval A, Hamelin R. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann Genet* 2002;45:71-75
 - 32 Oda S, Maehara Y, Sumiyoshi Y, Sugimachi K. Microsatellite instability in cancer: what problems remain unanswered? *Surgery* 2002;131(1 Suppl):S55-S62
 - 33 康燕婕, 林娜, 振科. 胃癌中微卫星不稳定性及 DNA 错配修复系. *世界华人消化杂志* 2000;8:1139-1140
 - 34 Johannsdottir JT, Jonasson JG, Bergthorsson JT, Amundadottir LT, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S. The effect of mismatch repair deficiency on tumorigenesis; microsatellite instability affecting genes containing short repeated sequences. *Int J Oncol* 2000;16:133-139
 - 35 Yang HK, Kang SH, Kim YS, Won K, Bang YJ, Kim SJ. Truncation of the TGF-beta type II receptor gene results in insensitivity to TGF-beta in human gastric cancer cells. *Oncogene* 1999;18:2213-2219

World Journal of Gastroenterology 稿件管理

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

靶向 survivin 的 siRNA 对肝癌细胞生物学行为的影响

卢昕, 胡安斌, 张勇, 陈立波, 郑启昌

卢昕, 胡安斌, 张勇, 陈立波, 郑启昌, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022
卢昕, 男, 1971-06-17 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 2002 年华中科技大学同济医学院博士. 主治医师. 主要从事肝胆肿瘤的基因治疗研究.
国家自然科学基金资助项目, No.30271242
项目负责人: 郑启昌, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科. zqc654@21cn.com
电话: 027-62900023 传真: 027-62900023
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-04-27

Effect of siRNA targeting survivin gene on biological behavior of hepatocellular carcinoma

Xin Lu, An-Bin Hu, Yong Zhang, Li-Bo Chen, Qi-Chang Zheng

Xin Lu, An-Bin Hu, Yong-Zhang, Li-Bo Chen, Qi-Chang Zheng, Department of Liver and Biliary Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30271242
Correspondence to: Qi-Chang Zheng, Department of Liver and Biliary Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. zqc654@21cn.com
Received: 2004-04-04 Accepted: 2004-04-27

Abstract

AIM: To study the influence of siRNA targeting survivin on the biological behavior of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: One pair of 21 bp reverse repeated motifs of survivin target sequence with 9 spacer were synthesized and inserted into plasmid psilencer 2.1 to generate siRNA eukaryotic expression vector. After stable transfection into HepG2 cells, the biological behaviors of the survivin siRNA transfected HCC cells were observed.

RESULTS: The recombinant plasmid Psilence(+)-survivin was successfully constructed. survivin mRNA and protein expression inhibitory ratio reached 73% and 75% respectively. It was demonstrated that transfected cells with survivin siRNA were inhibited on growth and increased on apoptosis. Subsequent study in nude mouse model demonstrated lower succeeding rate in cells transfected with survivin siRNA and the tumor size from 9-30 day was $0.10 \pm 0.01 \text{ cm}^3$, $0.30 \pm 0.03 \text{ cm}^3$, $0.39 \pm 0.11 \text{ cm}^3$, $0.45 \pm 0.13 \text{ cm}^3$, $0.49 \pm 0.07 \text{ cm}^3$, $0.58 \pm 0.01 \text{ cm}^3$, $0.60 \pm 0.10 \text{ cm}^3$, and $0.65 \pm 0.07 \text{ cm}^3$ respectively. The difference was obvious ($P < 0.01$).

CONCLUSION: siRNA targeting survivin gene can specifically suppress survivin expression in HepG2 cells and inhibit tumor cells growth both *in vivo* and *in vitro*. This provides a theory basis to reverse the drug resistance in tumor cells.

Lu X, Hu AB, Zhang Y, Chen LB, Zheng QC. Effect of siRNA targeting survivin gene on biological behavior of hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(7):1534-1538

摘要

目的: 探讨转入靶向 survivin 的 siRNA 对肝癌细胞生物学行为的影响。

方法: 设计、合成一对 survivin 编码基因的反向重复序列, 中间间隔 9 个核苷酸序列, 通过定向克隆至载体 Psilencer 2.1, 构建 siRNA 真核表达载体, 经稳定转染 HepG2 细胞后对转基因后肿瘤细胞的生物学行为进行观察。

结果: 测序证实 siRNA 真核表达载体构建成功. 通过 RT-PCR 及流式细胞术检测, siRNA 在 mRNA 及蛋白质水平抑制 survivin 基因表达分别达 73% 和 75%. 转染细胞生长速度明显减慢, 凋亡率增加 15 倍. 裸鼠体内成瘤率下降 75%, 9-30 d 肿瘤体积分别为 $0.10 \pm 0.01 \text{ cm}^3$, $0.30 \pm 0.03 \text{ cm}^3$, $0.39 \pm 0.11 \text{ cm}^3$, $0.45 \pm 0.13 \text{ cm}^3$, $0.49 \pm 0.07 \text{ cm}^3$, $0.58 \pm 0.01 \text{ cm}^3$, $0.60 \pm 0.10 \text{ cm}^3$, $0.65 \pm 0.07 \text{ cm}^3$, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$).

结论: 靶向 survivin 的 siRNA 能有效降低目的基因的表达并能在体内体外抑制肝癌细胞株 HepG2 的生长. 为进一步逆转肿瘤细胞的耐药性提供了理论指导。

卢昕, 胡安斌, 张勇, 陈立波, 郑启昌. 靶向 survivin 的 siRNA 对肝癌细胞生物学行为的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1534-1538
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1534.asp>

0 引言

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一. 深入了解肝癌发病的分子机制以寻求新的治疗方法是提高肝癌整体疗效的关键. 目前研究已表明细胞凋亡障碍是肿瘤发生、发展过程中的重要事件^[1]. 肿瘤细胞对凋亡的抵抗性是他们 在缺氧及营养缺乏等异常生长环境下得以生存的重要原因^[2]. 抑制肿瘤细胞内与凋亡抵抗相关基因的表达不仅可诱导肿瘤细胞的凋亡而且还可选择性增加肿瘤细胞对以凋亡为机制的治疗方法的敏感性, 从而提高肿瘤病人的总体生存率^[3]. survivin 基因是迄今为止克隆出的最小凋亡抑制蛋白家族成员, 可通过抑制 caspase 级联反应下游的 caspase3, caspase7 发挥其抗凋亡作用^[4-5]. 现在研究已证实 survivin 基因参与了肝癌的发生与发展, 并且还 与化疗的耐药性相关^[6]. 降低 survivin 基因在肝癌

细胞中的表达不仅可诱导肿瘤细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞的生长, 还可增强其对化疗的敏感性, 从而提高肝癌治疗的整体疗效. 因此将 survivin 基因作为治疗肝癌的候选靶基因在理论上是可行的.

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是近年来发展起来的新技术, 具有抑制作用强、稳定性高、细胞摄取相对容易等优点^[7-8]. 目前 RNAi 在基因功能、抗肿瘤和抗病毒基因治疗等方面的研究已取得广泛应用^[9-10]. 在此我们利用转录载体 Psilencer2.1 构建靶向 survivin 的 siRNA 真核表达载体以研究其对肝癌细胞生物学的影响, 从而为肝癌的基因治疗提供新的方法.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株 HepG2 由同济医院肝脏外科中心朱虹博士惠赠, 用含 100 mL/L 胎牛血清(购自 Hyclone 公司)、100 KU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基, 在 37℃, 饱和湿度及 50 mL/L CO₂ 的细胞培养箱内传代培养. siRNA 真核表达载体的构建. 模板 DNA 合成. 具有互补序列的能够编码短发卡 RNA(shRNA) 的双链寡核苷酸由武汉晶赛公司合成. 此互补序列为两条反向重复序列, 中间 9 个插入序列分别为 TTCAAGAGA、AAGAACTCT, 两端分别带有 BamH I 和 Hind III 的酶切位点(下划线处)便于与 Psilencer2.1 载体(购自 Ambion 公司)连接. 其转录产物所形成的 siRNA 的作用靶点为人 survivin mRNA 94-112 位核苷酸(GeneBank no. NM-001168), 此片段已利用 Blast 进行查询, 确定其为特异性序列. 双链寡核苷酸序列 5' -GATCCGGACCACCGCATCTCTACATTC AAGAGATGTAGAGATGCGGTGGT CCTTTTTTGAAA-3', 3' -GCCTGGTGGCGTAGAGATGTAAGTTCTCTACATCTCTACGCCACCAGGAAAAA CCTTTTCGA-5' 阴性对照双链寡核苷酸转录产物所形成的 siRNA 的作用序列为: 5' -GCTTCATAAGGCGCATAGC-3'. 此序列不与任何人类基因序列同源. siRNA 真核表达载体的构建及鉴定. 用 T4DNA 连接酶(购自 Ambion 公司)将双链寡核苷酸与 Psilencer2.1 线性载体定向连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑选氨苄青霉素抗性菌落并扩增培养, 然后快速小量制备质粒并行核酸测序鉴定(由上海博亚公司完成).

1.2 方法 细胞转染及鉴定 1 \times 10⁵ 个 HepG2 细胞接种于 6 孔板, 其融合达 90% 时分别用 Psilencer2.1 阳性重组子和对照重组子进行转染. 具体操作按脂质体 Dospers(购自 Roche 公司)说明书进行. 转染 48 h 后按 1:10 稀释传代并换用选择培养基(600 mg/L, G418)继续培养 14 d, 然后将出现的细胞克隆在培养瓶中扩增培养并传代建系, 分别命名为 HepG2/Silence(+)和 HepG2/Silence(-)细胞. 阳性细胞克隆 neo 基因表达的检测. 首先从筛选得到的阳性细胞克隆中提取总 RNA, 利用 RT-PCR 扩增 HepG2/Silence(+)和 HepG2/Silence(-)细胞中的 neo 基因片段, 以证实目的基因转染是否成功. 扩增 neo

基因的引物序列为: 上游引物: 5' -AGAGGCTATTCTGCTATGAC-3' 下游引物: 5' -GCTTCAGTGACAACGTCGAG-3'. 扩增片段大小为 237 bp.

1.2.1 转染效应检测 (1) survivin 基因 mRNA 表达检测 以 RT-PCR 法检测在 siRNA 干预下 survivin 基因 mRNA 的表达改变. 实验共分三组: HepG2 细胞、HepG2/Silence(-)细胞和 HepG2/Silence(+)细胞, 每组细胞均设三个复瓶. 首先分别收集各组 HepG2 细胞 1 \times 10⁶ 个, 然后提取总 RNA 逆转录成 cDNA, 最后进行 PCR 反应. 引物序列为: 上游引物: 5' -CATGGGTGCCCGACGTT-3', 下游引物: 5' -TCAATCCATGGCAGCCAGCT-3'. 扩增片段大小为 430 bp. 结果以其和内参照 β -actin 吸光光度值的比值来反映其相对含量. (2) survivin 蛋白表达检测 以流式细胞仪检测 survivin 基因蛋白的表达改变. 分别收集各类 HepG2 细胞 1 \times 10⁶ 个, 经多聚甲醛固定、PBS 洗涤后用 0.25% Tritonx-100 室温破膜, 然后分别加入小鼠抗人 survivin 一抗及 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(购自晶美公司). 利用流式细胞仪(BD 公司)分析结果, 用无标记和阴性对照样品调节前散射和侧散射, 对不同细胞设置 GATE, 计算 survivin 阳性细胞百分比.

1.2.2 肿瘤细胞的生长分析 将 HepG2 细胞、HepG2/Silence(-)细胞和 HepG2/Silence(+)细胞分别接种于培养瓶中, 每瓶 1 \times 10⁴ 个细胞, 每种细胞接种三个复瓶, 台盼蓝染色后计数活细胞, 每瓶数 3 次, 连续测定 5 d, 绘制生长曲线.

1.2.3 细胞凋亡观察 离心收集细胞于 1.5 mL 离心管内, 采用细胞凋亡 -Hoechst 染色试剂盒(购自江苏碧云天公司)并按照说明书操作对各组细胞进行处理, 荧光显微镜下观察并拍照. 离心收集细胞于 5 mL 培养管内, 采用 Annexin V 检测试剂盒(购自 BD 公司)对各组细胞进行凋亡率的检测.

1.2.4 裸鼠异体肿瘤接种实验 收集处于对数生长期的 HepG2、HepG2/silence(-)和 HepG2/Silence(+)细胞, 调整细胞密度为 4 \times 10⁹/L; 将裸鼠随机分为 3 组, 每组四只分别接种上述各种细胞株, 每只裸鼠背部皮下注射 0.1 mL 细胞悬液, 连续观察 4 wk, 测量肿瘤长短径, 根据公式 $V = \text{长径} \times \text{短径}^2 \times 0.52$ 来计算肿瘤大小, 绘制肿瘤生长曲线并计算成瘤率.

统计学处理 采用 SPSS 统计软件对数据进行方差分析, t 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异.

2 结果

将重组子 Psilencer2.1(+)survivin 进行序列分析, 测序结果正确, 表明 Psilencer2.1(+)survivin 真核表达载体构建成功. 借助阳离子脂质体转染方法, 将重组体 Psilencer2.1(+)survivin 和 Psilencer2.1(-)survivin 分别转染至 HepG2 细胞中, 经 G418 筛选得到阳性克隆, 再利用重组体中均含有 neo 标志基因这一特性, 借助 RT-PCR 的方法检测阳性转染细胞克隆中 neo 基因的表达,

以检验基因转染是否成功. 电泳结果从两种转染细胞克隆中扩增出的 neo 基因片段, 在 237 bp 处可见电泳条带, 其大小与预期结果一致(图 1), 证实 PSilencer2.1 阳性质粒和阴性对照质粒已分别成功转染至 HepG2 细胞中, 分别称为 HepG2/Silence(+)和 HepG2/Silence(-)细胞.

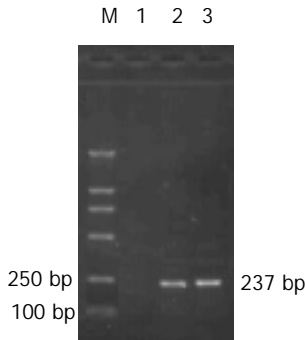


图 1 转染细胞克隆 neo 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳. M : DNA marker; 1: HepG2 细胞; 2: HepG2/Silence(-)细胞; 3: HepG2/Silence(+)细胞.

2.1 survivin mRNA 的表达 转染 Psilencer2.1(+)survivin 后, HepG2/Silence(+)的 PCR 产物电泳带较对照组明显减弱, 而不影响 β -actin 的表达, 而转染阴性对照质粒的 HepG2 细胞无明显变化(图 2). 各组的吸光度 A 值的比值分别为: 1.432 ± 0.012 , 1.398 ± 0.017 , 0.386 ± 0.013 . 经方差分析 t 检验, HepG2/Silence(+)细胞与 HepG2, HepG2/Silence(-)细胞 mRNA 表达量之间存在差异性 ($^aP < 0.05$).

2.2 survivin 蛋白的表达变化 流式细胞仪检测结果显示, HepG2/Silence(+)细胞 survivin 蛋白的阳性率为 $24.0 \pm 0.3\%$, 对照组 HepG2 细胞、HepG2/Silence(-)细胞 survivin 蛋白的阳性率分别为 $95.4 \pm 1.4\%$ 和 $94.8 \pm 1.8\%$. 经方差分析 t 检验, HepG2/Silence(+)细胞 survivin

表 1 HepG2 细胞不同时间生长情况(mean \pm SD, $\times 10^4$)

Group	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
HepG2	1	6.66 \pm 0.05	16.50 \pm 0.37	34.50 \pm 0.38	78.17 \pm 0.21	104.67 \pm 0.75
HepG2/silence(-)	1	6.64 \pm 0.02	16.47 \pm 0.06	31.50 \pm 0.89	75.83 \pm 1.66	98.87 \pm 1.99
HepG2/silence(+)	1	6.61 \pm 0.03	15.50 \pm 0.10	16.53 \pm 0.59 ^a	29.80 \pm 0.20 ^a	39.84 \pm 0.16 ^a

^aP < 0.05, vs HepG2、HepG2/Silence(-) cells.

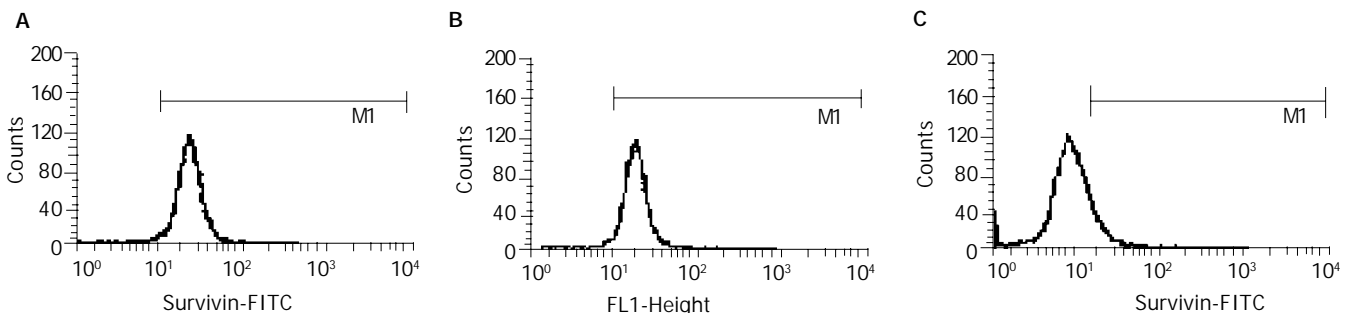


图 3 survivin siRNA 对蛋白表达的影响. A: HepG2 细胞; B: HepG2/silence(-)细胞; C: HepG2/silence(+)细胞.

蛋白的阳性率明显低于 HepG2 细胞和 HepG2/Silence(-)细胞(P < 0.01, 图 3).

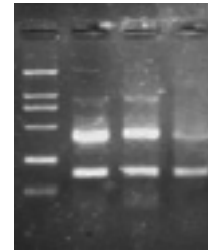


图 2 survivin siRNA 对 mRNA 表达的影响. M : DNA marker; 1: HepG2 细胞; 2: HepG2/Silence(-)细胞; 3: HepG2/Silence(+)细胞.

2.3 survivin SiRNA 对 HepG2 细胞增生的影响 HepG2/Silence(-)细胞的增生和 HepG2 细胞相比无显著性差异, 而 HepG2/Silence(+)细胞的增生从第 3 d 起明显受抑制, 这种抑制作用随时间延长而增加, 与对照组相比具有统计学差异(P < 0.01, 表 1, 图 4).

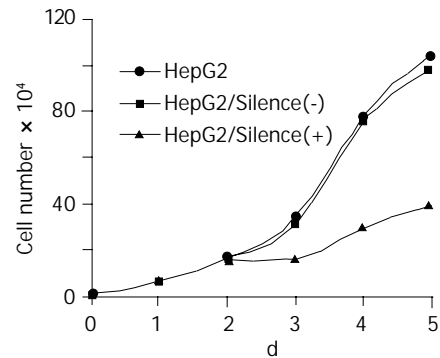


图 4 转染 survivin siRNA 的 HepG2 细胞生长曲线.

2.4 细胞凋亡 荧光显微镜下观察可见 HepG2/Silence(+)细胞体积大小不等, 形态不一, 其中可见 4-5 个癌细

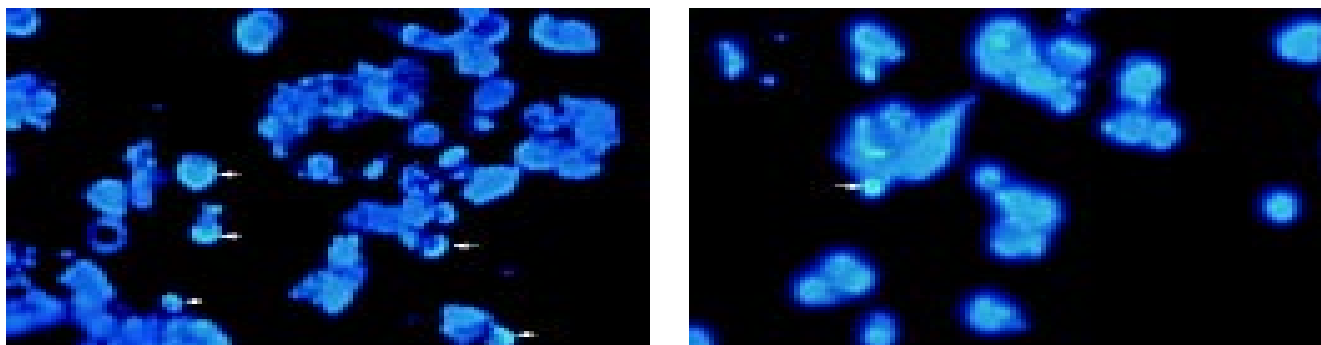


图5 细胞凋亡 Hoechst 染色.

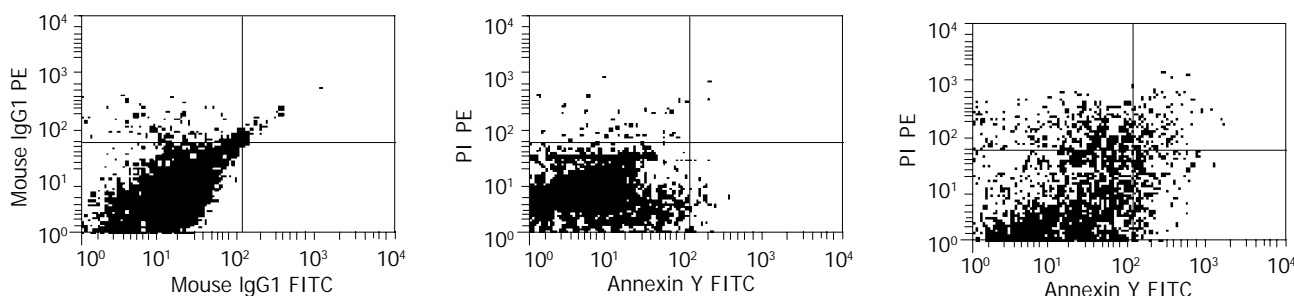


图6 细胞凋亡率检测结果.

胞体积缩小, 染色质浓缩, 边集(图 5A, 箭头所示). 尚可见一癌细胞体积明显缩小, 呈固缩状(典型凋亡小体, 图 5B, 箭头所示). 流式细胞仪检测结果表明, 转染 survivin SiRNA 后, HepG2/Silence(+)细胞凋亡率 ($7.28 \pm 0.02\%$)明显增加, 与未转染组($0.48 \pm 0.01\%$)和转染阴性对照组($0.73 \pm 0.03\%$)相比, 差异具有显著性($P < 0.01$, 图 6).

2.5 转染细胞体内成瘤的生长曲线 将 HepG2、HepG2/silence(-)、HepG2/silence(+)细胞接种于裸鼠背部皮下, 经过5-10 d的成瘤潜伏期后, 在其接种部位形成肉眼可见的瘤块, 其成瘤率分别为 100%、100%和 25%, HepG2/silence(+)细胞体内成瘤率降低 75%, t 检验显示 HepG2、HepG2/silence(-)、HepG2/silence(+)细胞成瘤率具有极显著差异($P < 0.01$). 另外持续观察其肿瘤的生长情况并绘制出各组裸小鼠肿瘤的生长曲线(图7). 结果显示: HepG2细胞和HepG2/silence(-)细胞 两组肿瘤的生长趋势较为一致, 而 HepG2/silence(+)组肿瘤的生长明显受到抑制.

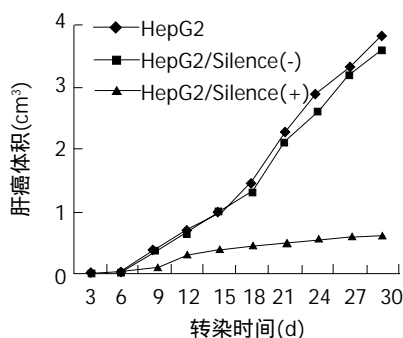


图7 转染细胞肿瘤生长曲线.

3 讨论

肿瘤的形成是由多因素造成的, 其中肿瘤细胞中凋亡抑制基因的高表达能明显抑制细胞凋亡, 逃避机体免疫系统对肿瘤细胞的识别和清除^[11-12]. 另外凋亡抑制基因还可能在肿瘤细胞产生耐药的过程中发挥重要作用^[13-14]. survivin 基因具有高度保守性和抑制细胞凋亡的作用, 同时他仅在肿瘤细胞中表达的特性为肿瘤的治疗提供了新的研究方向^[15-18]. 目前研究者多采用反义技术进行抑制 survivin 基因表达的研究, 但由于反义技术在抑制目的基因表达的同时可激活干扰素反应途径而导致非特异性基因 mRNA 的降解, 因此其应用受到限制^[19]. 寻求新的基因干涉手段一直是近年来国内外研究的热点. RNAi 是由作用于同源序列 mRNA 的双链 RNA 所介导的序列特异性、转录后基因沉默机制^[20-24]. 由于执行 RNAi 的效应分子 siRNA (small interference RNA) 在不影响非特异性干扰素途径的情况下可抑制靶基因的表达, 因此 RNAi 技术不仅成为了除反义技术以外又一种新的分析功能缺失表型的工具, 而且将其作为基因治疗的手段可能具有更广阔的前景^[25]. 与传统的反义技术相比较, RNA 干扰的作用更为强大^[26]. 我们构建了 siRNA 真核表达载体, 其转录产物可在体内形成由一个茎环所分离的具有反向重复序列的发卡样 RNA (shRNA), 此 shRNA 随后被加工成 siRNA 而降解目的基因 mRNA 表达. 这种方法克服了人工合成的 siRNA 成本高、费用大以及在体内作用时间短的缺点^[27]. 通过构建靶向 survivin siRNA 真核表达载体, 经稳定转染肝癌细胞并进行细胞效应的研究发现, 其在 mRNA 及蛋白质水平对 survivin 的抑制率分别达 73% 和 75% 而不影响 β -actin 的表达,

而对对照组 siRNA 对的表达无明显影响, 这说明我们构建的 siRNA 不仅作用强大而且具有特异性。

肿瘤细胞的异常增生是其生物学行为的一项重要表现。已有研究表明 survivin 基因通过与 cdk4 的相互作用释放野生型 p21 促进肝癌细胞的增生^[28-30]。我们运用 RNAi 技术抑制 survivin 基因的表达后观察肝癌细胞的生长情况时发现: 与对照组相比, HepG2/Silence(+)细胞的增值明显受抑制, 而且这种抑制作用随时间延长而增加。说明 survivin 基因的表达被有效抑制后可通过诱导肿瘤细胞的凋亡而抑制肿瘤细胞的生长。我们在运用 Hoechst 核染色观察肿瘤细胞的凋亡情况时也发现经稳定转染 siRNA 表达载体的肝癌细胞出现了明显的凋亡现象。这也从形态上证实了 survivin 基因的表达抑制可诱导肿瘤细胞凋亡的发生。在对肝癌细胞进行凋亡率的分析中我们发现经稳定转染 siRNA 表达载体的肝癌细胞的凋亡率明显高于对照组, 这进一步说明抑制 survivin 基因的表达可有效诱导肝癌细胞的凋亡。为了验证 survivin siRNA 真核表达载体的体内效应, 我们还观察了 survivin siRNA 真核表达载体转染前后的各组细胞在裸鼠体内成瘤率和肿瘤生长曲线的变化, 发现 survivin siRNA 真核表达载体转染组肿瘤的生长明显受到抑制, 其成瘤率也明显降低, t 检验显示实验组与对照组之间差异具有极显著性。本实验结果表明, 靶向 survivin 的 siRNA 载体不仅可以诱导肝癌细胞的凋亡, 还可以抑制肝癌细胞体内肿瘤的形成, 这为 RNAi 技术的临床应用提供了有力的实验依据。

总之, 我们构建的 siRNA 真核表达载体不仅有效抑制了目的基因的表达, 还能在体内体外通过诱导肝癌细胞的凋亡而抑制肿瘤的生长。这为下一步诱导其对化疗药物的敏感性提供了实验基础及理论。

4 参考文献

- He C, Lao WF, Hu XT, Xu XM, Xu J, Fang BL. Anti-liver cancer activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand gene and its by stander effects. *World J Gastroenterol* 2004;10:654-659
- Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002;1:19-30
- Fennell DA, Corbo MV, Dean NM, Monia BP, Cotter FE. In vivo suppression of Bcl-XL expression facilitates chemotherapy-induced leukaemia cell death in a SCID/NOD-Hu model. *Br J Haematol* 2001;112:706-713
- Altieri DC. survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- Altieri DC. survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003;88:31-52
- Chang Q, Liu ZR, Wang DY, Kumar M, Chen YB, Qin RY. survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:415-418
- Wall NR, Shi Y. Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet* 2003;362:1401-1403
- Chi JT, Chang HY, Wang NN, Chang DS, Dunphy N, Brown PO. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6343-6346
- Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Harel-Bellan A. RNA interference and its possible use in cancer therapy. *Bull Cancer* 2004;91:15-18
- Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003;9:347-351
- Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004;23:2746-2756
- Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:229-249
- Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastry PR. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2004;6:29-40
- Vaziri SA, Grabowski DR, Tabata M, Holmes KA, Sterk J, Takigawa N, Bukowski RM, Ganapathi MK, Ganapathi R. c-IAP1 is overexpressed in HL-60 cells selected for doxorubicin resistance: effects on etoposide-induced apoptosis. *Anticancer Res* 2003;23:3657-3661
- Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. survivin-an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit* 2003;9:PI25-29
- Zhang W, Chen X, Qiu F. An antisense plasmid targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes hepatocarcinoma cells to chemotherapy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003;23:387-391
- Pennati M, Binda M, Colella G, Zoppe' M, Folini M, Vignati S, Valentini A, Citti L, De Cesare M, Pratesi G, Giacca M, Daidone MG, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;23:386-394
- Yamamoto T, Manome Y, Miyamoto A, Tanigawa N. Development of a novel gene therapy using survivin antisense expressing adenoviral vectors. *Gan To Kagaku Ryoho* 2003;30:1805-1808
- Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 2002;1575:15-25
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:657-685
- Downward J. RNA interference. *BMJ* 2004;328:1245-1248
- Carette JE, Overmeer RM, Schagen FH, Alemany R, Barski OA, Gerritsen WR, Van Beusechem VW. Conditionally replicating adenoviruses expressing short hairpin RNAs silence the expression of a target gene in cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:2663-2667
- Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9:1657-1661
- Morita T, Yoshida K. RNAi provides a new tool for functional analyses of the mammalian genes. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2002;47:1839-1845
- Scherr M, Morgen MA, Eder M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem* 2003;10:245-256
- Caplen NJ. RNAi as a gene therapy approach. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:575-586
- Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5515-5520
- Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:1080-1085
- Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000;19:1346-1353
- Moon WS, Tarnawski AS. Nuclear translocation of survivin in hepatocellular carcinoma: a key to cancer cell growth? *Hum Pathol* 2003;34:1119-1126

腺病毒增强转铁蛋白受体介导的针对突变型p53的大酶转染可促进肝癌细胞凋亡

沈霞, 林菊生, 孔心涓

沈霞, 林菊生, 孔心涓, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
沈霞, 女, 1978-10-20 生, 湖北省十堰人, 汉族, 华中科技大学同济医学院在读硕士. 研究方向分子肝脏病学.
国家自然科学基金资助项目, No.30171061
项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所.
电话: 027-83662578
收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-24

Maxizyme against mtp53 transfected by adenovirus enhanced transferrin receptor-mediated gene delivery system induced apoptosis of hepatoma cells

Xia Shen, Ju-Sheng Lin, Xin-Juan Kong

Xia Shen, Ju-Sheng Lin, Xin-Juan Kong, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30171061
Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China.
Received: 2004-03-05 Accepted: 2004-03-24

Abstract

AIM: To evaluate the influence of introduction of maxizyme against mtp53 by adenovirus enhanced transferrin receptor-mediated gene delivery system on MHCC97 cells.

METHODS: Hepatoma cell line MHCC97 containing mutated p53 gene was served as a model. The maxizyme against mtp53 was transfected to the cells by adenovirus enhanced transferrin receptor-mediated gene delivery system. The level of mtp53-mRNA was detected by means of semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The apoptosis of the hepatoma cells was measured by DNA ladder assay and FCM.

RESULTS: After 48 hours of transfection by AVET system, RT-PCR results indicated the expression of mtp53 mRNA in pEGFP-Maxizyme group was significantly lower than that in control group. And DNA "ladder" with agarose gel electrophoresis was observed in pEGFP-maxizyme group. The result of flow cytometry exhibited apoptotic index in pEGFP-maxizyme group was 22.95%, which was higher than those in blank control group and pEGFP group.

CONCLUSION: The recombinant ribozyme cDNA eukaryotic expression vector pEGFP-maxizyme can be efficiently transfected into MHCC97 cell by adenovirus enhanced transferrin

receptor-mediated gene delivery system and the expression of maxizyme may inhibit the mtp53 gene expression and promote apoptosis of MHCC97 cells. The AVET system may be a useful tool in gene delivery for gene therapy of human HCC.

Shen X, Lin JS, Kong XJ. Maxizyme against mtp53 transfected by adenovirus enhanced transferrin receptor-mediated gene delivery system induced apoptosis of hepatoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1539-1542

摘要

目的: 通过腺病毒增强的转铁蛋白受体介导法(AVET)将针对突变型p53(mtp53)的大酶(Maxizyme)基因转入肝癌细胞后对肝癌细胞凋亡的影响,探索AVET用于肝癌基因治疗的可行性,为肝癌的基因治疗探索一条新途径。

方法: 以带有mtp53基因的人肝癌细胞株MHCC97细胞为模型,用腺病毒增强转铁蛋白受体介导法将针对mtp53的pEGFP-Maxizyme基因和空载体pEGFP分别导入MHCC97细胞,荧光显微镜观察细胞转染情况,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测mtp53 mRNA表达水平的变化, DNA琼脂糖凝胶电泳和流式细胞仪检测转染后对细胞凋亡的影响。

结果: 转染后48 h荧光显微镜下可见呈细胞形态的绿色荧光。收集细胞检测,实验组mtp53 mRNA表达水平与空载体组和空白对照组相比,基因扩增条带亮度明显减弱,mRNA表达水平下降($P < 0.05$); DNA琼脂糖凝胶电泳出现典型的凋亡梯带(DNA Ladder);流式细胞仪分析显示细胞凋亡水平增高,凋亡指数22.95%,显著高于对照组的2.37% ($P < 0.05$)。

结论: 腺病毒增强转铁蛋白受体介导的基因转移系统可将pEGFP-Maxizyme有效的转染到肝癌细胞株MHCC97中,Maxizyme在细胞内成功的切割了mtp53 mRNA,促进了肝癌细胞的凋亡,这为腺病毒增强转铁蛋白受体介导法在肝癌基因治疗中的应用提供了实验依据,也为肝癌的基因治疗提供了一条新途径。

沈霞, 林菊生, 孔心涓. 腺病毒增强转铁蛋白受体介导的针对突变型p53的大酶转染可促进肝癌细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1539-1542
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1539.asp>

0 引言

p53基因是人类恶性肿瘤中总突变率最高的基因之一,

其发生率在30-70%之间^[1-3]。在肝癌中p53突变率约为50%^[4-7]。野生型p53是一种重要的抑癌基因,被认为是“基因组的保护者”。其功能主要是参与细胞周期调控、DNA损伤修复^[8]。肿瘤的发生是由于细胞增生与细胞凋亡平衡失调的结果,细胞凋亡在肝细胞癌生长过程中起负调控作用,具有阻遏肿瘤生长的作用。近年来,人们发现,p53基因与细胞凋亡有密切关系,野生型p53与突变型p53基因均参与细胞凋亡调节,但二者作用不同,野生型p53诱导细胞凋亡发生,而突变型p53对凋亡有抑制作用^[9]。我们设计合成了一种针对突变型p53的核酶基因,构建了其真核表达质粒,并且已在细胞外证明了其可以成功的切割靶RNA分子^[10]。本实验用腺病毒增强的转铁蛋白受体介导法(AVET)将此基因转入人肝癌细胞MHCC97细胞中,观察其促进肝癌细胞凋亡的作用,为AVET系统在肝癌基因治疗中的应用提供实验依据,也为肝癌的基因治疗提供一条新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株MHCC97购自复旦大学肝癌研究所,大肠杆菌DH5 α 本室保存,pEGFP-Maxizyme质粒本室构建,具体方法见文献^[10]。腺病毒增强的转铁蛋白受体介导的基因转染试剂盒为Bender公司产品,质粒小提试剂盒、RT-PCR试剂盒为TakaRa公司产品,胎牛血清为Hyclone公司产品,DMEM培养基为Gibco公司产品,DNA maker购自晶美公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的扩增和提取 制备感受态细菌DH5 α ,核酶质粒pEGFP-Maxizyme和对照空载体pEGFP分别转化大肠杆菌DH5 α ,卡那霉素筛选,培养细菌,按质粒小抽试剂盒说明书进行质粒小量抽提。

1.2.2 MHCC97细胞培养及基因转染 人MHCC97肝癌细胞株培养在含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 培养箱,待细胞长至对数生长期,接种至24孔板,每孔接种 2×10^5 细胞,待细胞贴壁,长至50-80%融合时按腺病毒增强转铁蛋白受体介导基因转染试剂盒说明书进行基因转染。具体方法如下:(1)3 μ L生物素化的腺病毒加入100 μ L HBS缓冲液中,6 μ L抗生蛋白链菌素-赖氨酸加入100 μ L HBS缓冲液中,将二者充分混匀后室温下静置20 min。(2)6 μ g DNA质粒加入150 μ L HBS中,再加入上述溶液中,混匀后室温下静置20 min以形成复合物。(3)6 μ L转铁蛋白-聚赖氨酸加入150 μ L HBS中后,再加入上述溶液中。在加至细胞前将DNA复合物在室温下孵育30 min。实验分3组,1组核酶基因pEGFP-Maxizyme转染组,1组空载体pEGFP组,1组空白对照组。转染后48 h进行各项指标的检测,每组设3个复孔。

1.2.3 逆转录PCR检测突变型p53基因的表达 转染后48 h,分别收集转染核酶pEGFP-Maxizyme和空载体

pEGFP的细胞,按照Trizol试剂说明书步骤提取总RNA。取1 μ g总RNA,设计合成p53的两条特异性引物,上游引物5'-GATTCTCTTCTCTGTGC-3',下游引物5'-CTTTCCACGACGGTGACA-3', β_2 -microglobulin作为内参照,其引物序列:上游引物:5'-TACTCTCTTTCTGGCCTG-3',下游引物:5'-GACAAGTCTGAATGCTCCAC-3',扩增片段分别946 bp和190 bp。10 \times RT Buffer 2 μ L,25 mmol/L的MgCl $_2$ 4 μ L,10 mmol/L dNTP 2 μ L,40 U/ μ L的RNasin 0.5 μ L,2.5 pmol/ μ L的oLigodT 1 μ L,5U/ μ L的M-MLV RT 1 μ L,DEPC水补至20 μ L。42 $^{\circ}$ C 逆转录30 min,99 $^{\circ}$ C 灭活5 min。取上述cDNA 20 μ L,加入10 \times Buffer 8 μ L,25 mmol/L的MgCl $_2$ 6 μ L,引物各1 μ L,混匀后94 $^{\circ}$ C,2 min 热启动,加Taq 1 μ L,总体积100 μ L。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性30 s,56 $^{\circ}$ C 退火30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸1 min,35个循环,72 $^{\circ}$ C 补偿10 min。取PCR产物10 μ L,于10 g/L琼脂糖凝胶上电泳(含0.5 mg/L 溴化乙锭),凝胶图像吸光密度分析系统进行PCR产物条带扫描定量分析。

1.2.4 流式细胞仪分析 收集上述各组处理后的细胞以PBS清洗,加入70%乙醇吹打成单细胞悬液4 $^{\circ}$ C 下置24 h,然后离心,洗涤细胞后用PI染色,4 $^{\circ}$ C 下置30 min后上机检测。采用Beckon/DickonsonFacssort型流式细胞仪,在488 nm波长处进行检测,应用相应程序软件进行资料的处理和分析,细胞凋亡指数(AI)= Δ 2倍峰细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.2.5 DNA凝胶电泳检测细胞凋亡 分别取转染核酶pEGFP-Maxizyme组、空载体pEGFP组和空白对照组的细胞,均用10 μ g/mL的DDP作用48 h后提取细胞总DNA,2%凝胶电泳,结果录入计算机。

统计学处理 以上实验均重复3次。采用SAS软件进行t检验,P<0.05有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染 转染后48 h,用荧光显微镜观察,可见呈细胞形态的绿色荧光,表明质粒成功的转染到细胞。转染效率约为70%。(图1)

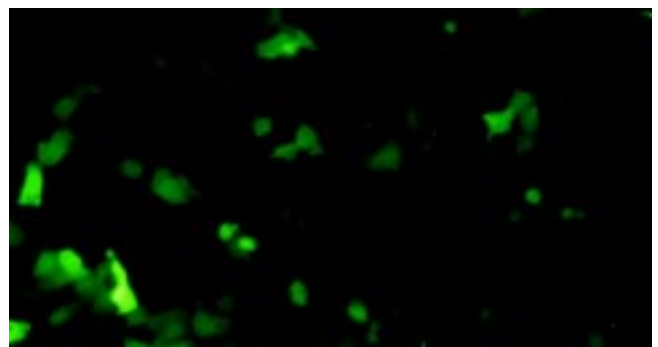


图1 pEGFP-Maxizyme转染MHCC97细胞48 h绿色荧光表达。

2.2 转染前后mtp53 mRNA的变化 未做处理的MHCC97

细胞平均 mtp53/ β_2 -microglobulin 为 1.46 ± 0.16 , pEGFP 组细胞为 1.48 ± 0.11 , pEGFP-Maxizyme 组细胞为 0.98 ± 0.14 . 经 pEGFP-Maxizyme 作用的细胞 mtp53 mRNA 表达明显减弱, 与转染空载体 pEGFP 的细胞及空白对照组细胞比较 mtp53 的水平有显著性差异 ($P < 0.05$), 而转染 pEGFP 者与空白对照组的 mtp53 mRNA 表达无明显差异 ($P > 0.05$). (见图 2).

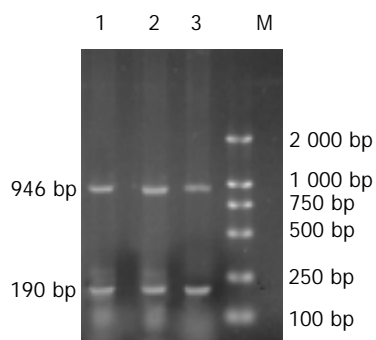


图2 RT-PCR分析肝癌细胞中mRNA的表达. 1:空白对照; 2: MHCC97细胞转染 pEGFP; 3: MHCC97细胞转染 pEGFP-Maxizyme; M: DNA分子量标准(DL2 000).

2.3 流式细胞仪检测凋亡 流式细胞仪分析显示 pEGFP-Maxizyme 组细胞凋亡率为 22.95%, pEGFP 组细胞凋亡率为 3.35%, 空白对照组细胞凋亡率为 2.37%. pEGFP-Maxizyme 组较 pEGFP 组细胞凋亡率明显增高.

2.4 转染后细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳的变化 pEGFP-Maxizyme 转染 MHCC97 细胞 48 h 后, DNA 琼脂糖凝胶电泳出现长短不一的“梯状”改变. 而转染空载体的对照组未出现梯状改变(图 3).

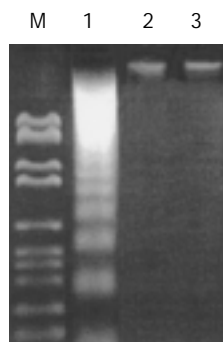


图3 各组细胞 DNA 凝胶电泳图. 1: MHCC97 细胞转染 pEGFP-Maxizyme; 2: MHCC97 细胞转染 pEGFP; 3: 空白对照.

3 讨论

核酶是一类具有生物催化活性的 RNA 分子, 他能够定点切割 mRNA 靶分子, 从而阻断有害基因的表达, 广泛的应用于肿瘤和病毒性疾病的基因治疗^[11]. 其中应用最广泛的是锤头状核酶. 锤头状核酶包括由茎-连接的两个保守区段以及与特异性底物结合的侧翼序列, 其适合的切割位点是 GUC、GUU、GUA 和 UUC. 由于对切割位点的选择, 在一定范围内限制了锤头状核酶的应用.

1992 年, McCall 用短核苷酸链替代茎-, 并发现这一变短的核酶仍保持原有的切割活性, 命名为小酶(Minizyme)^[12-13]. 两个小酶聚合形成同二聚体或异二聚体结构, 称为大酶(Maxizyme)^[14]. 大酶发现后主要用于嵌合基因及突变基因所致疾病的治疗, 也可用于切割没有常规锤头状核酶合适切割位点的靶 RNA 分子. 在肝癌中, p53 基因突变发生率较高. 突变型 p53 不仅丧失了抑癌基因的功能, 而且成为一种癌基因. P53 基因突变的热点是 249 位密码子^[15-16]. 本实验应用的人工合成的抗 mtp53 mRNA 的 Maxizyme 可在 249 位密码子处切断 mtp53 mRNA, 从而阻断其表达^[10].

要想将核酶技术应用于肝癌的基因治疗, 关键在于如何将核酶基因特异性的导入肝癌细胞以发挥作用. 近年受体介导的基因转移系统因其靶向性好、安全、无毒和外源基因容量大而受到广泛的关注^[17-23]. 受体介导的基因转移是将目的基因通过多聚赖氨酸等多聚阳离子与配体连接, 通过配体与细胞表面的特异性受体结合, 以受体介导的内吞作用将目的基因转入细胞^[24-25]. 人转铁蛋白受体为型膜蛋白, 通过结合和内化将血浆中的转铁蛋白摄入细胞. 由于快速生长对铁的需求量增加, 肿瘤细胞往往都过度表达转铁蛋白受体. 研究表明在乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、白血病等恶性肿瘤细胞中有大量转铁蛋白受体的表达, 转铁蛋白受体可以作为肿瘤基因治疗中的靶^[26-28]. 然而, 配体-DNA 复合物进入细胞后, 外源 DNA 极易被溶酶体酶降解而使外源 DNA 的表达效率相对较低. 为了提高外源 DNA 的表达效率, 一些研究者将复制缺陷的腺病毒与连接于目的基因-配体复合物连接, 利用腺病毒衣壳蛋白的膜不稳定作用, 可使基因的转染效率提高至近 100%^[29-30]. 我们利用腺病毒增强的转铁蛋白受体介导的基因转移系统将 pEGFP-Maxizyme 转入肝癌细胞株中. 转基因后, 在荧光显微镜下观察到细胞发出绿色荧光, 转染效率约为 70%, RT-PCR 证实 Maxizyme 在细胞内成功的切割了 mtp53.

细胞凋亡又称细胞程序性死亡, 近年来的研究证明, 细胞凋亡的紊乱与肿瘤发生和发展关系十分密切, 如果受损的细胞不能正确启动凋亡机制, 机体内细胞增生与凋亡二者间的平衡遭到破坏, 使细胞过度增生, 就有可能导致肿瘤的发生. 异常的细胞凋亡的抑制不仅在恶性肿瘤的形成中有重要作用, 而且参与恶性肿瘤进展. 诱导肿瘤细胞凋亡已成为目前治疗恶性肿瘤的一项重要生物学策略, 许多抗肿瘤药物及放疗均是通过启动细胞凋亡机制完成的. 在本实验中, 利用腺病毒增强的转铁蛋白受体介导的基因转移系统将 pEGFP-Maxizyme 转入肝癌细胞后, Maxizyme 在细胞内成功的切割了 mtp53 mRNA, DNA 凝胶电泳和流式细胞仪检测均显示转染核酶的细胞出现了明显的凋亡, 而对照组细胞未出现凋亡.

我们的实验结果表明腺病毒增强转铁蛋白受体介

导的基因转移系统可以将pEGFP-Maxizyme有效的转染入肝癌细胞株MHCC97中, Maxizyme在细胞内成功的切割了mtp53 mRNA, 促进了肝癌细胞的凋亡, 这为腺病毒增强转铁蛋白受体介导法在肝癌基因治疗中的应用提供了实验依据, 也为肝癌的基因治疗提供了一条新途径。

4 参考文献

- 1 Dillon DA, Hipolito E, Zheng K, Rimm DL, Costa JC. p53 mutations as tumor markers in fine needle aspirates of palpable breast masses. *Acta Cytol* 2002;46:841-847
- 2 Kim SS, Bhang CS, Min KO, Chae HS, Choi SW, Lee CD, Lim KW, Chung IS, Park DH. p53 mutations and microsatellite instabilities in the subtype of intestinal metaplasia of the stomach. *J Korean Med Sci* 2002;17:490-496
- 3 Sakuragi N, Hirai A, Tada M, Yamada H, Yamamoto R, Fujimoto S, Moriuchi T. Dominant-negative mutation of p53 tumor suppressor gene in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;83:485-490
- 4 Kang G, Fang Z, Volkmann M. Study on p53 gene mutation in hepatocellular carcinoma patients in. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2001;15:163-165
- 5 Cengiz C, Akarca US, Goker E, Yuce G. Detection of mutant p53 in hepatocellular cancer from Turkey and its correlation with clinicopathologic parameters. *Dig Dis Sci* 2003;48:865-869
- 6 Sheen IS, Jeng KS, Wu JY. Is p53 gene mutation an indicator of the biological behaviors of recurrence of hepatocellular carcinoma? *World J Gastroenterol* 2003;9:1202-1207
- 7 Hsia CC, Kleiner DE Jr, Axiotis CA, Di Bisceglie A, Nomura AM, Stemmermann GN, Tabor E. Mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma: roles of hepatitis B virus and aflatoxin contamination in the diet. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1638-1641
- 8 Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331
- 9 Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2003;39:447-453
- 10 Kong XJ, Song YH, Lin JS, Huang HJ, Wang NX, Liu NZ, Li B, Jin YX. Maxizyme-mediated specific inhibition on mutant-type p53 in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:1571-1575
- 11 Sullenger BA, Gilboa E. Emerging clinical application of RNA. *Nature* 2002;418:252-258
- 12 McCall MJ, Hendry P, Lockett TJ. Minimized hammerhead ribozymes. *Methods Mol Biol* 1997;74:151-159
- 13 Sugiyama H, Hatano K, Saito I, Amontov S, Taira K. Catalytic activities of hammerhead ribozymes with a triterpenoid linker instead of stem/loop II. *FEBS Lett* 1996;392:215-219
- 14 Nakayama A, Warashina M, Kuwabara T, Taira K. Effects of cetyltrimethylammonium bromide on reactions catalyzed by maxizyme, a novel class of metalloenzymes. *J Inorg Biochem* 2000;78:69-77
- 15 Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Munoz A, Kensler TW, Qian GS, Groopman JD. Prospective detection of codon 249 mutations in p53 in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis* 2003;24:1657-1663
- 16 Qian GS, Kuang SY, He X, Groopman JD, Jackson PE. Sensitivity of electrospray ionization mass spectrometry detection of codon 249 mutations in the p53 gene compared with RFLP. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(10 Pt 1):1126-1129
- 17 Guy J, Drabek D, Antoniou M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Mol Biotechnol* 1995;3:237-248
- 18 Phillips SC. Receptor-mediated DNA delivery approaches to human gene therapy. *Biologicals* 1995;23:13-16
- 19 Michael SI, Curiel DT. Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther* 1994;1:223-232
- 20 Takayanagi A, Chen J, Gamou S, Shimizu N. Targeting delivery of therapeutic genes using monoclonal antibody: immunogene approach. *Nippon Rinsho* 1998;56:731-736
- 21 Kato Y, Sugiyama Y. Targeted delivery of peptides, proteins, and genes by receptor-mediated endocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997;14:287-331
- 22 Ginobbi P, Geiser TA, Ombres D, Citro G. Folic acid-polylysine carrier improves efficacy of c-myc antisense oligodeoxynucleotides on human melanoma (M14) cells. *Anticancer Res* 1997;17(1A):29-35
- 23 Junbo H, Li Q, Zaide W, Yunde H. Receptor-mediated interleukin-2 gene transfer into human hepatoma cells. *Int J Mol Med* 1999;3:601-608
- 24 Lee H, Kim TH, Park TG. A receptor-mediated gene delivery system using streptavidin and biotin-derivatized, pegylated epidermal growth factor. *J Control Release* 2002;83:109-119
- 25 Takakura Y, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral vectors for gene delivery. *J Drug Target* 2002;10:99-104
- 26 Park KS, Kim H, Kim NG, Cho SY, Choi KH, Seong JK, Paik YK. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:1459-1466
- 27 Pascale RM, De Miglio MR, Muroli MR, Simile MM, Daino L, Seddaiu MA, Pusceddu S, Gaspa L, Calvisi D, Manenti G, Feo F. Transferrin and transferrin receptor gene expression and iron uptake in hepatocellular carcinoma in the rat. *Hepatology* 1998;27:452-461
- 28 Yang DC, Jiang XP, Elliott RL, Head JF. Inhibition of growth of human breast carcinoma cells by an antisense oligonucleotide targeted to the transferrin receptor gene. *Anticancer Res* 2001;21:1777-1787
- 29 Fisher KJ, Wilson JM. Biochemical and functional analysis of an adenovirus-based ligand complex for gene transfer. *Biochem J* 1994;299(Pt 1):49-58
- 30 Wollenberg B, Schmidt W, Schmitt B, Lang S, Zeidler R. Receptor mediated gene transfer in squamous epithelial carcinoma of the head-neck area. *Laryngorhinotologie* 1997;76:411-414

肝癌中脱- γ -羧基凝血酶原的表达及意义

袁联文, 唐伟, 李永国, 幕内雅敏

袁联文, 李永国, 中南大学湘雅二医院肝胆胰外科 湖南省长沙市 410011
唐伟, 幕内雅敏, 日本东京大学附属医院肝胆胰外科 日本东京 113-8655
袁联文, 男, 1971-10-23 生, 湖南省永州市人, 汉族, 2003 年中南大学湘雅医学院博士, 主治医师, 2001/2002 年获国家教育部留学基金资助作为访问学者在日本东京大学附属医院肝胆胰外科做临床基础研究, 主要从事肝胆胰肿瘤研究。

项目负责人: 袁联文, 410011, 湖南省长沙市人民中路 86 号, 中南大学湘雅二医院肝胆胰外科. yuanlianwen1971@yahoo.com.cn
电话: 0731-8643691

收稿日期: 2004-03-11 接受日期: 2004-04-13

Des-gamma-carboxy-prothrombin expression in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

Lian-Wen Yuan, Wei Tang, Yong-Guo Li, Masatoshi Makuuchi

Lian-Wen Yuan, Yong-Guo Li, Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery Division, Department of Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Wei Tang, Masatoshi Makuuchi, Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery Division, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, 113-8655, Japan

Correspondence to: Dr. Lian-Wen Yuan, Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery Division, Department of Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. yuanlianwen1971@yahoo.com.cn

Received: 2004-03-11 Accepted: 2004-04-13

Abstract

AIM: To study the expression of des-gamma-carboxy-prothrombin (DCP) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and its clinical significance.

METHODS: Cancerous and non-cancerous tissue samples prepared from 92 cases of HCCs, 7 metastatic HCCs and 19 chronic liver diseases were subjected to immunohistochemical staining for tissue DCP. Relation between DCP expression in cancerous and non-cancerous tissues and clinical parameters of HCC was analyzed.

RESULTS: The DCP expression in cancerous tissues (73.9%) was significantly higher than that in non-cancerous tissues (26.1%, $P < 0.01$). The DCP expression in cancerous and non-cancerous tissues of HCC was significantly higher than that in non-cancerous tissues of metastatic HCCs and chronic liver diseases (3.5%, $P < 0.01$). Positive DCP staining in cancerous tissues was more frequently in cases of infiltrative growth than in cases of expansive growth ($P = 0.049$), and was more frequently in cases where no capsule formation was noted than that in cases with capsule formation ($P = 0.037$). The DCP expression in non-cancerous tissues of HCC with size > 5 cm was significantly higher than that of the size ≤ 5 cm ($P = 0.049$). Positive DCP staining in non-cancerous tissue was more frequently in cases of tumors larger than 5 cm than in cases of tumors that were 5 cm or smaller ($P = 0.049$). DCP expression in non-cancerous

tissues of patients who were either negative for both hepatitis markers or positive for the HBsAg was significantly higher than the patients who were positive for the HCVAb ($P < 0.01$). The rate of positive DCP staining in non-cancerous tissues was also significantly lower in patients with liver cirrhosis than that in patients with chronic hepatitis ($P < 0.05$). No correlations were found between DCP expression in cancerous and non-cancerous tissues and other clinical parameters.

CONCLUSION: DCP may be an important marker in liver carcinogenesis, but DCP in tissues cannot be considered as a prognostic factor for HCC.

Yuan LW, Tang W, Li YG, Makuuchi M. Des-gamma-carboxy-prothrombin expression in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1543-1545

摘要

目的: 探讨肝癌组织中脱- γ -羧基凝血酶原的表达情况及临床意义。

方法: 用免疫组化法探讨了 92 例肝癌及癌旁组织, 7 例转移性肝癌和 19 例慢性肝病组织中脱- γ -羧基凝血酶原的表达水平, 并分析脱- γ -羧基凝血酶原与肝癌的临床病理特征间的关系。

结果: 肝癌组织脱- γ -羧基凝血酶原阳性率(73.9%)明显高于癌旁组织(26.1%, $P < 0.01$), 但二者脱- γ -羧基凝血酶原阳性率明显高于转移性肝癌和慢性肝病肝组织(3.5%, $P < 0.01$)。浸润性生长的肝癌组织脱- γ -羧基凝血酶原阳性率明显高于膨胀性生长的肝癌组织($P = 0.049$), 无包膜形成的肝癌组织明显高于有包膜形成的肝癌组织($P = 0.037$)。最大径 > 5 cm 组的癌旁组织的脱- γ -羧基凝血酶原阳性率明显高于直径 ≤ 5 cm 组癌旁组织($P = 0.049$), HBsAg 和 HCVAb 均阴性或单 HBsAg 阳性的患者癌旁组织脱- γ -羧基凝血酶原染色阳性率明显高于 HCVAb 阳性组患者 ($P < 0.01$)。肝硬化的癌旁组织脱- γ -羧基凝血酶原阳性率明显低于慢性肝炎的癌旁组织($P < 0.01$)。肝癌组织、癌旁组织脱- γ -羧基凝血酶原阳性率与肝癌其他临床病理特征无明显的关系($P > 0.05$)。

结论: 脱- γ -羧基凝血酶原可能是预测肝癌发生的重要标志物, 但不能作为肝癌的预后指标。

袁联文, 唐伟, 李永国, 幕内雅敏. 肝癌中脱- γ -羧基凝血酶原的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1543-1545

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1543.asp>

0 引言

较多研究表明脱-γ-羧基凝血酶原(Des-gamma-carboxy-prothrombin, DCP)是肝癌一种有用血清肿瘤标志物^[1-11],而有关肝癌组织中DCP表达和临床意义的研究甚少.我们用免疫组化法探讨了92例肝癌组织中DCP的表达情况及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 原发性肝癌手术切除标本92例.男68例,女24例,年龄16-83(平均67.2 ± 52.6岁);伴肝硬化57例(62.0%);有病毒性肝炎感染的血清学证据78例(84.8%),其中HBsAg阳性18例,HCV-Ab阳性58例,HBsAg和HCV-Ab均阳性2例,其余14例均阴性.肿瘤直径从1.0-19.0(平均5.1 ± 3.8 cm);高分化癌20例,中分化癌62例,低分化癌10例.伴血管浸润27例(29.3%),存在肝内转移灶24例(26.1%).另转移性肝癌7例,原发部位为结肠;慢性肝病患者肝穿刺活检标本19例,其中肝硬化5例,慢性肝炎14例.这些组织经40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋后,制成4 μm厚的切片.DCP单克隆抗体MU-3(东京Eisai公司惠赠);Histofine SAB-PO (MULTI)试剂盒(100ml/L牛血清;生物素标识的抗鼠IgG的二抗;

ABC试剂及DAB-HCl显色剂)(购自东京Nichirei公司).
1.2 方法 常规ABC免疫组化法,免疫组化阳性物质定位于胞质.用0.05 mol/LPBS液替代一抗作为染色阴性或替代对照.随机选择10个高倍视野中DCP阳性细胞率,以阳性细胞率 15%为DCP阳性病例, <15%为阴性病例.

统计学处理 两组间的比较用为χ²检验,当P <0.05时为有显著性.

2 结果

2.1 DCP免疫组化染色 DCP染色阳性的细胞在其细胞质中出现大量棕褐色的颗粒.DCP染色阳性即可见于肝癌组织(图1)及癌旁组织(图2).癌组织和癌旁组织DCP染色阳性率分别为73.9%(68/92)和26.1%(24/92).7例转移性肝癌患者的非癌组织和19慢性肝病肝穿刺活检的肝组织中1例(1/26, 3.5%)DCP染色阳性.统计分析显示肝癌组织阳性率明显高于癌旁组织(P <0.01),二者的DCP阳性率又明显高于转移性肝癌和慢性肝病组(P <0.01).

2.2 DCP表达与临床病理的关系 肝癌组织DCP的表达与肿瘤直径无明显关系,而直径>5 cm的肝癌癌旁组织的DCP表达明显高于直径 ≤5 cm组(P =0.049,表1).

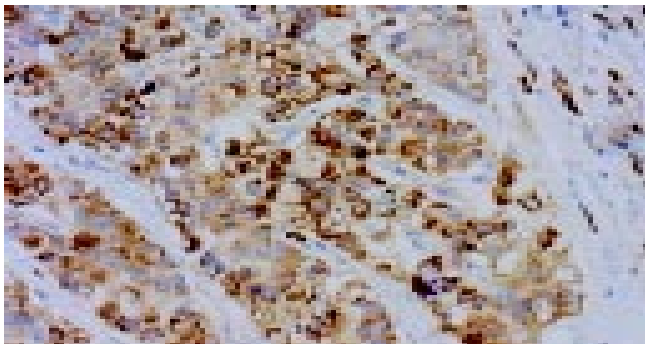


图1 肝癌组织DCP染色阳性, ×200.

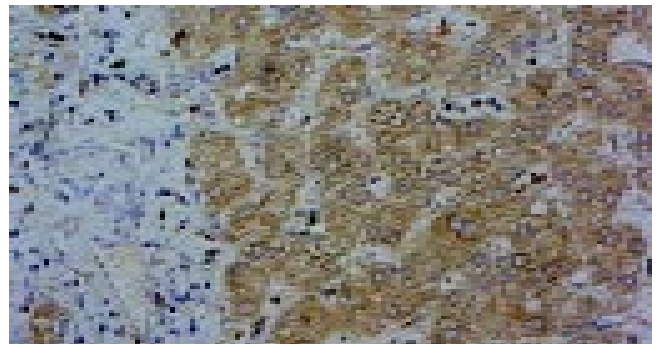


图2 癌旁组织DCP染色阳性, ×200.

表1 肝组织DCP表达与临床病理的关系 n (%)

因子	n	癌部组织		癌旁组织	
		阴性	阳性	阴性	阳性
直径 ≤5 cm	61	14 (23.0)	47 (77.0)	49 (80.3)	12 (19.7)
直径 >5 cm	31	10 (32.3)	21 (67.7)	19 (61.3)	12 (38.7) ^a
HBV+HCV 阴性	14	2 (14.3)	12 (85.7)	8 (57.1)	6 (42.9) ^c
HBV 阳性	18	4 (22.2)	14 (77.8)	8 (44.4)	10 (55.6) ^c
HCV 阳性	58	18 (31.0)	40 (69.0)	50 (86.2)	8 (13.8)
HBV+HCV 阳性	2	0	2 (100)	2 (100)	0
肝硬化	57	14 (24.6)	43 (75.4)	46 (80.7)	11 (19.3)
慢性肝病	33	9 (27.3)	24 (72.7)	20 (60.6)	13 (39.4) ^a
正常	2	1 (50.0)	1 (50.0)	2 (100)	0
膨胀性生长	71	22 (31.0)	49 (69.0)	54 (76.1)	17 (23.9)
浸润性生长	21	2 (9.5)	19 (90.5) ^a	14 (66.7)	7 (33.3)
有包膜浸润	70	22 (31.4)	48 (68.6)	51 (72.9)	19 (27.1)
无包膜浸润	22	2 (9.1)	20 (90.9) ^a	17 (77.3)	5 (22.7)

^aP <0.05, 组内比; ^bP <0.05, ^cP <0.05, vs HCV 阳性组.

浸润性生长的肝癌组织DCP染色阳性率明显高于膨胀性生长的肝癌组织(90.5% vs 69.0%, $P=0.049$), 无包膜形成的肝癌组织明显高于有包膜形成的肝癌组织(90.9% vs 68.6%, $P=0.037$). 肝癌组织 DCP 染色阳性率与肿瘤分化、血管浸润、肝内转移、TNM 分期、肿瘤的直径、肿瘤复发和患者生存期无明显的关系. 也没发现肝癌组织DCP染色阳性率与肝炎病毒标志物、不同背景肝有明显关系. HBsAg和HCVAb均阴性或单HBsAg阳性的癌旁组织DCP染色阳性率明显高于HCVAb阳性组(二者阴性组 vs HCVAb阳性组: $P=0.014$; HBsAg阳性组 vs HCVAb阳性组: $P<0.01$). 背景肝为肝硬化的癌旁组织 DCP 染色阳性率(11/57, 19.3%)明显低于背景肝存在慢性肝炎的癌旁组织(13/33, 39.4%; $P<0.01$). 但未发现癌旁组织DCP染色阳性率与其他临床病理因子有明显的关系.

3 讨论

目前肝癌是世界最常见的恶性肿瘤之一, 其恶性程度高, 预后差^[12-14]. 早期诊断、早期治疗仍是提高肝癌生存率最重要的手段. 目前肝癌的诊断主要依靠影像学的发现和血清肿瘤标志物的检测. 甲胎蛋白(AFP)作为肝癌代表性肿瘤标志物用于临床, 近年来血清 DCP 水平也被广泛应用于临床肝癌的诊断, 但关于肝癌组织 DCP 表达的研究不多. 慢性肝病患者肝结节性病灶可以从良性结节到肝癌, 其间按恶性程度存在有再生结节、腺瘤样增生、不典型性腺瘤样增生、高分化的早期肝癌、高分化肝癌、中分化肝癌至低分化肝癌多种组织学形态. 分化好的早期肝癌和不典型性腺瘤样增生间的组织学诊断标准至今仍有争议, 因此有必要寻找一种评价肝占位性病灶的组织标志物. Miskad et al 研究了62例肝癌和9例腺瘤样增生的肝组织中DCP的表达的情况, 发现71%的肝癌组织 DCP 染色阳性, 而无1例腺瘤样增生组织表达 DCP. 本研究也显示73.9%(68/92)肝癌癌组织 DCP 染色阳性, 而7例转移性肝癌患者的癌旁组织和19例肝穿刺活检的慢性肝病组织中仅1例 DCP 染色阳性. 因此以上结果提示DCP是肝癌一种有用的组织病理标志物.

我们发现肝癌癌组织染色阳性指数明显高于癌旁组织, 从组织学上证实肝癌癌组织可产生大量 DCP, 是血清DCP的主要来源之一. 肝癌癌组织染色除了与肿瘤的生长类型和包膜形成与否存在明显的相关性外, 与其他的病理因子如血管浸润、肝内转移等无关. 我们也没发现肝癌组织染色与生存期之间有明显相关性, 上述证据提示肝癌组织 DCP 染色尚不能评价肝癌的进展, 不能作为肝癌的预后指标.

2001年Fujioka et al 发现12%的小肝癌癌旁组织 DCP 染色阳性. 我们也发现26.1%(24/92)癌旁组织的 DCP 染色阳性, 而且一些癌旁组织的 DCP 染色阳性指数甚至高于癌组织, 这提示部分肝癌癌旁组织也可产生大量 DCP, 这仍须组织中 DCP 定量测定研究加以验证.

统计分析显示癌旁组织DCP的染色高低与肿瘤的大小有明显关系, 癌旁组织的 DCP 染色阳性指数又明显高于转移性肝癌的癌旁组织和肝穿刺活检的组织, 说明肝癌肿瘤的存在影响着其周围非癌组织DCP的产生. 癌旁组织产生 DCP 增加的机制可能系肝癌癌细胞在快速增生过程中维生素 K 消耗增加造成癌旁局部维生素 K 缺乏或癌细胞分泌某种物质影响周围肝细胞产生 DCP, 但具体的机制有待进一步研究.

4 参考文献

- Cui R, Wang B, Ding H, Shen H, Li Y, Chen X. Usefulness of determining a protein induced by vitamin K absence in detection of hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:42-45
- Gotoh M, Nakatani T, Masuda T, Mizuguchi Y, Sakamoto M, Tsuchiya R, Kato H, Furuta K. Prediction of invasive activities in hepatocellular carcinomas with special reference to alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:522-526
- Ando E, Tanaka M, Yamashita F, Kuromatsu R, Takada A, Fukumori K, Yano Y, Sumie S, Okuda K, Kumashiro R, Sata M. Diagnostic clues for recurrent hepatocellular carcinoma: comparison of tumour markers and imaging studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:641-648
- Nagaoka S, Yatsushashi H, Hamada H, Yano K, Matsumoto T, Daikoku M, Arisawa K, Ishibashi H, Koga M, Sata M, Yano M. The des-gamma-carboxy prothrombin index is a new prognostic indicator for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;98:2671-2677
- Ishii M, Gama H, Chida N, Ueno Y, Shinzawa H, Takagi T, Toyota T, Takahashi T, Kasukawa R. Simultaneous measurements of serum alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence for detecting hepatocellular carcinoma. South Tohoku District Study Group. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1036-1040
- Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, Lok AS. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology* 2003;37:1114-1121
- Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, Yamamoto M, Takasaki K, Nakano M. Comparison of clinicopathological features of patients with hepatocellular carcinoma seropositive for alpha-fetoprotein alone and those seropositive for des-gamma-carboxy prothrombin alone. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1290-1296
- Omata M, Yoshida H. Resolution of liver cirrhosis and prevention of hepatocellular carcinoma by interferon therapy against chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2003;237:47-51
- Shimizu A, Shiraki K, Ito T, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Takase K, Tameda Y, Nakano T. Sequential fluctuation pattern of serum des-gamma-carboxy prothrombin levels detected by high-sensitive electrochemiluminescence system as an early predictive marker for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Int J Mol Med* 2002;9:245-250
- Nakagawa T, Seki T, Shiro T, Wakabayashi M, Imamura M, Itoh T, Tamai T, Nishimura A, Yamashiki N, Matsuzaki K, Sakaida N, Inoue K, Okamura A. Clinicopathologic significance of protein induced vitamin K absence or antagonist II and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 1999;14:281-286
- Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, Takasaki K, Takenami K, Yamamoto M, Nakano M. Serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin measured using the revised enzyme immunoassay kit with increased sensitivity in relation to clinicopathologic features of solitary hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;88:544-549
- 谭兵, 黄介飞, 魏群, 张弘, 倪润洲. 砷剂对实验性鼠肝癌血管生成的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:32-37
- 彭志红, 杨建民, 司遂海, 房殿春, 陈文生, 罗元辉. 肿瘤转移抑制基因 KAI1 对 MHCC97-H 肝癌细胞粘弹性的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:1040-1043
- 彭绍华, 邓虹, 冯德云, 郑晖. 肝癌组织 HSP70 和 caspase 3 的表达意义. *世界华人消化杂志* 2004;12:782-784

survivin反义寡核苷酸对肝癌细胞生长抑制作用的研究

陈涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良

陈涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心 四川省成都市 610083
陈涛, 男, 1970-11-05 生, 四川省成都市人, 汉族. 2002 年获第三军医大学普通外科博士学位, 主治医师. 主要从事肝脏、胆道外科研究.
项目负责人: 陈涛, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心.
电话: 028-86570353
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-02-24

Inhibitory effect of antisense oligonucleotide on the expression of survivin gene and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Tao Chen, Yu-Rong Jia, Tie-Jun Zhao, Zhi-Liang Yin

Tao Chen, Yu-Rong Jia, Tie-Jun Zhao, Zhi-Liang Yin, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command Area, Chengdu 610083, Sichuan Province, China
Correspondence to: Tao Chen, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command Area, Chengdu 610083, Sichuan Province, China.
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-02-24

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of survivin antisense oligonucleotide (ASODN) on the expression of survivin gene and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721.

METHODS: The 20mer antisense oligonucleotide (ASODN) targeted to the promotor region of survivin mRNA was designed and synthesized. The expression of survivin gene in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 was blocked by means of ASODN transfection mediated by DOTAP liposomal reagent. The changes of survivin protein and mRNA expression after transfection were assessed by Western blot and in situ hybridization, respectively. The apoptotic rate was detected by flow cytometer. The changes of cell adherent rate, cell growth activity, and the inhibitory rate of cell growth were also studied.

RESULTS: The expression of survivin protein and mRNA was decreased markedly after survivin ASODN transfection (69.59 vs 10.71, and 75.61 vs 22.94, $P < 0.01$). Meanwhile, the cell adherent rate also decreased markedly (90.68% vs 33.16%, $P < 0.01$) while the apoptotic rate increased markedly (0.7% vs 31.35%, $P < 0.01$). The inhibitory effect on the cell growth could maintain about a week after transfection, and the highest inhibitory rate could be 71.8% three days after transfection.

CONCLUSION: Transfection of ASODN targeted to the promotor region of survivin mRNA by DOTAP liposomal transfection reagent can down-regulate the expression of survivin protein and mRNA significantly in 7721 cell line and

inhibit the proliferation of cancer cells. survivin may be an important target in the therapy of hepatocellular carcinoma.

Chen T, Jia YR, Zhao TJ, Yin ZL. Inhibitory effect of antisense oligonucleotide on the expression of survivin gene and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1546-1549

摘要

目的: 采用反义寡核苷酸封闭肝癌细胞中survivin基因的表达, 研究其对肝癌细胞生长的抑制作用。

方法: 针对survivin mRNA翻译起始位点设计并合成反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN); 采用脂质体介导 survivin ASODN 转染人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞, western-blot 及原位杂交方法检测 survivin 蛋白及 mRNA 表达, 流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化, 检测转染前后细胞贴壁率及细胞生长抑制率变化, 绘制细胞生长曲线。

结果: 脂质体介导 survivin 反义寡核苷酸转染肝癌细胞后 survivin 蛋白及 mRNA 表达分别从 69.59 及 75.61 降低至 10.71 及 22.94, 细胞贴壁率从 90.68% 降低至 33.16%, 细胞凋亡率从 0.7% 增加至 31.35%, 均有显著差异. 转染后对细胞生长的抑制作用可以维持大约 1 wk, 在转染后第 3 d 抑制率最高可达 71.8%。

结论: 脂质体介导转染 survivin 反义寡核苷酸可以有效降低细胞内 survivin 基因的表达, 诱导细胞发生凋亡, 抑制肝癌细胞生长。

陈涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良. survivin 反义寡核苷酸对肝癌细胞生长抑制作用的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1546-1549
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1546.asp>

0 引言

目前肝癌的治疗方法主要集中在抑制肝癌细胞增生和促进肝癌细胞凋亡两个方面^[1-14], 由于抑制细胞增生的方法对正常肝组织也可能造成较大损伤, 因此诱导肝癌细胞凋亡的方法可能更为合理. survivin 是新近发现的一种抑制细胞凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族成员, 仅特异性地表达于肿瘤组织, 在正常成人组织几乎不表达, 通过阻断细胞凋亡的发生过程, 在促进肿瘤的发生发展过程中发挥重要的作用^[15-25]. 本研究采用针对 survivin mRNA 设计的 ASODN, 通过脂质体介导转染人肝癌细胞 SMMC-7721 抑制其 survivin 的

表达, 并对其对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 SMMC-7721 为本中心自存, 水浴复苏后调节至 $1 \times 10^6/L$, 接种于 30 mL 培养瓶及铺有无菌盖玻片的 6 孔培养板, 以含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液, 置于 37^o, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 隔日换液, 常规培养至 80% 汇片后进行转染。硫代磷酸型寡核苷酸由上海生工生物工程公司合成, 序列如下: 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)序列 5' GGGGCACCCATGCCGCCGCC3'; 正义寡核苷酸(sense oligonucleotide, SODN) 序列: 5' GGCGGCGGCATGGGTGCCCC3'。两条序列均采用硫代磷酸型, 即在合成时用巯基取代寡核苷酸片段磷上的羟基。按照 DOTAP 脂质体转染试剂盒(Roche, USA)说明进行转染。

1.2 方法 根据转染复合物浓度分为 6 组, 1 组: 以无血清 RPMI1640 培养液代替转染复合物作为空白对照组; 2 组: 1 000 μg/L SODN 转染组; 3 组: 400, 600, 800, 1 000 μg/L ASODN 转染组; 每组设 5 组平行分组, 转染进行 24 h 后结束转染用 Western-blot 检测 survivin 蛋白的表达。收集 5×10^6 个细胞, 含 1 mmol/L PMSF(Merk, USA)的细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白质, 紫外分光光度法蛋白定量。40 μg 蛋白进行 120 g/L 十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳(Bio-Rad, USA), 以蛋白电泳转引仪(Bio-Rad, USA)将产物转至 PVDF 膜; 将膜 4 封闭过夜, TBST 洗膜, 加入 1: 1000 羊抗人 survivin (Santa-Cruz, USA), 4 摇床孵育过夜, TBST 洗膜, 加入 1: 4 000 兔抗羊 IgG/HRP(Santa-Cruz, USA) 室温孵育 90 min, TBST 洗膜, Lumiglo 化学发光试剂反应 1 min, X 片暗室曝光, 常规显影定影。图像以 Bio-Rad 图像分析系统分析, 以相应蛋白条带的平均光强度值表示 p38MAPK 表达的相对强度。

1.2.1 原位杂交检测 survivin mRNA 的表达 survivin cDNA 载体质粒为 pcDNA3.1(Invitrogen, USA), 按照质粒抽提纯化试剂盒(上海华舜, 中国)说明书将质粒转化、扩增、抽提、纯化, 以内切酶 EcoRI(Gibco, USA)将质粒线性化, 按 Dig-RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, German)说明以地高辛标记探针; 细胞铺片转染结束后, 以地高辛标记探针进行杂交, NBT-BCIP 显色液 40 μL 显色, 镜下观察, 适时终止显色。随机选择 5 个 200 倍视野, 计数细胞总数及染色阳性细胞数, 计算杂交阳性率=(杂交阳性细胞数/总细胞数) × 100%。杂交前用 RNase 100 mg/L, 37^o 1 h 预处理细胞片作阴性对照。用不含 survivin 反义 cRNA 探针的杂交缓冲液检测作空白对照。

1.2.2 细胞增殖活性测定 在 6 孔培养板内进行转染,

转染结束后换新鲜培养液继续培养 24 h 后终止培养, 倒置显微镜下观察细胞生长情况, 每孔分别随机计数 5 个 20×10 倍视野下贴壁细胞数及全部细胞数, 根据公式计算细胞贴壁率(%)=(贴壁细胞数/全部细胞数) × 100%。收集 ASODN 转染后的各组细胞, 调整至 $1.5 \times 10^7/L$, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL, 每组细胞接种 5 复孔, 共接种 7 板, 继续常规培养。每日取出一板, 弃去培养液, 生理盐水漂洗两遍, 5 g/L 结晶紫溶液染色, PBS 冲洗, 50^o 烘干, 加入 10 g/L SDS 溶液振荡溶解, 酶联免疫仪于 540 nm 读取 A 值。以 A 值为纵坐标, 以时间(d)为横坐标绘制生长曲线。计算细胞生长抑制率(%)= [1 - (试验组 A 值 / 空白对照组 A 值)] × 100%。收集 2×10^6 个细胞, 预冷的 700 mL/L 乙醇 4^o 固定 24 h, PBS 洗涤 3 次, 细胞重悬于 PBS 0.4 mL 中, 加入 5 g/L 的 RNase A 10 μL 37^o 孵育 1 h, 1 g/L PI 4^o 染色过夜, 流式细胞仪检测凋亡细胞的比率。Multicycle 软件进行数据处理。

统计学处理 结果以均数 ± 标准差(mean ± SD)表示, 采用 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验、方差分析和 q 检验分析。

2 结果

2.1 survivin 蛋白和 survivin mRNA 的表达 survivin 蛋白在人肝癌细胞 SMMC-7721 中高度表达, western blot 检测表明, SODN 转染组较正常对照组无明显变化; 600, 800 及 1 000 μg/L ASODN 组转染后 survivin 蛋白表达较正常对照及 SODN 转染组显著降低, 其中 1 000 μg/L 组转染结束后 survivin 蛋白表达仅为空白对照组的 15.4% (图 1, 表 1)。survivin mRNA 原位杂交产物呈蓝紫色,

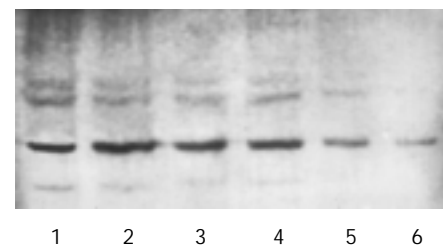


图 1 SMMC-7721 人肝癌细胞株 survivin 蛋白的表达 Western-blot 1: 空白对照组; 2: 正义对照组; 3: 400 μg/L ASODN 组; 4: 600 μg/L ASODN 组; 5: 800 μg/L ASODN 组; 6: 1 000 μg/L ASODN 组。

表 1 survivin ASODN 转染后细胞内 survivin 蛋白及 mRNA 表达的变化(mean ± SD)

分组	蛋白表达	mRNA 表达(%)
空白对照	69.59	75.61 ± 4.05
SODN	70.81	75.46 ± 4.48
400 μg/L ASODN 转染	52.72	61.83 ± 3.26
600 μg/L ASODN 转染	43.13	53.99 ± 2.82
800 μg/L ASODN 转染	25.82	28.21 ± 3.11 ^b
1 000 μg/L ASODN 转染	10.71	22.94 ± 2.46 ^b

^bP < 0.01 vs control.

主要分布于细胞质内. 经survivin ASODN作用后survivin mRNA 表达呈逐渐降低的趋势. 统计分析表明, 800 及 1 000 $\mu\text{g/L}$ ASODN组 survivin mRNA 杂交阳性率分别为 $28.2 \pm 3.1\%$ 和 $22.9 \pm 2.5\%$, 较正常对照及 SODN 转染组显著降低(图 2AB, 表 1).

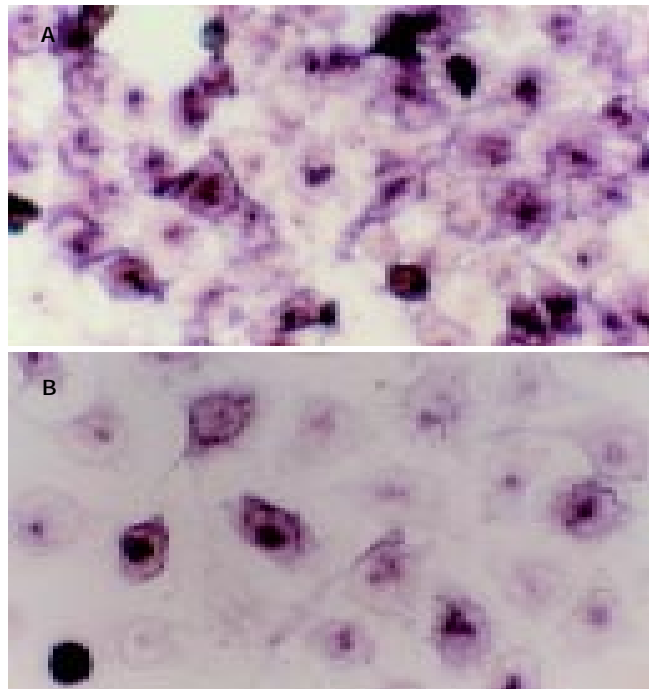


图2 SMMC-7721 人肝癌细胞株 原位杂交 $\times 400$. A: survivin mRNA 强阳性. B: 转染 survivin ASODN 后 survivin mRNA 明显减弱.

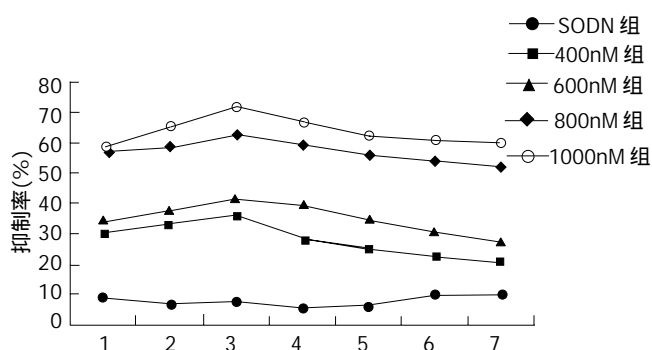


图3 细胞生长抑制率变化.

2.2 SMMC-7721细胞的增生活性 倒置显微镜下观察, 空白对照以及正义对照组细胞生长良好, 接种 4 h 后大多数细胞已贴壁生长, 形状舒展. survivin ASODN 转染后的细胞贴壁较晚, 随时间推移, 贴壁细胞减少, 24 h 后多数细胞呈悬浮状态. 经 survivin ASODN 作用后细胞贴壁率呈逐渐降低的趋势, 正义对照组及 400 $\mu\text{g/L}$ 组细胞贴壁率较空白对照组差异无显著性, 但 600, 800 及 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组细胞贴壁率分别为 $74.9 \pm 2.1\%$ 、 $51.5 \pm 1.5\%$ 及 $33.2 \pm 2.0\%$, 较正常对照($90.7 \pm 1.9\%$)及 SODN 转染组($90.0 \pm 1.2\%$)显著降低($P < 0.05$, 0.01 和 0.01). 细胞增生活性空白对照以及正义对照组较高, survivin ASODN 处理后各组细胞增生活性均有不同程度降低,

在转染后 3 d 细胞生长抑制率最高, 其中 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组在转染结束后第 3 d 对肝癌生长抑制率最高可达 71.8%, 其后逐渐缓慢下降, 至 7 d 仍可保持一定的生长抑制作用(图 3). 流式细胞仪定量检测凋亡细胞, 可见转染后 2 倍体峰(G1 期细胞)减少, G1 峰左侧出现明显的凋亡峰(亚二倍体峰). 各组细胞凋亡分别为 0.7%, 0.8%, 2.4%, 7.8%, 23.1% 及 31.4%, 实验组细胞凋亡均较对照组有显著增加.

3 讨论

研究发现 ASODN 可以在转录水平和翻译水平调节相关基因的表达^[26]. 随着 DNA 自动化合成技术的发展, 采用反义技术抑制和封闭特定基因的表达, 已经成为研究基因功能的重要方法以及基因治疗的重要组成部分. 我们设计了一种针对 survivin mRNA 翻译起始位点的 ASODN, 采用脂质体介导转染肝癌细胞 SMMC-7721, 以封闭 survivin 基因的表达, 并研究了其对肝癌细胞的生长抑制效应. 由实验结果可见, 我们针对 survivin mRNA 翻译起始位点设计的 ASODN 能够确实有效地封闭体外培养的肝癌 SMMC-7721 细胞 survivin 基因的表达, 并对抑制其生长活性具有明显的效果, 在转染后 3 d 抑制活性最高, 其后逐渐缓慢下降, 至转染后 7 d 仍能保持一定的抑制活性, 表明其药物作用效果具有一定的可持续性. ASODN 通过多种机制产生生物活性, 主要与 RNaseH 介导的靶 mRNA 水解, 以及由于 mRNA-DNA 异源双核酸分子所产生的空间位阻导致翻译停止有关^[27]. 我们发现, 经过 survivin ASODN 转染后, 细胞内 survivin 蛋白和 mRNA 的表达都降低, 但较小剂量(600 $\mu\text{g/L}$)的 ASODN 即可引起 survivin 蛋白表达的显著降低, 而同样剂量的 ASODN 还不足以引起 survivin mRNA 表达的显著变化, 当采用较大剂量(800 $\mu\text{g/L}$ 以上)的 ASODN 时才会引起 survivin mRNA 表达的显著降低, 说明 survivin ASODN 至少在蛋白翻译及 mRNA 转录两个水平发挥了作用, 其作用的差异可能与 ASODN 的设计有关. 本实验结果表明, 针对 survivin mRNA 翻译起始位点设计的 ASODN, 能够确实有效地封闭 survivin 的表达, 在 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组, 可将 survivin 蛋白的表达下调 84.6%, 将其 mRNA 的表达下调 69.7%, 可用于特异性地阻断 survivin 表达以研究其功能并进行反义治疗.

ASODN 是目前最有可能应用于临床的基因疗法^[28]. 由于 survivin 仅特异性地表达于肿瘤组织, 在正常成人组织几乎不表达, 使得应用 survivin 特异性抗体免疫治疗以及反义 survivin 基因治疗具有良好的靶向性、特异性及安全性, 这是其特有的优点^[29-30]. 我们在前期研究中发现, survivin 在人肝癌组织中的表达与肝癌细胞的增生凋亡比及分化程度有关, 并可作为预后不良的重要指标^[31]. 因此我们进一步研究了封闭 survivin 的表达对肝癌细胞的生长抑制作用, 结果发现, 采用针对 survivin mRNA 翻译起始位点设计的 20 聚 ASODN, 在

其有效地下调survivin mRNA及蛋白的表达的同时细胞增生活性受到了明显的抑制,经survivin ASODN作用后细胞贴壁率呈逐渐降低的趋势,600、800及1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ ASODN组细胞贴壁率较正常对照及SODN转染组显著降低.此外,反义药物作用的持续性对于评价药物作用,特别是对于给药方案具有重要的参考价值.实验结果表明survivin ASODN转染后的作用具有一定的持续性,转染结束后各组细胞增生活性均有不同程度降低,说明采用ASODN封闭survivin的表达能够确实地抑制肝癌细胞的增生活性.

在调控凋亡的基因中,survivin的抑凋亡作用在肿瘤发生发展中的作用是十分重要的.我们观察到survivin ASODN转染能够抑制肝癌细胞的生长,由于survivin主要作为抑凋亡基因在细胞中发挥作用,因此我们进一步研究了survivin ASODN转染对肝癌细胞的生长抑制效应是否与诱导细胞凋亡有关.采用流式细胞仪检测凋亡细胞比率,结果发现随着survivin ASODN剂量的增加,转染后凋亡细胞的比率逐渐增加,较对照组有显著差异,这也为survivin基因在肝癌细胞中发挥抑凋亡作用提供了新的证据.

4 参考文献

- Shi M, Zhang B, Tang ZR, Lei ZY, Wang HF, Feng YY, Fan ZP, Xu DP, Wang FS. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1146-1151
- Ruzzenente A, Manzoni GD, Molfetta M, Pachera S, Genco B, Donataccio M, Guglielmi A. Rapid progression of hepatocellular carcinoma after Radiofrequency Ablation. *World J Gastroenterol* 2004;10:1137-1140
- Ouyang GL, Cai QF, Liu M, Chen RC, Huang Z, Jiang RS, Chen F, Hong SG, Bao SD. Growth arrest and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells induced by hexamethylene bisacetamide. *World J Gastroenterol* 2004;10:954-958
- Wang TE, Kao CR, Lin SC, Chang WH, Chu CH, Lin J, Hsieh RK. Salvage therapy for hepatocellular carcinoma with thalidomide. *World J Gastroenterol* 2004;10:649-653
- He C, Lao WF, Hu XT, Xu XM, Xu J, Fang BL. Anti-liver cancer activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand gene and its bystander effects. *World J Gastroenterol* 2004;10:654-659
- Gu S, Liu CJ, Qiao T, Sun XM, Chen LL, Zhang L. Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor 165 eukaryotic expression vector on proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:535-539
- Li ZM, Liu ZC, Guan ZZ, Zhu XF, Zhou JM, Xie BF, Feng GK, Zhu ZY, Jiang WQ. Inhibition of DNA primase and induction of apoptosis by 3', 3'-diethyl-9-methylthia-carbocyanine iodide in hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:514-520
- Xiao EH, Li JQ, Huang JF. Effects of p53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2004;10:190-194
- 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;11:900-903
- 马力, 张月宁. 鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡及对相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:559-562
- Chao JC, Chu CC. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:37-41
- Chen XP, He SQ, Wang HP, Zhao YZ, Zhang WG. Expression of TNF-related apoptosis-inducing Ligand receptors and anti-tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing Ligand in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2433-2440
- Li Y, Shang P, Qian AR, Wang L, Yang Y, Chen ZN. Inhibitory effects of antisense RNA of HAb18G/CD147 on invasion of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:2174-2177
- Liu ZS, Tang SL, Ai ZL. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1968-1971
- Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003;88:31-52
- Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Sacconi G, Frati L, Agliano AM. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol* 2003;14:85-90
- Tomizawa M, Saisho H, Tagawa M. Regulatory regions of growth-related genes can activate an exogenous gene of the alpha-fetoprotein promoter to a comparable degree in human hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Res* 2003;23:3273-3277
- Schultz II, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA, Willems JL, Swinkels DW, de Kok JB. survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Res* 2003;23:3327-3331
- Pennati M, Binda M, Colella G, Zoppe' M, Folini M, Vignati S, Valentini A, Citti L, De Cesare M, Pratesi G, Giacca M, Daidone MG, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;23:386-394
- Altieri DC. survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- Altieri DC. survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:447-452
- Yang JH, Zhang YC, Qian HQ. survivin antisense oligodeoxynucleotide inhibits growth of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1121-1124
- Chang Q, Liu ZR, Wang DY, Kumar M, Chen YB, Qin RY. survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:415-418
- Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1435-1438
- Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:974-977
- Opalinska JB, Gewirtz AM. Therapeutic potential of antisense nucleic acid molecules. *Sci STKE* 2003;2003:pe47
- Holmlund JT. Applying antisense technology: Affinitak and other antisense oligonucleotides in clinical development. *Ann NY Acad Sci* 2003;1002:244-251
- Alama A, Barbieri F, Cagnoli M, Schettini G. Antisense oligonucleotides as therapeutics agents. *Pharmacol Res* 1997;36:171-178
- Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000;60:2805-2809
- Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowsert LM, Bennett F, Krajewski S, Krajewska M, Welsh K, Reed JC, Ng SC. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia* 2000;2:235-241
- 陈涛, 贾玉容, 田伏洲, 蔡忠红, 李广阔. 肝癌组织中survivin蛋白表达的意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:411-414

三氧化二砷诱导人类大肠癌细胞凋亡的分子机制

刘琳, 邱少敏, 赵伟, 夏海鸣, 秦叔逵, 陈惠英

刘琳, 东南大学附属中大医院肿瘤科 江苏省南京市 210009
邱少敏, 赵伟, 夏海鸣, 南京市肿瘤医院内科 江苏省南京市 210003
秦叔逵, 陈惠英, 中国人民解放军 81 医院全军肿瘤中心
江苏省南京市 210002
刘琳, 女, 1970-12-21 生, 江苏省无锡市人, 汉族, 1999 年南京中医药大学
硕士, 主治医师。
南京市医学科技发展专项资金资助, No.ZKG0018
项目负责人: 刘琳, 210009, 江苏省南京市丁家桥 87 号, 东南大学附属中大
医院肿瘤科. wenyu811@sohu.com
电话: 025-83272036
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-03-18

Molecular mechanism of arsenic trioxide inducing apoptosis in human large intestinal carcinoma cell line

Lin Liu, Shao-Ming Qiu, Wei Zhao, Hai-Ming Xia, Shu-Kui Qin, Hui-Ying Chen

Lin Liu, Department of Oncology, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Shao-Ming Qiu, Wei Zhao, Hai-Ming Xia, Department of Oncology, Nanjing Municipal Tumor Hospital, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China
Shu-Kui Qin, Hui-Ying Chen, Tumor Center of Chinese PLA, 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
Supported by the Municipal Medical Foundation of Nanjing, No. ZKG0018
Correspondence to: Lin Liu, Department of Oncology, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. wenyu811@sohu.com
Received: 2004-02-11 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To study the possible apoptosis-inducing effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on the different types of human large intestinal carcinoma cell, and its molecular mechanisms.

METHODS: As_2O_3 's action on the cell growth, apoptosis, periodic return and the expression of related genes of the two human large intestinal carcinoma cell lines LoVo and CoLo-320 *in vitro* was observed by MTT assay, acridine orange (AO)/ethidiumbromide (EB) fluorescent staining, electron microscopy detection, DNA gel electrophoresis, flow cytometry, and immunohistochemical staining.

RESULTS: After treated by As_2O_3 at different concentration (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L) for various times (24, 48, 72 h), the human large intestinal carcinoma cell LoVo and CoLo-320 showed strongly inhibitory effect on growth ($P < 0.05$) and also the cells showed typical morphological and biochemical characteristic changes of apoptosis, with bcl-2 gene expression down-regulated, and bax and Fas gene expression up-regulated ($P < 0.01$).

CONCLUSION: As_2O_3 has significant apoptosis-inducing effect on large intestinal carcinoma cells, which is regulated by several genes.

Lin L, Qiu SM, Zhao W, Xia HM, Qin SK, Chen HY. Molecular mechanism of arsenic trioxide inducing apoptosis in human large intestinal carcinoma cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1550-1554

摘要

目的: 明确三氧化二砷(As_2O_3)注射液对人类大肠癌细胞株的诱导凋亡作用,并探讨其分子机制。

方法: 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法、AO/EB 荧光染色法、透射电镜观察、DNA 电泳、流式细胞术及免疫组化等方法,系统地观察了 As_2O_3 注射液对体外培养的人类大肠癌细胞株 LoVo 和 CoLo-320 的生长活力、细胞凋亡、细胞周期及其相关基因表达的影响。

结果: 用不同浓度(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L) As_2O_3 作用 LoVo 和 CoLo-320 细胞不同时间(24, 48, 72 h),均能显著抑制其生长($P < 0.05$),用药后诱导其出现了典型的细胞凋亡的形态学和生化学改变,癌细胞 Bcl-2 基因表达明显下降, Bax 和 Fas 基因表达显著增强($P < 0.01$)。

结论: As_2O_3 注射液对人类大肠癌细胞具有显著的诱导凋亡作用,这一作用受到多种基因的调控,即 Bcl-2 基因表达下调, Bax 和 Fas 基因表达上调。

刘琳, 邱少敏, 赵伟, 夏海鸣, 秦叔逵, 陈惠英. 三氧化二砷诱导人类大肠癌细胞凋亡的分子机制. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1550-1554

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1550.asp>

0 引言

三氧化二砷(As_2O_3 , 亚砷酸)注射液治疗急性早幼粒细胞白血病(AML),取得了令世人瞩目的进展^[1-6]。 As_2O_3 注射液治疗实体瘤的作用受到了广泛重视^[7-15]。我们发现 As_2O_3 注射液具有抗肝癌作用,并对其作用机制进行了深入研究,结果令人鼓舞^[16-23]。为进一步拓展该药治疗消化系统恶性肿瘤的适应证,我们采用不同种类人结肠腺癌细胞株 LoVo 和 CoLo-320 作为对象,研究 As_2O_3 注射液的抗大肠癌作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠腺癌细胞株 LoVo 和 CoLo-320,均引自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液传代培养,当细胞生长活力良好时使用。1 g/L As_2O_3 溶液,即亚砷酸注射液,国药准字 X19990191,哈尔滨伊达药业公司产品。使用时以 RPMI1640 培养液稀释至所需浓度。RPMI1640 培养液,含 100 mL/L 新生小牛血清和青、链霉素各 1×10^5 u/L。四甲基偶氮唑蓝(MTT),购自 Fluka 公司,用 PBS 溶液将其稀释至 5 g/L,压滤除菌,4

避光保存. 蛋白酶K和RNase A均购自德国宝灵曼公司. 鼠抗人 Bcl-2、Bax 和 Fas mAb, 为福州迈新生物技术公司产品.

1.2 方法 MTT 法测定细胞抑制率. 将密度为 $2 \times 10^7/L$ 细胞接种于40孔细胞培养板中, 待细胞贴壁后分别加入不同浓度的药物, 设复孔和对照孔, 置 $37^\circ C$, 50 mL/L 5% CO_2 条件下培养至预定时间, 每孔加入 MTT 30 μL , 继续培养 4 h, 加 0.02 mol/L 盐酸异丙醇 100 μL /孔, 振荡混匀, 于酶联仪波长 570 nm 处测出各孔吸光度 A 值, 按下式计算细胞生长抑制率: 细胞抑制率 = $(1 - \text{给药孔平均 A 值} / \text{对照孔平均 A 值}) \times 100\%$. AO/EB 荧光染色法: 分别计数活细胞数(VN)、早期凋亡细胞(VA)、晚期凋亡细胞(NVA)、和死亡细胞(NVN), 细胞凋亡率按以下公式计算: 细胞凋亡率 = $[(VA + NVA) / (VN + VA + NVA + NVN)] \times 100\%$. 收集实验组和对照组细胞, 按常规透射电镜制样方法固定、包埋和染色, 于 H-300 型透射电镜下观察并拍照. 取 6×10^6 细胞加入细胞裂解液悬起细胞, 加入 100 g/L SDS 100 μL , 2.5 kg/L 蛋白酶 K 10 μL , 55 $^\circ C$ 保温 1 h, 再加入无 DNase 活性的 RNase A 10 μL (1 kg/L), 37 $^\circ C$ 保温 1 h, 再加入等体积的饱和酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次, 再用氯仿/异戊醇抽提 1 次, 加入二倍体积的无水乙醇, 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠, 置于 $-20^\circ C$ 1 h, 用 80% 乙醇清洗一次, 真空干燥, 加入 TE 缓冲液 60-100 μL . 取样品 20 μL 加入上样缓冲液 2 μL , 进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 收集 1×10^6 细胞乙醇固定, 离心去掉上清, 加 RNase A 200 μL 37 $^\circ C$ 水浴 30 min, 再加入 PI 染色液 800 μL 混匀, 至 4 $^\circ C$ 避光 30 min, 上机测试(美国 Becton Dickinson 公司产品), 所用软件为 ModFIT 和 CELLQUEST. 免疫组化按链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)免疫组化染色试剂盒说明书操作. 结果判断标准: 阳性细胞为胞质内、胞核和胞膜上显示棕色均匀颗粒. 按阳性细胞数和染色强度分为: - (阳性细胞数 < 5%), + (阳性细胞数占 5-25%, 胞质呈浅棕色), ++ (阳性细胞数占 25-50%, 胞质呈棕色颗粒状), +++ (阳性细胞数 > 50%, 胞质呈深棕色颗粒状, 染色较深).

统计学处理 采用 t 检验和 χ^2 检验进行显著性检验.

2 结果

2.1 结肠癌细胞的生长 应用 As_2O_3 后, 结肠癌细胞的生长受到不同程度抑制, 其抑制作用随药物浓度增加和作用时间延长而增强. 用不同浓度 As_2O_3 作用 LoVo 和 CoLo-320 细胞相同时间以及相同 As_2O_3 浓度处理不同时间的细胞抑制率相比, 均有明显差异 ($P < 0.05$, 图 1-2). 2.2 AO/EB 荧光染色法 经不同浓度 As_2O_3 作用不同时间后, 于荧光显微镜下均可观察到 LoVo 和 CoLo-320 细胞出现典型的细胞凋亡形态学改变, 主要表现为早期凋亡细胞核染色质着绿色并呈固缩状或碎片状, 晚期凋亡细胞核染色质着橘色并呈固缩状或碎片状. 半定量

计数结果表明, As_2O_3 能有效地诱导两株人大肠癌细胞凋亡, 其诱导凋亡作用与药物亦呈明显的量效与时效关系 ($P < 0.05$, 图 3-6).

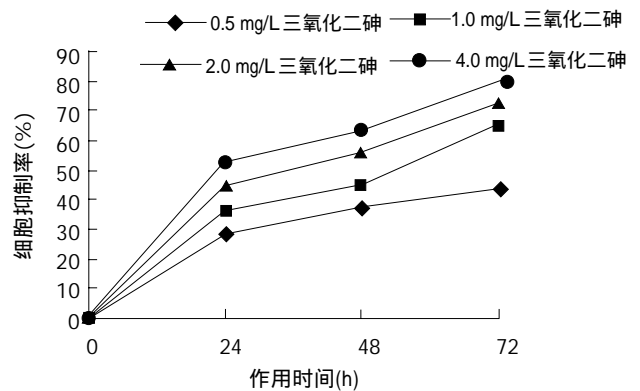


图1 三氧化二砷对 LoVo 细胞生长的抑制作用.

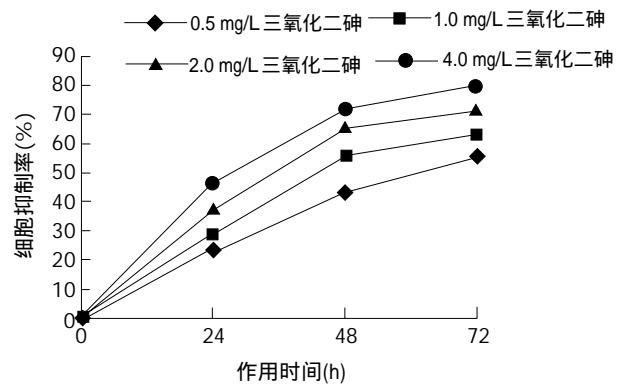


图2 三氧化二砷对 CoLo 细胞生长的抑制作用.

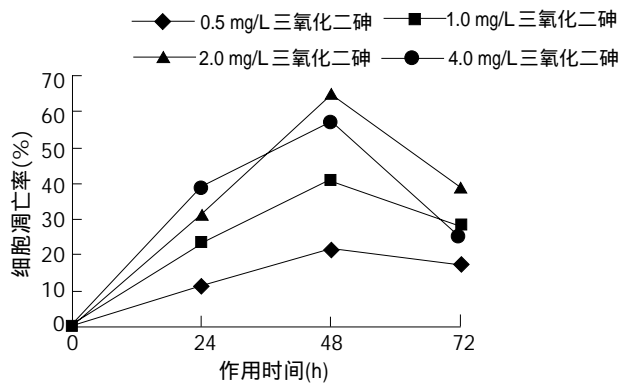


图3 三氧化二砷对 LoVo 细胞的诱导凋亡作用.

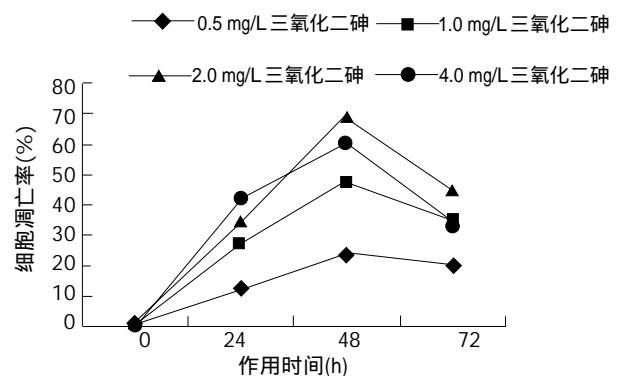


图4 三氧化二砷对 CoLo-320 细胞的诱导凋亡作用.

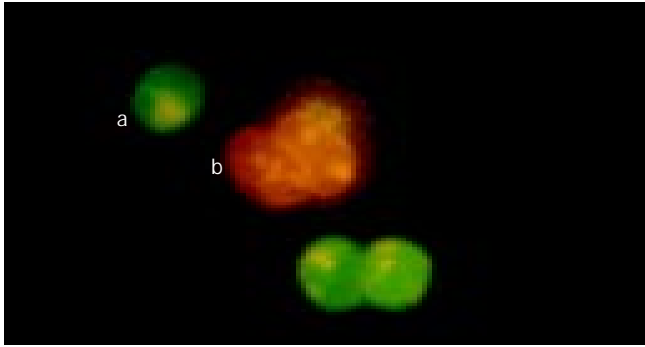


图5 荧光显微镜下观察(×400倍), 2 mg/L As₂O₃作用48 h后的LoVo细胞. a: 活细胞; b: 晚期凋亡细胞.

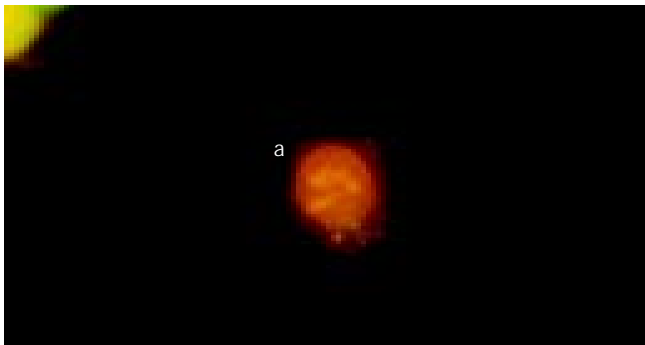


图6. 荧光显微镜下观察(×400倍), 2mg/LAs₂O₃作用48h后的CoLo-320细胞, a: 晚期凋亡细胞

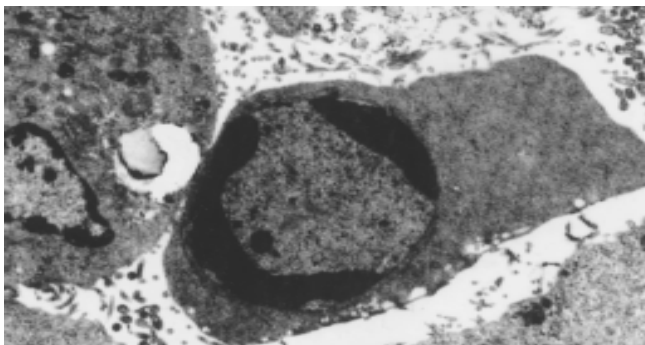


图7 透射电镜下观察(×7500倍), 1 mg/L As₂O₃作用48 h后的LoVo细胞, 细胞凋亡, 可见核固缩聚集于核膜内侧呈新月状.

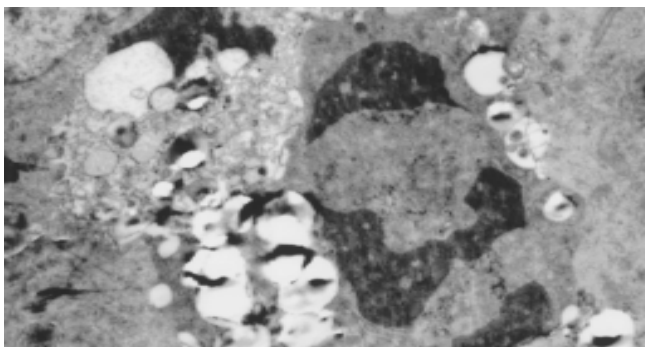


图8 透射电镜下观察(×7500倍), 1 mg/L As₂O₃作用48 h后的CoLo-320细胞, 细胞凋亡, 可见核固缩聚集于核膜内侧呈团块状.

2.3 透射电镜观察 经As₂O₃作用后部分LoVo和CoLo-320细胞出现细胞皱缩, 胞质浓缩, 可见胞质起泡及凋亡小体形成, 细胞核固缩, 核内染色质聚集于核膜

内侧呈团块或新月状, 细胞表面微绒毛减少, 甚至消失; 未加药组细胞胞膜完整, 表面微绒毛丰富, 细胞器结构正常, 核仁较大, 可见有多个核仁, 染色质均匀, 常染色质丰富(图7-8).

2.4 DNA凝胶电泳分析 不同浓度的As₂O₃作用LoVo和CoLo-320细胞48 h后, 细胞DNA在琼脂糖凝胶电泳上出现明显的DNA梯状降解, 而未加药组细胞DNA无此现象(图9).

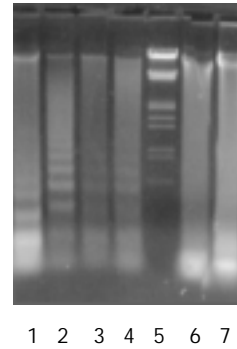


图9 DNA电泳分析. 1: 1 mg/L As₂O₃作用48 h后的LoVo细胞; 2: 2 mg/L As₂O₃作用48 h后的LoVo细胞; 3: 1 mg/L As₂O₃作用48 h后的CoLo-320细胞; 4: 2 mg/L As₂O₃作用48 h后的CoLo-320细胞; 5: Standard molecular weight; 6: LoVo细胞对照组; 7: CoLo-320细胞对照组.

2.5 流式细胞术分析 As₂O₃作用LoVo和CoLo-320细胞不同时间后, 在流式细胞仪DNA组方图上, 各组均可见凋亡细胞呈特征性的亚二倍峰(凋亡峰), 细胞周期分布显示2 mg/L As₂O₃作用24-72 h可使LoVo和CoLo-320细胞生长阻滞于S期(表1).

表1 2 mg/L As₂O₃对LoVo和CoLo-32细胞周期的影响(%)

细胞		G0/G1	S	G2/M
LoVo	对照	57.44	25.92	16.64
	用药 24 h	40.13	47.30	12.57
	48 h	53.32	31.52	15.17
CoLo-320	对照	53.76	28.37	17.87
	用药 24 h	46.10	39.49	14.41
	48 h	38.22	42.13	19.65
	72 h	44.21	43.19	12.60

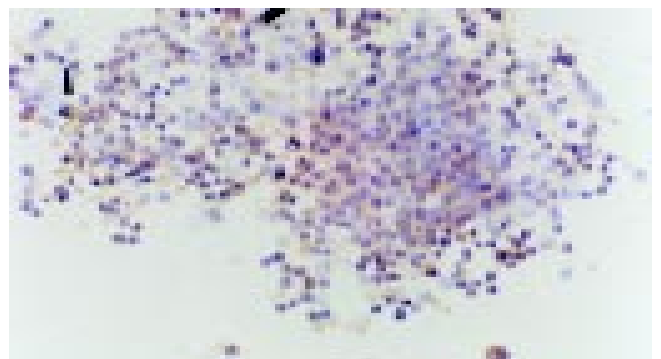
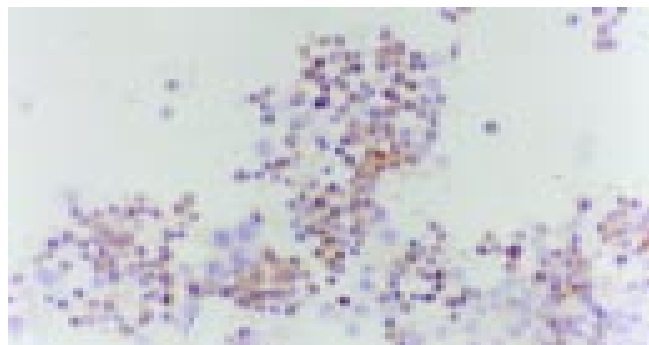
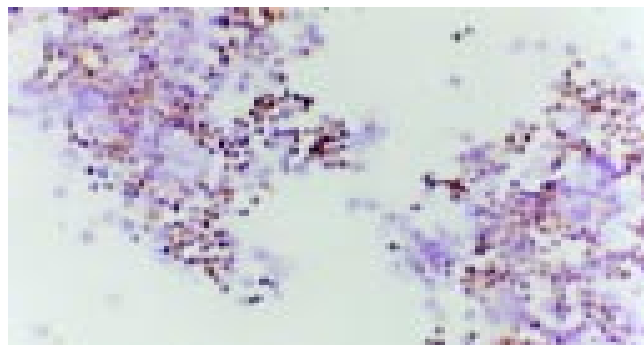
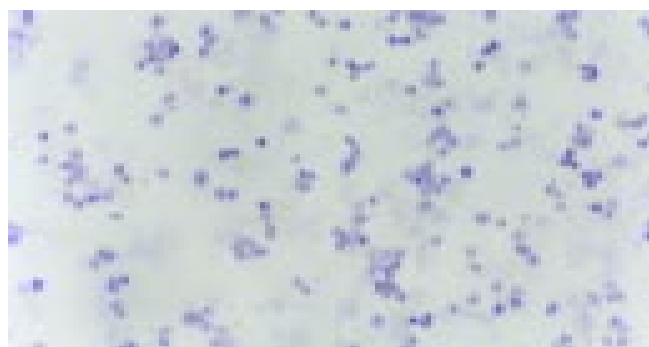


图10 LoVo细胞经2 mg/L As₂O₃处理48 h后Bcl-2蛋白表达(-), SP × 200.

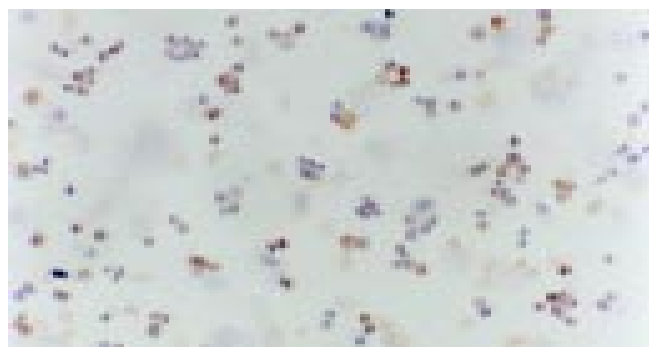
表 2 As₂O₃ 对 LoVo 细胞 Bcl-2、Bax 和 Fas 蛋白表达的影响

用药情况	标本数(片)	Bcl-2				bax				Fas				
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
LoVo	用药前	6	0	0	1	5	6	0	0	0	4	2	0	0
	用药后	6	6	0	0	0	0	0	1	5	0	0	1	5
CoLo-320	用药前	6	0	0	0	6	4	2	0	0	5	1	0	0
	用药后	6	6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	2	4

^bP < 0.01 vs 用药前.

图 11 LoVo 细胞经 2 mg/L As₂O₃ 处理 48 h 后 Bax 蛋白表达(+), SP × 200.图 12 LoVo 细胞经 2 mg/L As₂O₃ 处理 48 h 后 Fas 蛋白表达(+), SP × 200.图 13 CoLo-320 细胞经 2 mg/L As₂O₃ 处理 48 h 后 Bcl-2 蛋白表达(-), SP × 200.图 14 CoLo-320 细胞经 2 mg/L As₂O₃ 处理 48 h 后 bax 蛋白表达(+), SP × 200.

2.6 免疫组化分析 经 2 mg/L As₂O₃ 处理人肠癌 LoVo 和 CoLo-320 细胞 48 h 后, 其 Bcl-2 基因表达明显下降, Bax 和 Fas 基因表达显著增强(表 2 和图 10-15).

图 15 CoLo-320 细胞经 2 mg/L As₂O₃ 处理 48 h 后 Fas 蛋白表达(+), SP × 200.

3 讨论

恶性肿瘤的发生发展与凋亡调节紊乱密切相关^[24-26]. 抗

肿瘤药物的疗效不仅取决于他们对靶细胞的杀伤作用, 也取决于其诱导凋亡作用. 不少药物都是通过诱导或增强肿瘤细胞的凋亡发挥抗癌作用的, 寻找高效低毒的肿瘤细胞凋亡诱导剂已成为肿瘤治疗的新思路^[27-30]. 三氧化二砷(As₂O₃)是一种良好的急性早幼粒细胞白血病(APL)细胞凋亡诱导剂^[1-2, 4], 而且 As₂O₃ 对多种实体瘤细胞亦有良好的诱导凋亡作用^[8, 10-11, 13-14, 17]. 进一步探索 As₂O₃ 治疗实体瘤, 尤其是对化疗抗拒的大肠癌的可能性实属必要. 我们发现, 两株人大肠癌细胞经 As₂O₃ 处理后, 在荧光显微镜下观察到典型凋亡细胞出现, 并呈量效和时效特点, 凋亡细胞核呈固缩状或碎裂状; 透射电镜观察, 可见细胞皱缩, 胞质浓缩, 染色质聚集于核膜内侧呈团块状或新月帽状, 可见质膜起泡及凋亡小体形成; 细胞 DNA 在琼脂糖凝胶电泳上出现明显梯形条带(ladder); 在 DNA 组方图上可见凋亡峰. 以上结果证明, As₂O₃ 可有效诱导人类大肠癌细胞凋亡. 经 As₂O₃ 作用后, 通过对两株人大肠癌细胞生长活力和诱导凋亡情

况的动态观察,我们发现药物作用细胞后0-72 h内,细胞抑制率一直随时间的延长而增强,而细胞凋亡率却在48 h达到高峰后开始下降,这提示我们As₂O₃引起的人大肠癌细胞死亡是非典型死亡,即凋亡和坏死现象共存,As₂O₃在诱导人大肠癌细胞凋亡的同时也发挥了一定的细胞毒作用;药物作用48 h后,细胞抑制率与细胞凋亡率成负相关的另一可能原因是在凋亡后期发生继发性的细胞膜改变而成为继发性坏死。

凋亡是一种受基因调控的细胞主动死亡过程,目前认为与肿瘤细胞凋亡相关的基因主要有Bcl-2基因家族、P53基因、apo-1/fas基因和c-myc基因等^[31]。本研究表明,LoVo和CoLo-320细胞Bcl-2大量表达,同时伴有Bax和Fas基因的杂合性缺失,而经As₂O₃处理后,明显下调Bcl-2基因的表达,增强Bax和Fas基因表达,使Bcl-2/Bax比值减少,这应是As₂O₃诱导LoVo和CoLo-320细胞凋亡的分子机制之一。此外,流式细胞术研究结果发现,经As₂O₃处理后,两株大肠癌细胞周期分布与对照细胞明显不同,As₂O₃改变了大肠癌细胞的周期分布,使S期细胞所占比例升高。As₂O₃作用的这一细胞动力学特性提示该药可能为细胞周期特异性药物,这与以往多位作者的研究结果基本一致^[17]。

总之,As₂O₃在体外对上述不同种类两株人大肠癌细胞株均有显著的抑制作用,这种作用与诱导细胞凋亡密切相关,并具有量效性、时效性和周期特异性,其作用机制可能与下调抑凋亡基因Bcl-2表达,增强促凋亡基因Bax和Fas表达及细胞周期阻滞有关。本研究为临床上应用As₂O₃治疗人类大肠癌和其他恶性肿瘤提供了可靠实验依据。

4 参考文献

- Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, Han ZG, Ni JH, Shi GY, Jia PM, Liu MM, He KL, Niu C, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Paul P, Naoe T, Kitamura K, Miller W, Waxman S, Wang ZY, de The H, Chen SJ, Chen Z. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute Promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 1997;89:3345-3353
- Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997;89:3354-3360
- Carmosino I, Latagliata R, Avvisati G, Breccia M, Finolezzi E, Lo Coco F, Petti MC. Arsenic trioxide in the treatment of advanced acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2004;89:615-617
- Zhu J, Okumura H, Ohtake S, Nakamura S, Nakao S. The molecular mechanism of arsenic trioxide-induced apoptosis and oncosis in leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Haematol* 2003;110:1-10
- Zhang P, Wang S, Hu L, Qiu F, Yang H, Xiao Y, Li X, Han X, Zhou J, Liu P. Seven years' summary report on the treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide-an analysis of 242 cases. *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2000;21:67-70
- Zhou J, Meng R, Wang Y, Yang BF. Clinical observation and following up of two administration methods of arsenic trioxide in treatment of acute promyelocytic leukemia. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2004;84:405-408
- Huang SG, Kong BH, Ma YY, Jiang S. Impact of arsenic trioxide on proliferation and metastasis of drug-resistant human ovarian carcinoma cell line. *Ai Zheng* 2002;21:863-867
- Gu QL, Li NL, Zhu ZG, Yin HR, Lin YZ. A study on arsenic trioxide inducing in vitro apoptosis of gastric cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2000;6:435-437
- Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, Kakizuka A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ* 2004;5[Epub ahead of print]
- Deng Y, Lin C, Zhang X, Chen D, Xiao P, Wu M. Arsenic trioxide induced human esophageal cancer Ec109 cell apoptosis with downregulation of c-myc gene expression. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2000;22:67-70
- Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide induces apoptosis in pancreatic cancer cells via changes in cell cycle, caspase activation, and GADD expression. *Pancreas* 2003;27:174-179
- Li D, Du C, Lin Y, Wu M. Inhibition of growth of human nasopharyngeal cancer xenografts in SCID mice by arsenic trioxide. *Tumori* 2002;88:522-526
- 苏颖, 陈增, 林可焯, 邹长梭, 林华妹. 三氧化二砷抑制肝癌细胞端粒酶表达及诱导细胞凋亡作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:264-267
- 聂林, 张涓, 张建军, 王随照. bcl-2基因的反义寡核苷酸与三氧化二砷联合对恶性淋巴瘤细胞系凋亡的影响. *中国癌症杂志* 2002;12:197-200
- 王秀丽, 孔力, 赵瑾瑶, 杨佩满. 三氧化二砷逆转人乳腺癌MCF-7/ADM细胞耐药的机制研究. *中华肿瘤杂志* 2002;24:339-343
- Chen H, Qin S, Pan Q. Antitumor effect of arsenic trioxide on mice experimental liver cancer. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:27-29
- Liu L, Qin S, Chen H, Wang J, Chen H, Ma J, Liu W. An experimental study on arsenic trioxide-selectively induced human hepatocarcinoma cell lines apoptosis and its related genes. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:367-369
- Wang W, Qin SK, Chen BA, Chen HY. Experimental study on antitumor effect of arsenic trioxide in combination with cisplatin or doxorubicin on hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:702-705
- Qian J, Qin S, He Z. Arsenic trioxide in the treatment of advanced primary liver and gallbladder cancer. *Zhonghua Zhong liu Zazhi* 2001;23:487-489
- Qian J, Qin S, He Z, Wang L, Chen Y, Shao Z, Liu X. Arsenic trioxide for the treatment of medium and advanced primary liver cancer. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002;10:63
- 刘琳, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英, 陈洪, 刘文虎. 三氧化二砷对人肝癌细胞选择性抑制作用的实验研究. *临床肿瘤学杂志* 1999;4:39-41
- 刘琳, 邱少敏, 赵伟, 夏海鸣, 秦叔逵, 陈惠英. As₂O₃注射液体外对人大肠癌细胞抑制作用的观察. *南京中医药大学学报* 2004;20:42-44
- 汤秀红, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿. 三氧化二砷与顺铂合用抗人肝癌细胞株 QGY-7701 的实验研究. *肿瘤防治研究* 2002;29:362-364
- Amarante-Mendes GP, Finucane DM, Martin SJ, Cotter TG, Salvesen GS, Green DR. Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ* 1998;5:298-306
- Green DR, Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol* 1995;7:694-703
- Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;18:137-153
- Martin SJ, Green DR. Apoptosis as a goal of cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 1994;6:616-621
- 高虎, 陈嘉屿, 余西林. 药物诱导细胞凋亡治疗肝癌. *世界华人消化杂志* 2001;9:686-688
- 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
- 高虎, 赵治华, 杨峰. 三氧化二砷诱导细胞凋亡治疗消化道肿瘤的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:710-711
- Chung TK, Cheung TH, Lo WK, Yim SF, Yu MY, Krajewski S, Reed JC, Wong YF. Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Lett* 2002;180:63-68

丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3上调硫氧还蛋白还原酶1基因的表达式

纪冬, 成军, 郭江, 董菁, 王建军, 刘妍

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

纪冬, 男, 1975-12-05生, 河北省怀来县人, 汉族, 2002年解放军军医进修学院传染病学硕士生, 医师, 从事病毒性肝炎的临床治疗及实验研究。

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: 2004-03-26 接受日期: 2004-05-11

Hepatitis C virus NS3 protein up-regulates expression of thioredoxin reductase 1 gene

Dong Ji, Jun Cheng, Jiang Guo, Jing Dong, Jian-Jun Wang, Yan Liu

Dong Ji, Jun Cheng, Jiang Guo, Jing Dong, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

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

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

Received: 2004-03-26 Accepted: 2004-05-11

Abstract

AIM: To investigate the transactivating effect of HCV NS3 protein on TXNRD1 gene promoter and the molecular biological mechanisms of HCV NS3 protein in HCV pathogenicity.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify the coding sequence of TXNRD1 promoter from HepG2 genomic DNA, and the product was subcloned into pCAT3-Basic by *Kpn* I and *Xho* I, named pCAT3-TXNRD1p. pCAT3-TXNRD1p was transfected into the hepatoblastoma cell line HepG2, then cotransfected with pcDNA3.1(-)-NS3 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 NS3 protein to TXNRD1 gene promoter.

RESULTS: The expression vector pcDNA3.1(-)-NS3 and report vector pCAT3-TXNRD1p were constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing.

The expression of CAT in HepG2 cells co-transfected with pCAT3-TXNRD1p and pcDNA3.1(-)-NS3 is 9 times as higher as that of pCAT3-Basic, and twice as higher as that of pCAT3-TXNRD1p.

CONCLUSION: HCV NS3 protein can transactivate TXNRD1 promoter, and therefore up-regulate the expression of TXNRD1 gene.

Ji D, Cheng J, Guo J, Dong J, Wang JJ, Liu Y. Hepatitis C virus NS3 protein up-regulates expression of thioredoxin reductase 1 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1555-1558

摘要

目的: 探讨丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白NS3对硫氧还蛋白还原酶1(TXNRD1)启动子转录的激活作用。

方法: 以HCV非结构蛋白NS3反式调节基因的基因表达谱芯片结果为基础,利用生物信息学技术确定TXNRD1的启动子区域(TXNRD1p)聚合酶链反应(PCR)扩增TXNRD1p,克隆至真核报告载体pCAT3-Basic中,构建pCAT3-TXNRD1p报告载体;以该质粒转染肝癌细胞系HepG2细胞系,用酶联免疫黏附法(ELISA)检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性;并与pcDNA3.1(-)-NS3共转染HepG2细胞系,用ELISA法检测CAT的表达活性。

结果: 成功获得TXNRD1启动子的正确克隆。CAT3-TXNRD1p和pcDNA3.1(-)-NS3瞬时转染的HepG2细胞的CAT表达活性是pCAT3-Basic空载体的9倍,pCAT3-TXNRD1p的2.0倍,进一步验证了利用基因表达谱技术研究HCV NS3蛋白反式激活作用的结果。

结论: TXNRD1启动子有顺式激活下游基因的活性;HCV的NS3蛋白具有对TXNRD1的反式激活作用。

纪冬, 成军, 郭江, 董菁, 王建军, 刘妍. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3上调硫氧还蛋白还原酶1基因的表达式. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1555-1558
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1555.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的感染是严重的医学和社会经济学问题^[1-10]。HCV为单股正链RNA病毒,具有一个大的开放阅读框(ORF),编码约3 010个氨基酸(aa)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^[11-12]。其中NS3蛋白具有丝氨酸

蛋白酶、三磷酸核苷酶(NTPase)和解旋酶(helicase)的功能,在HCV多聚蛋白的成熟和病毒复制过程中发挥重要作用,并且对于宿主多种基因具有反式激活作用,影响了细胞的功能,诸如细胞增生、凋亡,甚至是HCV致癌作用^[13-19].我们采用分子克隆技术构建TXNRD1基因启动子的真核报告载体和HCV NS3基因的真核表达载体,瞬时转染HepG2细胞系的结果表明,克隆得到的TXNRD1启动子具有启动子活性;HCV NS3蛋白可以激活TXNRD1启动子,使下游的CAT基因的表达增强,为研究NS3蛋白的生物学功能,特别是他的反式激活作用提供新的线索.

1 材料和方法

1.1 材料 重组表达载体pcDNA3.1(-)-NS3为本室构建,人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞及大肠杆菌JM109菌株为本室保存.Tag DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制性内切酶均购自Takara公司.质粒DNA提取试剂盒,中间载体pGEM-T及报告质粒pCAT3-Basic均购自Promega公司;CAT-ELISA检测试剂盒及质粒DNA转染试剂盒购自Roche公司.玻璃奶纯化试剂盒购自博大公司.其他生化试剂购自Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 TXNRD1启动子的结构分析及聚合酶链反应扩增 根据GenBank中TXNRD1及其启动子的基因序列^[20],确定TXNRD1的翻译起始点(ATG),选取其上游-1 057至-122 bp为目的片段,设计并由上海博亚公司合成引物,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 AGC TGG AGT TAA AAG ACA CTC TGA G-3',下游引物:5'-CTC GAG TCA GAC ACG CCT TAA AAT ATC TTC C-3'.以HepG2细胞基因组为模板,进行聚合酶链反应(PCR)反应(PE9600 PCR仪),扩增条件:94 预变性5 min,94 变性1 min,62 退火1 min,72 延伸1 min,循环35次后,72 保温10 min.PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳,切胶,玻璃奶法回收纯化.

1.2.2 pCAT3-TXNRD1p的瞬时转染及报告基因CAT活性检测 回收产物在T4 DNA连接酶的作用下,与pGEM-T载体连接,转化大肠杆菌JM109感受态细胞,挑取在选择平皿(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色菌落提取质粒,经酶切(Kpn I/Xho I)鉴定.Kpn I/Xho I双酶切重组质粒pGEM-T-TXNRD1p,玻璃奶纯化回收酶切产物,定向克隆至pCAT3-Basic载体,构建成重组质粒pCAT3-TXNRD1p,经酶切及DNA测序鉴定(上海博亚公司).磁珠法提取质粒以备转染.HepG2细胞系在含100 mL/L胎牛血清的DMEM中培养.于35 mm平皿中生长至50%-80%融合时采用脂质体转染法,具体转染方法参照FuGENE6 Transfection Reagent说明书进行,pCAT3-TXNRD1p转染剂量为1 μg.设置pCAT3-Basic(1 μg)为阴性对照组,pCAT3-promoter(1 μg)为阳性对照组,

转染24 h后收获细胞,用于CAT活性检测以验证所克隆的片段具有启动子活性.选用不同剂量的重组报告质粒pCAT3-TXNRD1p(0.029,0.044,0.059,0.088,0.117 μg)分别转染HepG2细胞,设置pCAT3-Basic(1 μg)为阴性对照组,转染24 h后收获细胞,检测CAT含量,并绘制剂量-效应曲线图.根据剂量曲线,选择恰当的pCAT3-TXNRD1p剂量(0.029 μg)与pcDNA3.1(-)-NS3(1 μg)以脂质体法共转染HepG2细胞系.设置pCAT3-Basic(1 μg)为阴性对照组,pCAT3-TXNRD1p(0.029 μg)为阳性对照组,转染24 h后收获细胞.收集细胞裂解液,用于CAT活性检测.所有实验严格平行操作.取1.0 μg/L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 温育1 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)各200 μL,37 温育1 h后,加入过氧化物酶的底物室温显色20 min.用酶标仪检测标本在415 nm检测波长,490 nm参考波长下的吸光度(A)值,其数值反映细胞提取物中的CAT表达水平.

2 结果

2.1 pCAT3-TXNRD1p重组质粒的构建 利用自行设计的引物成功扩增出TXNRD1的基因启动子序列,经10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约950 bp,与预期片段符合(图1).将扩增产物与pGEM-T载体连接,双酶切鉴定,10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带(3 000 bp的pGEM-T载体和937 bp的TXNRD1启动子DNA片段),与预期一致(图2).将双酶切产物与pCAT3-Basic载体连接,双酶切鉴定如图3所示(4 000 bp的pCAT3-Basic载体和937 bp的TXNRD1p DNA片段),DNA测序结果和GenBank中TXNRD1启动子的基因序列完全一致.图4为pCAT3-TXNRD1p质粒结构图.

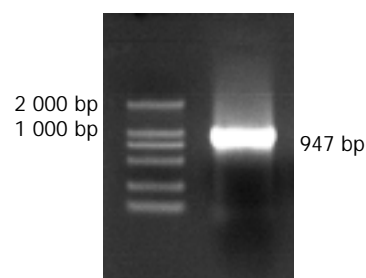


图1 以HepG2基因组DNA为模板,PCR扩增TXNRD1启动子序列.

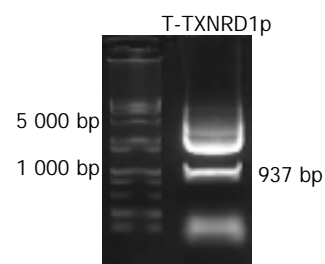


图2 pGEM-T-TXNRD1p双酶切鉴定(Kpn I/Xho I).

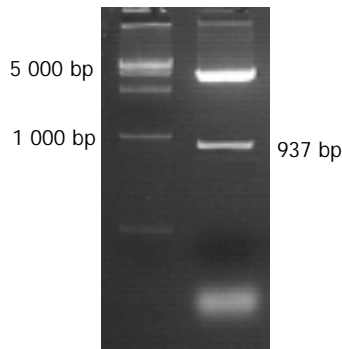


图3 pCAT3-TXNRD1p 双酶切鉴定(Kpn I/Xho I).

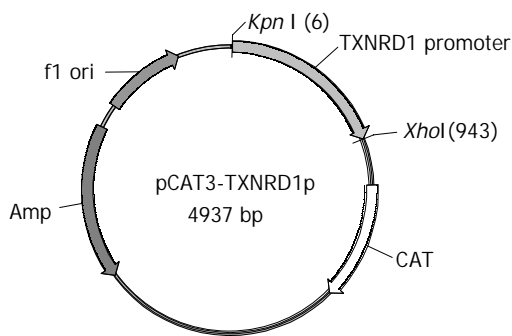


图4 pCAT3-TXNRD1p 质粒结构图.

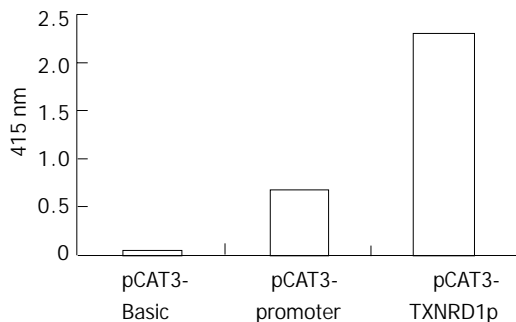


图5 pCAT3-TXNRD1p 转染 HepG2 细胞 CAT 表达.

2.2 pCAT3-TXNRD1p 重组质粒的瞬时转染及报告基因 CAT 的表达 将重组质粒 pCAT3-TXNRD1p 转染 HepG2 细胞, CAT ELISA 检测吸光度, 空载体对照组 pCAT3-Basic 的吸光度为 0.050, 阳性对照组 pCAT3-promoter 为 0.675, pCAT3-TXNRD1p 为 2.310(图 5), 表明 pCAT3-TXNRD1 具有很强的启动子活性. 由于 pCAT3-TXNRD1p 1 μg 转染剂量时其上调 CAT 表达很强, 故将原液稀释 30 倍后分别取用 2, 3, 4, 6, 8 μL 进行转染, 转换为质量数为 0.029, 0.044, 0.059, 0.088, 0.117 μg , 以获得较好的曲线关系, 其 CAT 吸光度值分别为: 0.162, 0.189, 0.201, 0.220, 0.250(图 6), 说明 TXNRD1 启动子的顺式激活效应具有剂量依赖性. 选择恰当的 pCAT3-TXNRD1p 剂量(0.029 μg)与 pcDNA3.1(1)-NS3(1 μg)重组质粒共转染 HepG2 细胞及检测 CAT 的表达. pCAT3-Basic 的 CAT 的吸光度值为 0.010, pCAT3-TXNRD1p 的 CAT 的吸光度值为 0.044, 共转染 pCAT3-

TXNRD1p/pcDNA3.1(-)-NS3 的吸光度值为 0.090, 较实验对照质粒明显升高, 是 pCAT3-Basic 空载体的 9.0 倍, 是 pCAT3-TXNRD1p 的 2.0 倍, 说明 HCV NS3 蛋白对 TXNRD1 基因启动子有反式激活作用, 使其下游 CAT 基因的表达增强(图 7).

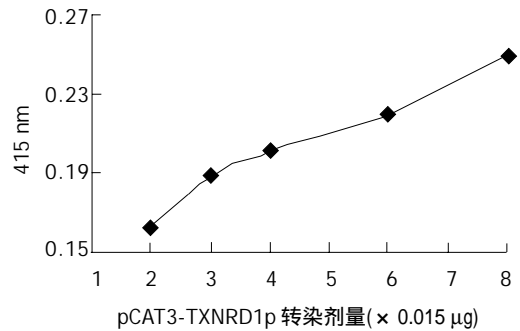


图6 pCAT3-TXNRD1p 的剂量曲线.

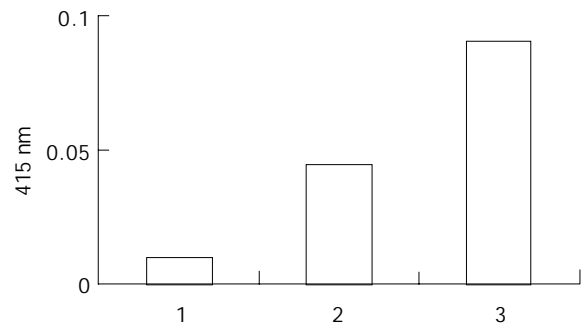


图7 pCAT3-TXNRD1p 与 pcDNA3.1(-)-NS3 共转染 HepG2 后 CAT 表达. 1: pCAT3-Basic; 2: pCAT3-TXNRD1p; 3: pCAT3-TXNRD1p+pcDNA3.1(-)-NS3.

3 讨论

哺乳类硫氧还蛋白(Trx)通过 TXNRD 还原后参与了脱氧核糖核苷酸的合成, 转录因子氧化还原作用的调控, 过氧化物的还原以及凋亡的调控. Trx 的氧化状态非常的重要, TXNRD 的活性对于细胞增生或者是免疫性疾病非常重要. TXNRD 是一类含有硒代半胱氨酸的氧化还原酶, 以二聚体的形式存在. TXNRD 酶的羧基(C)-末端的 -甘氨酸-半胱氨酸-硒代半胱氨酸-甘氨酸-COOH 序列形成了一个硫化硒/硒化硒氧化还原活性域, 这个结构域可以接受来自于氨基(N)-末端的 -半胱氨酸-缬氨酸-天门冬酰胺-缬氨酸-甘氨酸-半胱氨酸基序所提供的电子, 从而调节其下游的多种细胞内的氧化还原敏感的蛋白^[21-23], 包括凋亡信号调节激酶 1, 亚砷蛋氨酸还原酶以及一些转录因子. 最近的研究表明哺乳类共有 3 种类型的 TXNRD, 他们分别是位于所有细胞胞质内的 TXNRD1, 位于线粒体的 TXNRD3 和只存在于睾丸的 TGB^[24]. TXNRD1 和其底物硫氧还蛋白 1(Trx1) 组成了一个氧化还原系统, TXNRD1 促进了 Trx1 的还原, 调节氧化应激, 还影响了细胞信号转导途径, 如核因子 NF- κ B、蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)和抗氧化物酶等.

TXNRD1 具有重要的抗氧化和氧化还原调节作用, 他的 mRNA 水平是通过 AUUUA 基序(AU-富含元件 AREs) 在转录后进行调整的^[25-27]. 这里我们克隆并鉴定了 947 bp 的 TXNRD1 近端启动子, 其核心启动子 GC 含量高而缺少 TATA 和 CCAAT 盒, 通过实验证明所得到的序列具有很强的启动子活性.

HCV NS3 蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是血清应答元件(SRE)、激活蛋白 1(AP-1)、血清应答因子(SRF) 等信号转导途径具有增强作用. Sakamuro et al 研究显示, NS3 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, 直接证明了 HCV NS3 蛋白的恶性转化潜能. NS3 还可能通过解旋酶活性诱导肝细胞基因组的不稳定性, 甚至发生突变. 另外, NS3 能与蛋白激酶 A(PKA) 催化亚单位特异结合, 可能干扰 RNA 与细胞内信号转导过程, 严重干扰细胞正常功能. 刘妍 et al^[28] 研究表明 NS3 基因重组表达载体在 HepG2 细胞中表达相应的蛋白, 对 SV40 早期启动子具有反式激活作用, 从而使 SV40 启动子下游的 CAT 基因表达增强. 这些都是 HCV NS3 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, 说明 HCV NS3 蛋白的反式激活功能在 HCV 致病中发挥重要的作用.

我们运用基因表达谱芯片技术进一步研究了 NS3 蛋白反式激活作用的靶基因, 发现 NS3 蛋白可上调 TXNRD1 基因的表达. 为了验证 NS3 蛋白对 TXNRD1 的反式激活作用, 根据 GenBank 中 TXNRD1 及其启动子的序列, 确定 TXNRD1 的转录起始点, 选取其上游 -1057 至 -122 bp 序列进行克隆, 并构建含报告基因 CAT 的重组质粒, 结果发现 NS3 蛋白对 TXNRD1 的表达确有激活作用, 证实了基因表达谱芯片的结果. 而且 TXNRD1 的多种功能使得 NS3 蛋白的功能也变得更加的复杂, 说明了其在宿主细胞内涉及了极其广泛的信号调控过程, 从而参与了 HCV 的致病(癌)过程, 其中具体的机制尚需要进一步进行详细的研究.

4 参考文献

- 1 Thelu MA, Drouet E, Hilleret MN, Zarski JP. Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol* 2004;72:396-405
- 2 巨立中, 成军, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒复制模型系统. 世界华人消化杂志 2003;11:1954-1956
- 3 Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, Phillips R, Klenerman P. Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *J Immunol* 2004;172:1744-1753
- 4 成军, 刘妍, 杨倩, 王建军, 洪源, 王琳. 丙型肝炎病毒蛋白对 Bcl-10 蛋白信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1948-1951
- 5 Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9:1657-1661
- 6 Bahr MJ, el Menuawy M, Boeker KH, Musholt PB, Manns MP, Lichtinghagen R. Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 2003;23:420-425
- 7 He QQ, Cheng RX, Sun Y, Feng DY, Chen ZC, Zheng H. Hepatocyte transformation and tumor development induced by hepatitis C virus NS3 c-terminal deleted protein. *World J*

- 8 *Gastroenterol* 2003;9:474-478
- 8 Woitas RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, Spengler U. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:562-566
- 9 Zhou HC, Xu DZ, Wang XP, Zhang JX, Huang Y, Yan YP, Zhu Y, Jin BQ. Identification of the epitopes on HCV core protein recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:583-586
- 10 Sako K, Komorizono Y, Oketani M, Hasegawa S, Yamasaki N, Shibata T, Maeda M, Kohara K, Shigenobu S, Yasunari H, Sakurai K, Hiwaki T, Ishibashi K, Arima T. Outcome of patients with hepatitis C virus-related single, small hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2003;23:4191-4196
- 11 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;11:1014-1017
- 12 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
- 13 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 14 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 15 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:456-458
- 16 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 杨倩, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 与乙型肝炎病毒 X 蛋白协同反式激活作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:47-49
- 17 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 18 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 王春花, 党晓燕. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活基因 1 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:237-240
- 19 党晓燕, 成军, 刘妍, 邓红, 杨倩, 王建军, 纪冬, 王春花. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活基因 2 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:241-244
- 20 Rundlof AK, Carlsten M, Arner ES. The core promoter of human thioredoxin reductase 1: cloning, transcriptional activity, and Oct-1, Sp1, and Sp3 binding reveal a housekeeping-type promoter for the AU-rich element-regulated gene. *J Biol Chem* 2001;276:30542-30551
- 21 Karimpour S, Lou J, Lin LL, Rene LM, Lagunas L, Ma X, Karra S, Bradbury CM, Markovina S, Goswami PC, Spitz DR, Hirota K, Kalvakolanu DV, Yodoi J, Gius D. Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene* 2002;21:6317-6327
- 22 Xia L, Nordman T, Olsson JM, Dandimopoulos A, Bjorkhem-Bergman L, Nalvarte I, Eriksson LC, Arner ES, Spyrou G, Bjornstedt M. The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *J Biol Chem* 2003;278:2141-2146
- 23 Zhang J, Svehlkova V, Bao Y, Howie AF, Beckett GJ, Williamson G. Synergy between sulfuraphane and selenium in the induction of thioredoxin reductase 1 requires both transcriptional and translational modulation. *Carcinogenesis* 2003;24:497-503
- 24 Osborne SA, Tonissen KF. Genomic organisation and alternative splicing of mouse and human thioredoxin reductase 1 genes. *Bm Genomics* 2001;2:10
- 25 Sakurai A, Yuasa K, Shoji Y, Himeno S, Tsujimoto M, Kunitomo M, Imura N, Hara S. Overexpression of thioredoxin reductase 1 regulates NF-kappa B activation. *J Cell Physiol* 2004;198:22-30
- 26 Anestel K, Arner ES. Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J Biol Chem* 2003;278:15966-15972
- 27 Ma X, Hu J, Lindner DJ, Kalvakolanu DV. Mutational analysis of human thioredoxin reductase 1. Effects on p53-mediated gene expression and interferon and retinoic acid-induced cell death. *J Biol Chem* 2002;277:22460-22468
- 28 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2003;28:44-46

应用基因表达谱芯片技术筛选 HBV 前 - S2 蛋白反式调节基因

纪冬, 成军, 董菁, 刘妍, 王建军, 郭江

纪冬, 成军, 董菁, 刘妍, 王建军, 郭江, 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

纪冬, 男, 1975-12-05 生, 河北省怀来县人, 汉族, 2002 年解放军军医进修学院传染病学硕士生, 医师, 从事病毒性肝炎的临床治疗及实验研究。

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

军队十五科技攻关项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

Screening and identification of genes trans-regulated by HBV pre-S2 protein with cDNA microarray

Dong Ji, Jun Cheng, Jing Dong, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Jiang Guo

Dong Ji, Jun Cheng, Jing Dong, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Jiang Guo, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

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

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

Received: 2004-03-15 Accepted: 2004-05-11

Abstract

AIM: To understand the target genes up-regulated or down-regulated by HBV pre-S2 protein, we compared the differentially expressed genes between the hepatoblastoma cell line HepG2 transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-preS2, respectively with cDNA microarray technique.

METHODS: The HBV pre-S2 coding DNA fragment was amplified with polymerase chain reaction (PCR) technique by using G376-7 plasmid containing the full length of HBV genome as the template. The expressive vector of pcDNA3.1-preS2 was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-preS2, respectively, using FuGENE6 transfection reagent. The total RNA was isolated and reversely transcribed. The cDNAs were subjected for microarray screening with 1 152 cDNA probes.

RESULTS: The expressive vector was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. High quality mRNA and cDNA were prepared and

successful microarray screening conducted. From the scanning results, it was found 42 genes were up-regulated and 36 genes down-regulated by pre-S2 protein of HBV.

CONCLUSION: HBV pre-S2 protein is a transactivator. The expression of pre-S2 protein affects the expression spectrum of HBV infected hepatocyte.

Ji D, Cheng J, Dong J, Liu Y, Wang JJ, Guo J. Screening and identification of genes trans-regulated by HBV pre-S2 protein with cDNA microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1559-1563

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)前-S2蛋白是由HBV S基因编码的具有多种功能的蛋白质。前-S2蛋白的表达对于HBV感染肝细胞的基因表达谱具有显著影响。为了研究前-S2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(-)-preS2分别转染的HepG2细胞的基因表达谱进行分析。

方法: 以含有HBV全基因组的质粒G376-7(GenBank号: AF384371)作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增前-S2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(-)-preS2。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, 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42个基因表达水平显著上调, 36个基因表达水平显著下调。

结论: HBV的前-S2蛋白是一种反式激活因子, 前-S2蛋白的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。

纪冬, 成军, 董菁, 刘妍, 王建军, 郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选 HBV 前 - S2 蛋白反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1559-1563
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1559.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝DNA病毒, 可以导致肝脏的急、慢性感染^[1-10]。急性感染可以进展为严重的病患, 大约0.5%的患者死于暴发性肝衰竭。慢性感染易发

展为肝硬化及肝细胞癌(HCC), 流行病学研究表明HBV携带者患癌的可能性明显高于正常人. 然而HBV在肝癌发病中的作用机制尚不清楚, 研究揭示了HBV进入肝细胞后, 可以与肝细胞染色体整合并编码两种反式调节因子: HBV X蛋白(HBxAg)和前-S2反式激活因子家族: 表面抗原大蛋白(LHBs)和羧基端截短型表面抗原中蛋白(MHBs^s). 尽管LHBs与MHBs^s具有反式激活作用, 但更进一步的研究表明主要是前-S区对于反式激活具有关键性的作用, 为了研究前-S2蛋白对于宿主细胞基因的上调、下调作用, 我们应用基因表达谱芯片技术, 对于前-S2蛋白基因和空白表达载体转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2 进行筛选, 试图从前-S2蛋白的表达对于肝细胞基因表达谱的影响这一角度, 探索HBV感染的发病机制, 包括HBV相关的HCC发生发展的分子生物学机制^[11-14].

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); FuGENE6转染试剂(Roche); 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 真核表达载体的构建及细胞转染 根据董菁 et al^[15-18]发表的 adr 亚型 HBV 的基因序列, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡聚核苷酸引物(上游: 5' -GAT ATC ATG CAG TGG AAC TCC ACC-3'; 下游: 5' -GGA TCC TTA GTT CGG TGC AGG GTC-3'), 在引物的两端分别引入了 EcoR V 和 BamH I 酶切位点, 引物由上海博亚公司合成. 使用 25 μL 反应体系, 以 G376-7(GenBank 号: AF384371)质粒 DNA 为模板, 放入 PE9600 PCR 仪中扩增. 扩增条件: 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 35 次后, 72 °C 保温 10 min. 9 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果. 扩增的 HBV 前-S2 蛋白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(-)-preS2. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-preS2 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞. 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了前-S2 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.

1.2.2 基因表达谱芯片检测 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. 包含的 1 152 个 cDNA

由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 g/L 溶解于 3 × 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 硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用. 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. 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因 (24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点) 对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3, Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 HBV 前-S2 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-preS2 由本室构建. 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.

2.2 HBV 前-S2 蛋白反式调节基因 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 HBV 前-S2 蛋白的上调基因, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为前-S2 蛋白的下调基因. 我们发现 42 种基因的表达水平上调 (表 1), 有 36 种基因的表达水平下调 (表 2).

表 1 HBV 前-S2 蛋白上调基因类型

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	2.008	p53 结合蛋白 (MDM4)
2	2.043	促胸腺生成素 (TMPO)
3	2.077	TGF-β1Rα
4	2.117	真核翻译起始因子 3 亚单位 9 (EIF3S9)
5	2.143	NCK 相关蛋白 1 (NCKAP1)
6	2.147	B 细胞慢性淋巴细胞白血病 / 淋巴瘤 10 (BCL10)
7	2.159	CD24 抗原 (小细胞肺癌簇 4 抗原)
8	2.173	核糖体蛋白 S31 (MRPS31)
9	2.179	CGI-107 蛋白
10	2.230	肿瘤坏死因子 (配体) 超家族成员 10 (TNFSF10)
11	2.285	未知功能蛋白 (FLJ20432)
12	2.325	组[织]胺 - N - 甲基转移酶 (HNMT)
13	2.398	TRAIL 受体 2

14	2.462	凋亡相关的 RNA 结合蛋白(NAPOR-3)	17	0.385	ATP 合酶
15	2.485	胱冬肽酶 9(caspase 9)	18	0.400	RNA 多聚酶 I(RPA40)
16	2.495	翻译抑制蛋白 p14.5(UK114)	19	0.401	钙联接蛋白(CANX)
17	2.535	蛋白激酶 C(PKC)	20	0.403	干扰素 γ 受体 1(IFNGR1)
18	2.570	丝氨酸 - 苏氨酸激酶(KDS)	21	0.418	BCL2/ 腺病毒 E1B(19 kD)相互作用蛋白 3(BNIP3)
19	2.644	γ - 氨基丁酸(GABA) B 受体 1(GABBR1)	22	0.420	亮氨酸拉链(肿瘤中下调)1 (LDOC1)
20	2.667	KIAA1544 蛋白	23	0.422	胰岛素受体(INSR)
21	2.683	KIAA0583 蛋白	24	0.426	巨噬细胞游走抑制因子
22	2.717	B 细胞 RAG 相关蛋白(BRAG)	25	0.427	可溶性鸟苷酸环化酶 1 α 3(GUCY1A3)
23	2.741	胱冬肽酶 6(caspase 6)	26	0.431	热休克蛋白 2 (HSJ2)
24	2.754	酪蛋白激酶 1, alpha 1(CSNK1A1)	27	0.437	锌指蛋白 183 (RING finger, C3HC4 type) (ZNF183)
25	2.915	KIAA0156 蛋白	28	0.438	金属硫蛋白 3 (神经生长抑制因子) (MT3)
26	2.935	T 细胞白血病易位改变基因(TCTA)	29	0.439	干燥综合征抗原 B (自身抗原 La) (SSB)
27	3.045	溶血磷脂酶 I(LYPLA1)	30	0.445	CGI-26 蛋白(LOC51071)
28	3.067	γ - 氨基丁酸(GABA)A 受体	31	0.453	金属蛋白酶 1 (MP1)
29	3.088	乳酸脱氢酶 B	32	0.462	肿瘤易感基因 101 (TSG101)
30	3.109	凋亡蛋白 1 抑制子(MIHC)	33	0.471	转化生长因子 β 1(TGFB1)
31	3.210	翻译延长因子	34	0.474	CD59 抗原 p18-20
32	3.310	转化生长因子 β 受体 I	35	0.479	基质金属蛋白酶 1(MMP1)
33	3.616	可溶性鸟苷酸环化酶 beta3(GUCY1B3)	36	0.489	细胞死亡防御因子 1(defender against cell death 1, DAD1)
34	4.005	甘氨酸脒基转移酶(GATM)			
35	4.025	假想蛋白 BCRA2			
36	4.211	FKBP 相关蛋白(FAP48)			
37	4.513	CDC23			
38	4.777	未知功能(KIAA0205)蛋白			
39	4.900	硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)			
40	5.985	神经降压素(NTS)			
41	8.141	人蛋白激酶 2 型 调节亚单位(cAMP- 依赖)(PRKAR2B)			
42	9.770	巨噬细胞, 成红细胞黏附因子(MAEA)			

表 2 HBV 前 -S2 蛋白下调基因类型

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	0.256	谷氧还蛋白(硫醇转移酶)(GLRX)
2	0.289	核糖体蛋白 L32(RPL32)
3	0.297	胱冬肽酶 4(caspase 4)
4	0.322	死亡相关蛋白 6(DAXX)
5	0.330	钙调素结合蛋白 1(CALD1)
6	0.336	TRAF 和 TNF 受体相关蛋白(AD022)
7	0.344	SUMO-1 激活酶亚单位 1(SAE1)
8	0.351	未知功能蛋白(FLJ30414)
9	0.364	热休克 70kD 蛋白 9B(HSPA9B)
10	0.366	磷酸硒合成酶 2(SPS2)
11	0.368	层粘连蛋白 2(LAMB2)
12	0.371	CD14 抗原(CD14)
13	0.375	未知功能蛋白(HSPC111)
14	0.378	TNF 受体相关因子 2(TRAF2)
15	0.381	激肽释放酶 2(KLK2)
16	0.384	G 蛋白结合蛋白 CRFG(CRFG)

3 讨论

基因表达谱芯片(DNA microarray)技术可以将大量的探针同时固定于支持物上, 所以一次可以对大量的生物分子进行检测分析, 从而解决了传统核酸印记杂交(Southern blotting 和 Northern blotting 等)技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、低通量等不足. 该技术的出现使全面综合分析某些生命现象成为可能^[19-25]. HBV 基因组可以分为 4 个区, 其中 S 区编码病毒的包膜蛋白, 具有一个开放读码框(ORF), 通过 3 个起始密码子(ATG)可以分为 3 个编码区, 分别编码前 -S1, 前 -S2 和 S 蛋白. 通过不同的 ATG 起始密码子, 共合成 3 种包膜蛋白, 分别是大蛋白(LHBs, 前 S1+ 前 S2+S 蛋白), 中蛋白(MHBs, 前 -S2+S 蛋白), 小蛋白(SHBs, S 蛋白)^[26-30]. 其中 LHBs 和 MHBs[†] 具有反式调节作用, 主要依赖于指向胞质区的前 -S2 区(最小功能单位). MHBs[†] 是种变异的病毒表面抗原中蛋白, 缺失了位于 C- 末端的膜定位信号, 使 MHBs[†] 具备内质网(ER)定位功能, 未能进入分泌途径而在 ER 滞留, 其前 -S2 区指向胞质区, 从而有机会与胞质蛋白相互作用, 发挥其广泛的反式激活效应; 全长的乙肝病毒表面抗原中蛋白(MHBs)的前 -S2 区指向 ER 腔, 进入高尔基复合体而分泌. 所以说 MHBs[†] 的反式激活功能依赖于其 N- 末端前 -S2 区的胞质定位功能. 具有反式激活功能的截短位点是在一定的范围之内, 缺失突变的范围是决定该截短型分子是否具有反式激活作用的重要因素, MHBs[†] 至少完全缺失蛋白 C- 末端 S 区的疏水区, 才具有反式激活功能; S 区的 N- 末端疏水区 是反式激活所必需的, 因为蛋白与膜的结合是转录激活功能所必需的, 这段核苷酸序列被

称为“反式活性开启区”(trans-activity-on region, TAO). 进一步研究表明, MHBs^t的最小反式激活单元定位于4-53氨基酸残基(aa), MHBs^t53是其中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(1-55 aa)就足以介导反式效应^[31-32]. 前-S2结构域可以与蛋白激酶C(PKC) α/β 结合, 发生磷酸化反应触发了PKC依赖的c-Raf-1/MPKKK(丝裂激活蛋白激酶激酶激酶)信号转导系统, 从而激活转录因子, 如激活蛋白-1(AP-1)、细胞核因子- κ B(NF- κ B)、激活蛋白-2(AP-2)、血清应答因子(SRF)、Sp1和c-myc、c-fos启动子, 参与病毒感染后的炎症反应和肝细胞癌的发生^[33-38], 根据致癌两步模型: 起始/促进, 前-S2蛋白具有的肿瘤启动子样的功能: 具有关键性突变(起始)的细胞可以被阳性选择出来(促进), 这个过程也许可以用来解释HCC发展过程中潜伏期长的原因^[39-41].

为进一步研究前-S2蛋白的反式激活作用, 我们利用基因芯片技术对其上调、下调基因进行分析. 结果表明, 42种基因的表达水平显著上调, 36种基因的表达水平显著下调. 在上调基因中, 如凋亡相关的RNA结合蛋白(NAPOR-3)、胱冬肽酶9(caspase 9)、胱冬肽酶6(caspase 6)、凋亡蛋白1抑制子(MIHC)等均参与了细胞凋亡的控制机制, 影响正常细胞的生长状态, 从而为HBV在肝细胞中复制提供良好的环境. 蛋白激酶C(PKC)、丝氨酸-苏氨酸激酶(KDS)、酪蛋白激酶1, α 1(CSNK1A1)、人蛋白激酶2型 β 调节亚单位(cAMP-依赖)(PRKAR2B)等为体内蛋白磷酸/去磷酸化的重要调节剂, 是重要的信号转导通路MAPK级联中重要的组成部分, 此信号转导系统对大量的细胞内、外刺激的转导起着中枢性调节作用, 从而控制细胞的生长、增生、凋亡, 如进入细胞周期、控制核苷酸的生物合成、G2/M期的转变、M期高尔基体的裂解和纺锤体的形成等. 此系统是由多组具有丝/苏氨酸特异性的, 脯氨酸指导的蛋白激酶所组成, 可以被细胞外多种刺激所激活, 其主要功能为信息传递的中转站, 与细胞表面受体、特异性转录因子以及其他调控蛋白相互作用, 从而使细胞外信号来调节特异性基因的表达^[42-48]. 在下调基因中, 钙调素结合蛋白1(CALD1)、钙联接蛋白(CANX)、金属硫蛋白3(MT3)、金属蛋白酶1(MP1)、基质金属蛋白酶1(MMP1)等与体内金属代谢有关. 胰岛素受体(INSR)的下调可以导致机体对胰岛素的敏感性下降, 这也可能是HBV所致的肝源性糖尿病的发病机制之一. 慢性肝病患者约50-80%有糖耐量减退, 其中20-30%最终发展为糖尿病. 肝源性糖尿病的发生是胰岛素抵抗及分泌进行性损害的共同结果, 目前认为胰岛素抵抗的原因之一就是外周组织胰岛素受体数目减少及生理作用下降, 使这些组织对胰岛素生理作用的敏感性降低, 形成胰岛素抵抗. 临床上也有报告肝硬化糖耐量减退者, 肝细胞、脂肪细胞和肌肉细胞胰岛素受体数及亲和力降低, 使胰岛素外周效应减弱.

本实验从病毒学的角度证实了以上的观点.

在本实验中还有4个未知功能的新基因, 2个上调基因, 2个下调基因. 对于每一条基因片段的序列提交GenBank进行同源基因序列的搜索, 确认所得基因片段的独特性, 然后依据GenBank数据库EST中的同源基因片段进行电子拼接, 根据Kozak规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列, 分别命名为HBV PS2TP1(前-S2蛋白反式调节蛋白1), PS2TP2, PS2TP3, PS2TP4, GeneBank注册号分别为: AY561706, AY561707, AY561704, AY561705. 这些新基因的功能正在进一步研究中.

4 参考文献

- 1 Ma C, Sun W, Tian P, Wang X, Liu S, Zhang L, Cao Y, Zhu F, Zhang Q. Effect of preS2 antisense RNA on hepatocellular carcinoma with a novel delivery system. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:717-720
- 2 成军. 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果. *世界华人消化杂志* 2004;12:420-427
- 3 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较. *世界华人消化杂志* 2004;12:327-331
- 4 Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):S36-S42
- 5 Pawlowsky JM. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):S31-S55
- 6 Wang Y, Cui F, Lv Y, Li C, Xu X, Deng C, Wang D, Sun Y, Hu G, Lang Z, Huang C, Yang X. HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2004;39:318-324
- 7 纪冬, 成军, 刘妍, 王建军, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因6的克隆和鉴定. *世界华人消化杂志* 2003;11:1874-1877
- 8 陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 应用表达谱芯片技术对乙型肝炎病毒前-S2抗原结合蛋白S2-29反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:58-61
- 9 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩. 核转录因子Rel/NF- κ B与乙型肝炎病毒. *世界华人消化杂志* 2004;12:145-148
- 10 Soussan P, Pol S, Garreau F, Brechot C, Kremsdorf D. Vaccination of chronic hepatitis B virus carriers with preS2/S envelope protein is not associated with the emergence of envelope escape mutants. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 2):367-371
- 11 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对MAPKKK蛋白信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:1959-1962
- 12 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型和丙型肝炎病毒对MEKK1蛋白信号转导途径的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:162-165
- 13 张健, 成军. 乙型和丙型肝炎病毒对ERK信号转导途径的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:158-160
- 14 王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏. 乙型和丙型肝炎病毒对JNK/SAPK转导途径的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:155-158
- 15 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:1083-1090
- 16 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
- 17 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
- 18 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. *世界华人消化杂志* 2003;11:1073-1080
- 19 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:1-5
- 20 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463

- 21 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- 22 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:474-477
- 23 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 24 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:943-946
- 25 Bangur CS, Switzer A, Fan L, Marton MJ, Meyer MR, Wang T. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* 2002;21:3814-3825
- 26 Borchani-Chabchoub I, Mokdad-Gargouri R, Gargouri A. Glucose dependent [correction of dependant] negative translational control of the heterologous expression of the preS2 HBV antigen in yeast. *Gene* 2003;311:165-170
- 27 Qin S, Tang H, Zhao LS, He F, Lin Y, Liu L, He XM. Cloning of HBsAg-encoded genes in different vectors and their expression in eukaryotic cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1111-1113
- 28 Park JH, Lee MK, Kim HS, Kim KL, Cho EW. Targeted destruction of the polymerized human serum albumin binding site within the preS2 region of the HBV surface antigen while retaining full immunogenicity for this epitope. *J Viral Hepat* 2003;10:70-79
- 29 Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. *Virology* 2002;292:44-58
- 30 Zhang SL, Yue YF, Bai GQ, Shi L, Jiang H. Mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2004;10:437-438
- 31 Hu YP, Yao YC, Li JX, Wang XM, Li H, Wang ZH, Lei ZH. The cloning of 3, truncated preS/S gene from HBV genomic DNA and its expression in transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2000;6:734-737
- 32 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
- 33 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 34 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 35 Cho EW, Park JH, Yoo OJ, Kim KL. Translocation and accumulation of exogenous hepatitis B virus preS surface proteins in the cell nucleus. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 6):1115-1123
- 36 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1245-1247
- 37 Robek MD, Boyd BS, Wieland SF, Chisari FV. Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1743-1747
- 38 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1102-1106
- 39 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 40 Henkler FF, Koshy R. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J Viral Hepat* 1996;3:109-121
- 41 Stockl L, Berting A, Malkowski B, Foerste R, Hofschneider PH, Hildt E. Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression. *Oncogene* 2003;22:2604-2610
- 42 Nishihama R, Ishikawa M, Araki S, Soyano T, Asada T, Machida Y. The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev* 2001;15:352-363
- 43 Takeda K, Matsuzawa A, Nishitoh H, Ichijo H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct* 2003;28:23-29
- 44 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:469-471
- 45 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
- 46 Rabe C, Cheng B, Caselmann WH. Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated liver cancer. *Dig Dis* 2001;19:279-287
- 47 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
- 48 Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37:50-54

应用抑制性消减杂交技术筛选 HBV DNA 聚合酶中 RNase H 的反式调节基因

王春花, 郎振为, 成军, 吴煜, 杨艳杰, 张黎颖, 党晓燕

王春花, 郎振为, 首都医科大学北京佑安医院病理科 北京市 100054
成军, 吴煜, 杨艳杰, 张黎颖, 党晓燕, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

王春花, 女, 1974-05-14 生, 山东省荣成市人, 汉族. 2001 年首都医科大学博士生, 主要从事肝脏疾病的基础研究及临床工作.

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

军队九五科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队十五科技攻关项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

Suppression subtractive hybridization for cloning of genes transactivated by RNase H protein of HBV DNA polymerase

Chun-Hua Wang, Zhen-Wei Lang, Jun Cheng, Yu Wu, Yan-Jie Yang, Li-Ying Zhang, Xiao-Yan Dang

Chun-Hua Wang, Zhen-Wei Lang, Institute of Pathology, You'an Hospital, Capital University of Medicine, Beijing 100054, China
Jun Cheng, Yu Wu, Yan-Jie Yang, Li-Ying Zhang, Xiao-Yan Dang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

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

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

Received: 2004-02-14 Accepted: 2004-05-11

Abstract

AIM: To construct a subtractive cDNA library of genes transactivated by RNase H protein of hepatitis B virus (HBV) DNA polymerase with suppression subtractive hybridization (SSH) technique.

METHODS: The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-RNase H and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and then cDNA was synthesized. After restriction enzyme RsaI digestion, small sizes cDNAs were obtained. Tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent two times of nested PCR and then was subcloned into T/A plasmid vectors to set up a subtractive library. Amplification of the library was carried out with E. coli strain JM109. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

RESULTS: The amplified library contained 38 positive clones. Colony PCR showed that 36 clones contained 200-1 000 bp inserts. Sequence analysis suggested that 33 kinds of known and three kinds of novel cDNA sequences were the target genes transactivated by RNase H protein of HBV DNA P.

CONCLUSION: The subtractive library of genes transactivated by RNase H protein is successfully constructed.

Wang CH, Lang ZW, Cheng J, Wu Y, Yang YJ, Zhang LY, Dang XY. Suppression subtractive hybridization for cloning of genes transactivated by RNase H protein of HBV DNA polymerase. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(7):1564-1568

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术构建HBV DNA聚合酶(DNA P)末端蛋白反式激活基因.

方法: 以 RNase H 表达质粒 pcDNA3.1(-)-RNase H 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-) 为对照; 制备转染后的细胞裂解液, 提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 RsaI 酶切后, 将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性 PCR, 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析.

结果: 文库扩增后得到 38 个白色克隆, 经菌落 PCR 分析, 得到 36 个 200-1 000 bp 插入片段. 对所得片段测序, 并进行同源性分析, 显示 33 种已知基因编码蛋白和 3 种未知功能基因序列, 可能是 RNase H 反式激活靶基因.

结论: 成功构建 HBV RNase H 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库.

王春花, 郎振为, 成军, 吴煜, 杨艳杰, 张黎颖, 党晓燕. 应用抑制性消减杂交技术筛选 HBV DNA 聚合酶中 RNase H 的反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1564-1568

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1564.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝 DNA 病毒的一种, HBV DNA 的长度为 3.2 kb, 具有 4 个开放读码框架(ORF), 分别编码 HBV 的表面抗原蛋白, 核心/e 抗原蛋白、X 蛋白以及 HBV DNA 聚合酶(HBV DNA P)^[1]. 目前, HBV 与肝细胞之间相互作用的分子生物学机制尚不完全清

楚, 其中, 病毒编码的蛋白通过各种级联反应能够影响多种细胞信号转导途径, 从而进一步影响肝细胞某些基因的表达、调控, 可能是病毒感染导致肝细胞损伤和肝细胞癌发生、发展的重要原因^[2-3]. HBV DNA P基因在ORF中最长, 并且与C, S, X基因区有重叠, 其编码的P蛋白含有3个功能域和1个无意义的隔离片(SP), 排列顺序为N-末端蛋白, 隔离片, RT/DNA聚合酶和核糖核酸酶. N-末端蛋白和隔离片对嗜肝病毒聚合酶是独特的, 逆转录酶(RT)和核糖核酸酶(RNase H)包含两个已知的酶活性位点, 与其他相关的逆转录病毒和逆转录因子的聚合酶是一致的^[4-15]. Kim et al^[16]对人HBV聚合酶的N-末端或C-末端和结构域同时删除形成变异株, 并将变异株和野毒株一起在大肠杆菌中表达, 经直链淀粉柱层析法纯化后, 二者纯化蛋白的DNA依赖性的DNA聚合酶活性进行比较, 证明N-末端蛋白或隔离片删除分别可以使酶活性减少到70%, 而RNase H删除对聚合酶活性的影响要大于前二者. Walton et al^[17]认为RNase H在HBV复制过程中的作用表现为能识别并有效裂开DNA-RNA杂交的RNA链, 但是缺乏序列选择性. 既往的研究多集中于RNase H参与病毒复制的作用机制, 而RNase H蛋白在肝细胞中的表达对于肝细胞的基因表达谱的影响研究较少, 而这种反式激活作用也是病毒性肝炎、肝细胞癌(HCC)发病机制的主要机制

抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)是1990年代后期建立的一种基因克隆的新技术, 可以快速有效地检测到差异表达的基因^[18]. 本实验应用SSH技术, 构建RNase H作用于肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞后反式调节的cDNA消减文库, 筛选差异表达的基因片段, 并应用生物信息学(bioinformatics)技术对所得片段进行序列同源性分析, 获得其全长基因序列. RNase H反式激活相关靶基因的克隆, 为研究HBV的致病(癌)机制提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞及大肠杆菌JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), Lipofectamine Plus转染试剂(Gibco), mRNA Purification试剂盒(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). RNase H真核表达质粒pcDNA3.1(-)-RNase H由本室构建. DNA序列测定由上海博亚公司完成.

1.2 方法 用Lipofectamine Plus转染试剂将2 μg pcDNA3.1(-)-RNase H及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞, 48 h后收获细胞. 使用mRNA Purification试剂盒, 直接提取转染了重组表达质粒及空载体的

HepG2细胞mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性、定量分析. 采用PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规SSH方法按说明书进行: 以转染了重组表达质粒及空载体的HepG2细胞mRNA为模板逆转录合成双链cDNA(dscDNA), 并分别标记为Tester和Driver, dscDNA经RsaI(一种识别4碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将Tester的cDNA分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头Adapter 1和Adapter 2, 然后与过量的Driver cDNA进行杂交; 合并两种杂交产物后再与Driver cDNA作第2次杂交; 然后将杂交产物做选择性PCR扩增, 使Tester cDNA中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.1 消减文库扩增及克隆分析 扩增产物与pGEM-Teasy载体连接, 转化JM109感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37 °C培养18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以pGEM-Teasy载体多克隆位点两端T7/SP6引物进行菌落PCR扩增, 证明含有插入片段后(200-800 bp), 测序. 应用生物信息学将测得序列与GenBank数据库进行同源性分析, 通过序列同源性搜索比对和电子拼接, 根据基因起始密码子的Kozak规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列.

2 结果

2.1 mRNA的定性和定量分析 使用高质量的mRNA是保证cDNA高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的HepG2细胞mRNA分别为5.12 μg和4.92 μg, A260/A280=1.25. 1.0%琼脂糖凝胶电泳见mRNA为大于0.5 kb清晰慧尾片状条带.

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

2.3 cDNA消减文库消减效率的鉴定 分别以消减及未消减PCR产物为模板, 用G3PDH引物进行PCR扩增, 分别在18, 23, 28, 33次循环结束时从体系中吸取5 μL进行电泳鉴定. 结果显示, 与未消减组PCR产物相比, 消减组PCR产物中G3PDH基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图1).

2.4 差异表达cDNA片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮PCR扩增后, 菌落PCR扩增结果显示为200-1 000 bp大小不等的插入片段, 所获得的38个克隆中几乎均含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图2).

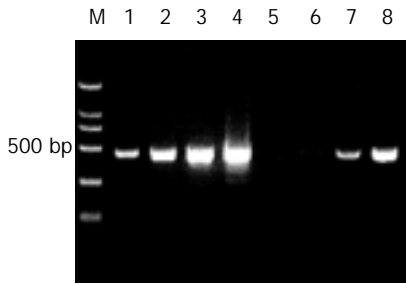


图1 消减效率分析结果. 1-4: 未消减组, 引物为 G3PDH3 '、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组, 引物为 G3PDH3 '、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33.

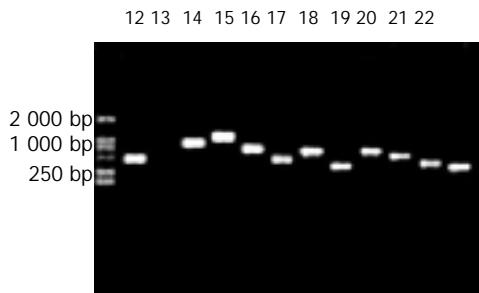


图2 部分克隆(RNase H12-22)菌落 PCR 鉴定电泳图.

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
热休克蛋白 Hsp 90	1	99
CD164	1	98
HMGB2 (high-mobility group box 2)	1	100
硫氧还蛋白	1	99
微小组织相容性抗原 H13	1	98
glypican 3	1	98
NADH 脱氢酶	6	99
Nephroptin 前体	1	96
NB4 凋亡分化相关抗原	1	100
RTN4 异构体 G(RTN4)	1	99
DEAD 盒(Asp-Glu-Ala-Asp)多肽 5	1	98
凝血因子 XI	1	98
阿朴脂蛋白 M	2	99
BCL2/ 腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3	1	100
Ras 相关 C3 肉毒毒素作用物 1	1	99
纤维粘连蛋白	1	98
电子转移黄素蛋白 α	1	100
原肌球蛋白 4	1	97
真核翻译延伸因子	1	99
HIV-1 Rev 结合蛋白	1	98
甲胎蛋白	2	99
ERH(enhancer of rudimentary homolog)	1	98
N- 乙酰氨基转移酶 -6 作用底物	1	99
peroxiredoxin 3	1	98
TATA 盒结合蛋白相关因子(TAF13)	1	99
Crk 作用物相关蛋白 CAS-L	1	98

2.5 cDNA 测序与同源性分析 挑选 36 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 应用生物信息学技术分析发现, 其中 3 个克隆与未知功能基因序列高度同源, 并在 GenBank 数据库注册, GenBank 号为 AY450390, AY450394 AY450392. 另一个克隆未检索到任何对应的相似序列, 未知基因结构及功能分析正在进行中. 其余 33 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(96 - 100%), 详细结果(见表 1).

3 讨论

HBV DNA P 存在于 Dane 颗粒核心内, 是一种依赖于 DNA 的 DNA P, 其功能与修补及延伸双链 DNA 的短链有关. 患者血清中 HBV DNA P 活性增高常伴有 HBV 增生. 在急性乙肝的潜伏期内, 血清 ALT 升高之前, 血清 DNA P 活力即已升高. 急性肝炎患者在发病 1 mo 后若 HBV 活力仍持续升高, 是肝炎转为慢性的征兆. 病毒复制离不开 HBV DNA P, 而 HBV 的持续性感染是慢性肝炎、肝硬化和 HCC 的首要原因. 既往的研究多集中于 HBV DNA P 在病毒生活周期中的作用机制, 但随着对 HBV 致病机制研究的深入, 发现许多病毒基因组的反式激活蛋白, 以其表达产物的间接方式参与另外一些基因的功能调节. 可以对基因组内部的基因片段, 甚至可以对另外细胞或病毒的基因组有调控作用. 例如, HBxAg 蛋白就是一种具有广泛活性的转录激活因子, 能够反式激活同源/异源的病毒/细胞转录调节序列, 对乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的转化有密切关系^[19-24]. 那么, 肝细胞内表达的 RNase H 蛋白, 是否也能激活某些特定基因的表达? 这些表达产物对细胞的损害、增生分化的作用如何? 基于上述研究目的, 我们采用抑制性消减杂交方法, 克隆 HBVDNA 聚合酶的 RNase H 基因片段转染细胞, 反式激活差异表达的基因, 构建其 cDNA 消减文库, 为今后进一步分析、研究病毒蛋白的致病机制奠定基础.

SSH 方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果. 为研究 RNase H 蛋白的反式激活作用及其作用机制提供了新的研究方向和思路. 实验将真核表达载体 pcDNA3.1(-)- RNase H, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以 2 种转染的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 RNase H 反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 随机挑选 36 个克隆测序并与 GenBank 数据库进行同源性比较分析, 结果主要包括 2 种类型, 第一种是已知基因的序列, 与 GenBank 中数据高度同源, 其中包括一些已知的看家基因序列和一些与细胞生长调节密切相关的基因序列; 甲胎蛋白、硫氧还蛋白、过氧化氧化还原蛋白(peroxiredoxin) 3、糖苷

蛋白(glypican)3等可能与肝细胞恶性转化密切相关; 纤维粘连蛋白、原肌球蛋白4等细胞基质蛋白提示RNase H可能参与肝纤维化的发生发展过程; CD164、NB4凋亡分化相关抗原、BCL2/腺病毒E1B相互作用蛋白3、Ras相关C3肉毒毒素作用物1、电子转移黄素蛋白 α 、N-乙酰氨基转移酶-6作用底物、Crk作用物相关蛋白CAS-L等与细胞周期生长调节及信号转导途径密切相关; 阿朴脂蛋白M可能参与了肝脏脂肪变性的发病机制; 凝血因子XI的表达上调也可能参与了RNase H致病机制; 真核翻译延伸因子、NADH脱氢酶、TATA盒结合蛋白相关因子、ERH等与细胞的转录、翻译功能密切相关, 其中ERH是一种转录抑制因子, Pogge et al^[25]报道将其融合表达于GAL4转录因子的DNA结合结构域时, ERH能抑制HeLa细胞中GAL4反应性报告基因的活性. 第二种是未知基因序列, 获得3个差异表达的未知序列. 对未知序列, 我们采用生物信息学方法获得了其全长基因序列, 已被GenBank收录.

在实验中我们观测到分子伴侣家族的表达上调. 分子伴侣^[26-28]为一类与其他蛋白不稳定构象相结合并使之稳定的蛋白, 他们通过控制结合和释放来帮助被结合多肽在体内的折叠、组装、转运或降解等. 哺乳类胞质中的热休克蛋白Hsp90属于分子伴侣家族, Hsp90主要与细胞中不稳定的非活化蛋白结合, 促进其迅速活化或阻止其降解. 他可以与胞质中的类固醇激素受体结合, 封闭受体的DNA结合域, 阻碍其对基因转录调控区的激活作用, 使之保持在天然的非活性状态, 但也使受体保持着对激素配体的高亲和力. Hsp90还与Ras信号途径中许多信号分子的折叠与组装密切相关, 主要通过Hsp90的结合与解离, 介导了这些分子在非活性形式与活性形式间的转化. 如转化型酪氨酸激酶pp60v-src或在一定条件下从与Hsp90等形成的复合物中释放, 才能转位至胞膜行使激酶的活性功能. Hu et al^[29]研究表明HBV DNA P与宿主因子如Hsp90复合物相互作用, 这对病毒基因组的复制及病毒粒子的装配是关键的一步. 他们用纯化的反转录酶和宿主因子在体外重建了RNP及蛋白质引物, 结果显示Hsp90能识别RT上对RNP及蛋白质引物必须的两个区域, Hsp90的功能对于建立及保持RT的RNA结合功能是必需的, 但Hsp90对RT的合成及翻译后活化不是必要的. 由此推测, Hsp90作为一个内部桥梁辅助RT的两个区域形成稳定而平衡的RNP结合形式. Cho et al^[30]通过共感染及免疫共沉淀实验证实, Hsp90 N末端(aa 1-302)能与HBV Pol的末端蛋白(TP)及反转录区结合, 而C-末端(aa 483-723)只与反转录区结合, 中间(aa 327-438)一段与Hsp90没有相互作用. 我们发现RNase H的反式激活作用可引起Hsp90的表达上调, 结合Hu的实验结果提示RNase H反式激活Hsp90使其表达上调, 级联反应辅助DNA P发挥生物学作用, 此作用机制参与了

HBV DNA的复制过程.

在筛选结果中我们也注意到多种与肝脏肿瘤发生有关的癌胚抗原, 除了众所周知的甲胎蛋白, 硫氧还蛋白、过氧化氧化还原蛋白3、糖苷蛋白3也是近年来研究的热点. 硫氧还蛋白, 过氧化氧化还原蛋白3特异性定位于线粒体, 作为抵御呼吸作用产生的H₂O₂的第一道防线, 在调节细胞内氧化还原状态方面具有重要作用; 而细胞内氧化还原状态的改变是参与细胞生长和死亡过程的一种关键因子, 并可导致肿瘤的发生. Choi et al^[31]用免疫组织化学方法研究了58例石蜡包埋组织中硫氧还蛋白、过氧化氧化还原蛋白3的表达情况, 结果发现二者在肝癌组织中的表达水平明显高于邻近的正常肝组织, 作者认为由于增强了硫氧还蛋白, 过氧化氧化还原蛋白3的表达而改变了细胞内氧化还原状态, 这可能与肝细胞肿瘤的形成与发展有关. Nonn et al^[32]的研究认为过氧化氧化还原蛋白3的表达增强还能保护肿瘤细胞逃避由于低氧和药物而诱导的H₂O₂依赖的细胞凋亡. 糖苷蛋白3是一种存在于细胞表面的硫酸肝素类蛋白多糖(HSPGs), HSPGs可作为一种共受体与生长因子相互作用并调节其活性, Midorikawa et al^[33]报道过量表达的GPC是通过抑制纤维细胞生长因子2与骨形态发生相关蛋白7的活性而调节细胞增生, 作者认为通过对生长因子的调节可能有助于揭示GPC在肝脏肿瘤发生机制中的作用. Nakatsura et al^[34], Sung et al^[35]相继报道发现在肝肿瘤发生时, GPC尤其过量表达, 甚至许多学者^[34-36]提议将其作为一种新型的肝细胞癌的血清学和组织化学的标志物, 对GPC与AFP的同时检测可能明显提高肝细胞癌的诊断敏感性. 这部分筛选结果提示RNase H的反式激活作用可能与肝细胞恶性转化密切相关, 为研究肝细胞癌的发病机制提供了理论依据.

已知不论在急性和慢性HBV感染, HBV DNA都能够整合到肝细胞染色体DNA中, HBV整合到细胞DNA中, 能使细胞DNA发生缺失、插入、转位、突变或易位等改变. 我们筛选到的HMGB2(high-mobility group box 2)的表达上调似与此过程有关; Ueda et al^[37]曾报道HMGB2参与了非同源错误的重组, 其研究结果揭示了HMGB2的一种新的功能, 即能促进质粒DNA稳定整合到宿主基因组中, 作者认为这种作用对于自然条件下DNA整合到活细胞中非常重要. HMGB2的筛选发现对于研究HBV DNA的整合机制提供了新的突破口.

由于SSH不以研究对象的已知基因序列为前提, 所以为反式激活靶基因的研究提供了全新的探索方向, 对基因克隆的研究也具有重要的启迪作用. 当然, 应用这种方法只能对反式激活的靶基因进行初步分析, 实验中获得的新基因序列是否是真正的RNase H反式激活靶基因, 尚需进一步的研究; 如果得到证实, 那么本实验结果对于阐明HBVDNA聚合酶RNase H蛋白反式激活作用与HBV感染的慢性化及致肝细胞癌的发生之间的关系具有重要的理论意义.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学, 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-103
- 2 Rossner MT. Hepatitis B virus x-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J Med Virol* 1992;36:101-117
- 3 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998:17-28
- 4 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 5 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 6 Jasper ZP, Robert EL, Rolf IC, Lena N. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73:4188-4196
- 7 Wang XT, Hu JM. Distinct requirement for two stages of protein-primed initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 8 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
- 9 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
- 10 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 11 刘妍, 董菁, 黄甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002;27:125-127
- 12 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
- 13 董菁, 成军, 黄甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒个体准种表现的初步研究. *解放军医学杂志* 2002;27:119-121
- 14 董菁, 刘妍, 黄甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 慢性乙病毒感染患者乙型肝炎病毒表面抗原基本结构多态性研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;11:130-135
- 15 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 16 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:301-308
- 17 Walton CM, Wu CH, Wu GY. A ribonuclease H-oligo DNA conjugate that specifically cleaves hepatitis B viral messenger RNA. *Bioconjug Chem* 2001;12:770-775
- 18 Luda D, Yun-Fai CL, Aaron PC. 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 Spandau DF, Lee CH. Transactivation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988;62:427-434
- 20 Aufiero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X-gene product transactivates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990;9:497-504
- 21 Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2046-2052
- 22 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
- 23 Faktor O, Budlovsky S, Ben-Levy R. A single element within the hepatitis B virus enhancer binds multiple protein and respond to multiple stimuli. *J Virol* 1990;64:1861-1863
- 24 Wang HD, Trixedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7086-7094
- 25 Pogge von Strandmann E, Senkel S, Ryffel GU. ERH (enhancer of rudimentary homologue), a conserved factor identical between frog and human, is a transcriptional repressor. *Biol Chem* 2001;382:1379-1385
- 26 Braig K. Chaperonins. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8:159-165
- 27 Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381:571-579
- 28 Burston SG, Clarke AR. Molecular chaperones: physical and mechanistic properties. *Essays Biochem* 1995;29:125-136
- 29 Hu J, Toft DO, Seeger C. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J* 1997;16:59-68
- 30 Cho G, Suh SW, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of Hsp90beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:203-211
- 31 Choi JH, Kim TN, Kim S, Baek SH, Kim JH, Lee SR, Kim JR. Overexpression of mitochondrial thioredoxin reductase and peroxiredoxin III in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 2002;22:3331-3335
- 32 Nonn L, Berggren M, Powis G. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogenperoxide-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res* 2003;1:682-689
- 33 Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer* 2003;103:455-465
- 34 Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16-25
- 35 Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, Kim JC, Kim M. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003;94:259-262
- 36 Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:89-97
- 37 Ueda T, Shirakawa H, Yoshida M. Involvement of HMGB1 and HMGB2 proteins in exogenous DNA integration reaction into the genome of HeLa S3 cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1593:77-84

HBV 前 -S1 蛋白结合蛋白大鼠同源基因的克隆化

成军, 董菁, 张健, 王建军, 纪冬, 刘妍, 钟彦伟, 王琳

成军, 董菁, 张健, 王建军, 纪冬, 刘妍, 钟彦伟, 王琳, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 北京市 100039
成军, 男, 1963-08-17 生, 山东省淄博市人, 汉族. 1994 年北京医科大学传染病学博士, 1994 年美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学博士. 教授, 主任医师, 博士生导师, 出版专著 5 部, 发表论文 400 篇. 中华医学学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员.
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288
军队九五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十五科技攻关项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

Identification and analysis of rat homologous gene to human HBV pre-S1 protein-binding protein

Jun Cheng, Jing Dong, Jian Zhang, Jian-Jun Wang, Dong Ji, Yan Liu, Yan-Wei Zhong, Lin Wang

Jun Cheng, Jing Dong, Jian Zhang, Jian-Jun Wang, Dong Ji, Yan Liu, Yan-Wei Zhong, Lin Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288 and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of Chinese PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2004-02-14 Accepted: 2004-05-11

Abstract

AIM: To identify and analyze rat homologous gene to human hepatitis B virus (HBV) pre-S1-binding protein (PS1BP) coding gene.

METHODS: The human PS1BP was screened and identified from a hepatocyte expressive cDNA library by phage display technique with purified recombinant pre-S1 protein of HBV as the solidified matrix. The nucleotide sequence database GenBank, established by National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (NLM), National Institute of Health (NIH), was searched for rat cDNA sequence homologous to human PS1BP cDNA by BLASTn tools online. A homologous cDNA sequence was identified as the rat PS1BP cDNA. The similarity and identity of rat PS1BP cDNA and amino acid (aa) sequences to human and mouse PS1BP genes were compared. The potential functional domains were predicted by online analysis tools.

RESULTS: The human PS1BP cDNA was identified by phage display technique. The rat PS1BP cDNA was identified by

bioinformatics methods. The rat PS1BP cDNA consisted of 1 455 nt, and encoded a protein of 484 aa. The identity of rat PS1BP protein to human and mouse PS1BP proteins was 80.79% (391/484) and 92.98% (450/484), respectively. In the rat PS1BP protein sequence, several potential modification domains were identified.

CONCLUSION: Rat PS1BP cDNA and protein primary sequences are identified and analyzed.

Cheng J, Dong J, Zhang J, Wang JJ, Ji D, Liu Y, Zhong YW, Wang L. Identification and analysis of rat homologous gene to human HBV pre-S1 protein-binding protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1569-1573

摘要

目的: 利用生物信息学(bioinformatics)技术克隆, 鉴定人 HBsAg 前 -S1 蛋白结合蛋白(PS1BP)编码基因的同源基因。

方法: 人 PS1BP 由表达型 cDNA 文库的噬菌体展示技术筛选获得. 以人的 PS1BP 的 cDNA 序列作为参照, 对于美国国立卫生研究院(NIH)国立医学图书馆(NLM)生物工程信息学研究中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库 GenBank, 利用同源基因序列比对的在线分析软件 BLASTn 进行同源基因序列的比对, 发现新的来源于大鼠的同源基因. 确定大鼠 PS1BP 的 cDNA 序列之后, 对于大鼠 PS1BP 蛋白质一级结构序列与人和小鼠的 PS1BP 蛋白质一级结构序列的同源性进行分析. 利用在线分析软件, 对于大鼠 PS1BP 一级结构序列中潜在的修饰和功能位点进行初步的预测分析。

结果: 利用噬菌体展示技术获得了人的 PS1BP 的 cDNA 序列. 以生物信息学技术确定了大鼠 PS1BP 的 cDNA 及其编码产物的序列. 大鼠 PS1BP 的 cDNA 由 1 455 nt 组成, 编码产物由 484 aa 组成. 大鼠 PS1BP 蛋白质一级结构与人和小鼠 PS1BP 蛋白质一级结构的同源性分别为 80.79%(391/484)和 92.98%(450/484). 利用在线分析软件, 在大鼠 PS1BP 蛋白质一级结构中还发现了一系列潜在的蛋白质修饰结构位点。

结论: 大鼠 PS1BP 基因及其编码产物序列被确定。

成军, 董菁, 张健, 王建军, 纪冬, 刘妍, 钟彦伟, 王琳. HBV 前 -S1 蛋白结合蛋白大鼠同源基因的克隆化. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1569-1573
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1569.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的包膜蛋白由表面抗原(HBsAg)基因编码, 因为 HBsAg 编码基因存在着 2 段启动子调节序列, 而且在基因序列中存在 3 个串连的框架内(in

frame)翻译起始密码子,因此,HBsAg基因可以从不同的起始密码子开始翻译,在同一个终止密码子处终止翻译过程,构成不同长度的HBsAg^[1-3].从第1个起始密码子开始翻译的蛋白是HBsAg的大蛋白,从中间的起始密码子开始翻译的蛋白是HBsAg的中蛋白,从最下游的起始密码子开始翻译的蛋白是HBsAg的主蛋白.上游和中间起始密码子之间的序列成为前-S1(pre-S1)区,一般由108个氨基酸残基(aa)组成.关于HBsAg的前-S1区的具体功能,虽然进行了较长时间的研究,但是还有许多方面不清楚.我们利用cDNA文库的噬菌体展示技术,筛选到了一种新的前-S1结合蛋白(pre-S1-binding protein, PS1BP)^[4],再利用生物信息学技术克隆,鉴定了大鼠的PS1BP基因,并进行初步分析.

1 材料和方法

利用表达型cDNA文库的噬菌体展示技术的筛选,获得了人PS1BP的编码基因序列^[4-5].以人的PS1BP的cDNA序列作为参照,对于美国国立卫生研究院(NIH)国立医学图书馆(NLM)生物工程信息学研究中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库GenBank,利用同源基因序列比对的在线分析软件BLASTn进行同源基因序列的比对,发现新的来源于大鼠的同源基因.确定大鼠PS1BP的cDNA序列之后,对于大鼠PS1BP蛋白质一级结构序列与人和小鼠的PS1BP蛋白质一级结构序列的同源性进行分析.利用在线分析软件,对于大鼠PS1BP一级结构序列中潜在的修饰和功能位点进行初步的预测分析.

2 结果

利用噬菌体展示技术从cDNA文库中筛选得到的人PS1BP基因由1437nt组成,编码产物由478aa组成^[4].利用生物信息学技术克隆,鉴定的大鼠PS1BP的基因由1455nt组成,编码产物由484aa组成(图1).大鼠PS1BP基因序列被美国核苷酸序列数据库GenBank收录,收录号为AY535002.大鼠与人的同源性为80.79%(391/484),大鼠和小鼠的同源性为92.98%(450/484)(图2).

```

ATGGCTGCGGGTAGTAACAGAGGCGGTGATAAGCGCGGCTCGAAA
M A A G S N R G G D K R G S K
AGCCAGGCGGACTCTAACTTTCTGGGGCTGCGGCCACCTCGGTG
S Q A D S N F L G L R P T S V
GATCCCGCTCTGAGGCGGCGGCGGGGCCAGAAACAAGAAG
D P A L R R R R R G P R N K K
CGCGGCTGAGGAGGCTCGCTGAGGAGCCGCTGGGGCTAGAGGTA
R G W R R L A E E P L G L E V
GACCAGTTCCTGGAAGATGTACGGTACAAGAGCGCACGACCGGT
D Q F L E D V R L Q E R T T G
GGCTTGTGGCAGAGGCCCAATGAACAGCTCTTCTTCGTGGAC
G L L A E A P N E Q L F F V D
ACTGGACTCAAGAAAAAGAACCACGCAAGAAGAGGACCTGGGTC
T G L K K K E P R K K R T W V

```

```

CAGAAGAAGTCAAAGCATCTCCAGAAACCCTACGGGTGACCTT
Q K K S K H L Q K P L R V D L
GCCCTTGAGAATCATTCTAAGATCCCTGCTCCCAAAGACATCCTT
A L E N H S K I P A P K D I L
GCACACCAGGTCCCAATGCCAAAAAGCTCAGGCGAAAGGAGGAG
A H Q V P N A K K L R R K E E
CTATGGGAGAACTGGCAAAGCAGGGAGAGCTGCCAGGGATGTG
L W E K L A K Q G E L P R D V
CGCAAGGCACAGGCCCGGCTTCTTAACCTCTGCACCAAAGGCC
R K A Q A R L L N P P A P K A
AAACCTGGGCCAGGATATCATTGAGCGGCCCTTCTATGACCTC
K P G P Q D I I E R P F Y D L
TGGAACCCAAACAATCCTCTGGATAAGCCTTTGATCGGTCAGGAT
W N P N N P L D K P L I G Q D
GCATTTTTTCTGGAGCAGACCAAGAAGAAAGGTGTGAGGCGGCCA
A F F L E Q T K K K G V R R P
CCACGACTCCACATCAAGCCTTCCAGGTGCTGCGGTGGAAGTG
P R L H I K P S Q V P A V E V
ATTCTGCGGGAGCCTCTACAACCCAACCTTTGAAGATCACCAG
I P A G A S Y N P T F E D H Q
GCCTTGCTTCTAGAGGCCATGAGGTGGAGCTGCAGCGTGAGAAA
A L L L E A H E V E L Q R E K
GAGGCAGAAAAGCTGGAGCGACAGCTGGCCCTGCCACTGCAGAG
E A E K L E R Q L A L P T A E
CAAGCTGCTACCCAGGAGTCCGTGTTTCGGGAGATGTGTGAGGGC
Q A A T Q E S V F R E M C E G
CTGCTCGAAGAGTCTGAGGATGAGGATGGGCCAGGCTGTGCTGAG
L L E E S E D E D G P G C A E
CAGCCAGAGGCTGACGATGGGGCCACTGAGACCTCACCCACTGGT
Q P E A D D G A T E T S P T G
GCTGCTGGTCTGAGAAGAGGATGGAGAAGAAGACAGAGCAGCAG
A A G P E K R M E K K T E Q Q
CGGCGCGGGGAGAAGGCTGCTCGCAAGCTGCGGGTGCAGCAGGCT
R R R E K A A R K L R V Q Q A
GCACTGAGGGCAGCCCGGCTTCAGCACCAAGAAGCTTTCAGGCTA
A L R A A R L Q H Q E L F R L
CGTGGGATCAAGGCCAGGTGGCCCGAGGCTGGCAGAGCTGGCA
R G I K A Q V A R R L A E L A
CGCCGAAGGAGCAGCGGCGCATACGCGACTGGCAGAGGCTGAC
R R K E Q R R I R R L A E A D
AAACCCGAAGGCTGGGACGGCTCAAGTACCAGGCCCTGACATT
K P R R L G R L K Y Q A P D I
GATGTGCAGCTCAGCTCTGAGCTATCTGACTCACTCAGGAAACTG
D V Q L S S E L S D S L R K L
AAGCCAGAAGGTAACATTCTCCGAGACAGGTTCAAAGCTTCCAG
K P E G N I L R D R F K S F Q
AAGAGAAATATGATTGAGCCCCGGAACGAGCCAAGTTCAAGCGC
K R N M I E P R E R A K F K R
AAATACAAAGTGAAGCTGGTGGAGAAGCGGGCTTTCGCGAGATT
K Y K V K L V E K R A F R E I
CAGTTGTAG
Q L *

```

图1 乙型肝炎病毒前-S1蛋白结合蛋白大鼠同源基因及其编码产物序列.

人 MAAGSGVGGKRSSKSDADSGFLGLRPTSVDPALR
 小鼠 -----NRD-E-----R-Q-----
 大鼠 ----SNRG-D----K-Q---N-----

人 RRRRGPRNKKRGWRRLAQEPLGLEVDQFLEDVRLQ
 小鼠 -----E-----
 大鼠 -----E-----

人 ERTSGLLSEAPNEKLFFVDTGSKEKGLTKKRTKV
 小鼠 ---T---A-----F-R-E-----
 大鼠 ---T---A-----Q-----L-K-EPR---W-

人 QKKLLLLKKPLRVLDILENTSKVPAPKDVLAHQVP
 小鼠 ----QR-Q-----A---H---I-----I-----
 大鼠 ----KH-Q-----A---H---I-----I-----

人 NAKKLRRKEQLWEKLAKQGELPREVRRARALLNP
 小鼠 -----E-----D-----S-
 大鼠 N-----E-----D-----N-

人 SATRAKPGPQDIVERPFYDLWASDNPLDRPLVGQD
 小鼠 PTPK-----II-----NP-----T-----
 大鼠 PPK-----II-----NPN-----K-----

人 EFFLEQTKKKGVKRPARLHTKPSQAPAVEVAPAGA
 小鼠 A-----G-R---Q-----V-----I-----
 大鼠 A-----R---P-----V-----I-----

人 SYNPSFEDHQTLSSAAHEVELQRQKEAEKLERQLA
 小鼠 ----T-----A-RE-----E-----
 大鼠 ----T-----A-LE-----E-----

人 LPATEQAATQESTFQELCEGLLEESDGEPEGQGE
 小鼠 -TS-----V-R-M-----HEA--
 大鼠 --TA-----V-R-M-----xx-D-D-P-C

人 GXXPEAGDAEVCPTPARLATTXXXKTEQQRRR
 小鼠 AGQ-----GTTEIS-TGA-GPEKRM-----
 大鼠 -EQ---D-GATETS-TGA-GPEKRM-----

人 EKAVHRLRVQQAALRAARLRHQELFRLRGIKAQVA
 小鼠 ---ARK-----Q-----
 大鼠 ---ARK-----Q-----

人 LRLAELARRRRRQARREAEADKPRRLGRLKYQAP
 小鼠 R-----EQ-RI---L-----
 大鼠 R-----KEQ-RI---L-----

人 DIDVQLSSELTDSLRTLKPEGNLRDRKSFQRRN
 小鼠 -----SG-----H-----K--
 大鼠 -----SD---K-----N-----K--

人 MIEPRERAKFKRKYKVKLVEKRAFREIQL
 小鼠 -----Y-----
 大鼠 -----

图2 人和小鼠乙型肝炎病毒前-S1 蛋白结合蛋白一级结构序列同源性比较。

对于大鼠乙型肝炎病毒前-S1蛋白结合蛋白一级结构序列生物信息学分析,发现一系列潜在的蛋白修饰位点结构域。例如1个潜在的N-糖基化位点124-127 aa (NHSK); 2个潜在的cAMP, cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点11-14 aa (KRgS), 100-103 aa (KKrT); 3个潜在的蛋白激酶C(PKC)磷酸化位点5-7 aa (SnR), 217-219 aa (TkK), 431-433 aa (SIR); 4个潜在的酪蛋白激酶 II 磷酸化位点6-19 aa (SqaD), 28-31 aa (TsvD), 250-253 aa (TfeD), 305-308 aa (SedE); 4个潜在的N-豆蔻酯酸化修饰位点4-9 aa (GSnrGG), 24-29 aa (GLRpTS), 75-80 aa (GGIIAE), 322-327 aa (GAteTS); 6段双向核靶向序列94-110 aa (KKKeprkkrwtwvqkksk), 95-111 aa (KKKeprkkrwtwvqkkskh), 340-356 aa (Kteqqr rrekaarklr), 384-400 aa (RRlaelarrkeprirr), 396-412 aa (RRirrlaeadkprlgr), 451-467aa (KRnmieprerakfkrky); 2段富含精氨酸序列35-50 aa (RrrrrgprnkkrgwrR), 346-412 aa (Rrrekaarklrqqaalraar lqhqlfrlrgikaqvrrlaelarrkeprirrirlaeadkprlgr); 1段富含谷氨酸序列260-318 aa (Eahevelqrekeaklerqlalptaeqaatq esvfremceglleesededgpgc aeqpE)。

3 讨论

研究蛋白-蛋白之间的相互作用是分子生物学中的一个重要的研究内容^[6-10]。病毒性肝炎的发病机制,在很大程度上也取决于肝炎病毒蛋白-肝细胞蛋白之间相互结合和相互作用^[11-16]。研究蛋白-蛋白相互结合的生物化学技术很多,主要包括酵母双杂交技术^[17-20]、体外免疫共沉淀技术等。近年来,随着噬菌体展示技术的不断成熟,噬菌体 cDNA 表达型文库的构建和应用,也逐渐发展成为研究蛋白-蛋白之间相互作用的重要的分子生物学技术^[21-30]。与酵母双杂交技术一样,噬菌体展示技术不仅可以研究已知蛋白之间的结合,而且由于是一种 cDNA 文库的筛选技术,因此可能会筛选到以前没有发现有相互作用的新的蛋白类型。由于目前的功能基因还没有鉴定完毕,因此,利用这一策略也可以克隆到新基因。我们应用 cDNA 文库的噬菌体展示技术,以重组纯化的前-S1 蛋白作为固相筛选基质,经过5轮的“黏附-洗脱-扩增”的所谓的“淘洗”过程,从T7噬菌体 cDNA 文库中筛选得到了能够与前-S1 蛋白结合的克隆^[4-5]。对于插入片段的基因序列进行测定,结果表明,HBV 的前-S1 蛋白可以结合一种未知功能的蛋白,我们命名为 PS1BP^[4]。我们曾经应用 cDNA 表达型文库的噬菌体展示技术,筛选到一系列的蛋白结合蛋白。不仅如此,我们通过聚合酶链反应(PCR)引物探针的生物素化修饰结合链亲和素(streptavidin)的固相包被技术,巧妙地将PCR扩增产物的一端固定在免疫酶联板上,建立了筛选基因启动子 DNA 结合蛋白的技术系统,并取得了满意的结果^[24-25]。噬菌体展示技术的出现和早期应用,主要是用于单链可变区抗体的基因工程抗体研究,之后又构建了随机多肽库,包括7肽

库和 12 肽库, 随后又出现了表达型 cDNA 文库, 进一步扩大了噬菌体展示技术的应用范围. 结果表明, 噬菌体展示技术在蛋白结合蛋白、基因启动子 DNA 结合蛋白的筛选研究中也具有重要的应用前景. 我们首先利用表达型 cDNA 文库的噬菌体展示技术, 以纯化的重组前 -S1 蛋白作为固相化基质, 筛选得到了前 -S1 蛋白的结合蛋白新基因, 即人的 PS1BP, 再利用生物信息学技术^[31-43], 经过核苷酸序列同源性的比对, 克隆了大鼠的 PS1BP, 从而为研究不同生物种属的 PS1BP 蛋白的结构与功能奠定了基础. 说明分子生物学研究领域, 生物信息学技术的发展和运用已经进入到了一个新阶段.

PS1BP 蛋白是一种功能目前还不十分清楚的蛋白质, 在核苷酸数据库的比对中, 我们筛选得到的 PS1BP 与神经胶质瘤抑制基因区候选基因 2 (GLTSCR2) 是同一基因. Smith et al^[44] 在研究神经胶质瘤的过程中, 发现第 19 号染色体有一段 150 kb 的缺失区, 因而推测这一区域存在肿瘤抑制基因. 对于这一区域的基因序列进行测定和分析, 可推断有 2 个肿瘤抑制基因候选基因, 其中包括 GLTSCR2. 说明我们发现的 PS1BP, 即 GLTSCR2 可能是潜在的一种肿瘤抑制基因类型. 但是, 这一推测只是基于核苷酸序列的生物信息学分析, 还没有得到进一步的证实, GLTSCR2 基因的编码序列甚至是一种生物信息学的推断, 究竟是否存在这样的编码基因都不一定^[45-51]. 我们的筛选结果是一种表达型 cDNA 文库的筛选结果, 因此至少可以肯定 PS1BP/GLTSCR2 是一种具有表达和编码功能的基因, 因此在原来的基础上又进了一步. 从大鼠的 PS1BP/GLTSCR2 基因克隆化结果来看, 大鼠与人的同源性为 80.79%(391/484), 大鼠和小鼠的同源性为 92.98%(450/484), 说明这种基因的序列高度保守, 推测具有重要的生物学功能. 利用 Northern blot 杂交技术证实, 在心脏、胰腺中 PS1BP/GLTSCR2 基因有很高水平的表达, 肝脏、骨骼肌、肾脏中有中等水平的表达, 脑、肺组织中的表达水平较低. 这些研究结果表明, PS1BP/GLTSCR2 基因的功能可能十分广泛. PS1BP/GLTSCR2 蛋白的结构与功能、表达与调控、生物学意义、医学意义, 在神经胶质瘤和乙型肝炎病毒性肝病发病机制中的作用目前我们还一无所知, 还需要进行系统的研究加以证实.

4 参考文献

- 1 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前 -S2 蛋白结合蛋白 S2-29 新基因的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1114-1117
- 2 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前 -S2 蛋白结合蛋白的筛选. 中华肝脏病杂志 2003;11:8-10
- 3 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. 乙型肝炎病毒表面抗原 / 抗体同时阳性患者体内 S 基因序列的分析研究. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 4 董菁, 王业东, 成军, 皇甫竞坤, 钟彦伟, 杨倩. 噬菌体表面展示技术筛选乙型肝炎病毒前 -S1 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2004;29:13-15

- 5 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-322
- 6 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
- 7 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与表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 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 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. 中华医学杂志 2002;82:673-677
- 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;16:351-354
- 11 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
- 12 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 13 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. 世界华人消化杂志 2003;11:1073-1080
- 14 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-761
- 15 成军. 肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制研究策略. 中西医结合肝病杂志 2003;14:321-323
- 16 成军. 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:253-257
- 17 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 18 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 蛋白结合蛋白. 解放军医学杂志 2003;28:31-33
- 19 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 20 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 21 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
- 22 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
- 23 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 application in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 24 巨立中, 钟彦伟, 成军. 应用噬菌体展示技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 HCTP4 启动子 DNA 的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;14:360-362
- 25 巨立中, 钟彦伟, 成军. 应用噬菌体展示技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5A TP9 启动子 DNA 的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;14:363-365
- 26 成军. 噬菌体表面展示技术的新发展及在病毒性肝炎研究中的应用. 解放军医学杂志 2004;29:4-7
- 27 钟彦伟, 成军, 焦成松, 张忠东, 李强, 李莉, 陈菊梅. 抗丙型肝炎病毒核心蛋白单链抗体的制备及免疫组织化学研究. 解放军医学杂志 2004;29:8-9
- 28 张忠东, 成军, 钟彦伟, 王业东, 董菁, 陈天艳, 杨倩, 张树林. 应用噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒核心启动子结合蛋白. 解放军

- 医学杂志 2004;29:16-19
- 29 钟彦伟, 成军, 张忠东, 杨艳杰, 李强, 董菁, 刘敏, 王建军. 应用噬菌体展示技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 结合蛋白. 解放军医学杂志 2004;29:20-22
- 30 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强. 应用噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 II 结合蛋白. 解放军医学杂志 2004;29:23-26
- 31 成军, 斯崇文, 王勤环, 硕大利什曼原表面蛋白 "无鞭毛体蛋白(amastin)" 的基因克隆化与序列分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 2000;18:30-32
- 32 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 人肝再生增强因子基因组 DNA 的克隆化与序列分析. 中华肝脏病杂志 2000;8:12-14
- 33 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 墨西哥利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. 中国人兽共患病杂志 2000;16:39-41
- 34 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因的克隆化与序列分析. 中华传染病杂志 2001;19:27-31
- 35 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
- 36 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 37 成军, 夏小兵, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 王琳, 杨继珍. 杜氏利什曼原虫激活蛋白激酶 C 受体的基因克隆化与序列分析. 中国人兽共患病杂志 2002;18:24-27
- 38 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 39 王琳, 李克, 成军, 张健, 梁耀东, 刘妍. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 11 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:257-259
- 40 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 王春花, 纪冬, 党晓燕, 张树林. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 4 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:258-259
- 41 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王琳, 王刚. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11:1083-1090
- 42 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-S 区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 43 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X 编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 44 Smith JS, Tachibana I, Pohl U, Lee HK, Thanarajasingam U, Portier BP, Ueki K, Ramaswamy S, Billings SJ, Mohrenweiser HW, Louis DN, Jenkins RB. A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics* 2000;64:44-50
- 45 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 牛丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 同源基因的克隆化研究. 中国人兽共患病杂志 2003;19:73-76
- 46 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1102-1106
- 47 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-S- 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:761-762, 765
- 48 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-X- 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:763-765
- 49 成军. 坚持相对稳定的研究方向是关键. 世界华人消化杂志 2003;11:1857-1861
- 50 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004;12:1-5
- 51 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 结合蛋白 37 小鼠同源基因的克隆化及结构分析. 世界华人消化杂志 2004;12:291-297

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

• 消息 •

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

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

HBV 慢性感染患者 PBMC 凋亡与血清病毒载量

宋蕊, 王玉梅, 石理兰, 冯国和, 马力, 窦晓光

宋蕊, 王玉梅, 石理兰, 冯国和, 窦晓光, 中国医科大学第二临床学院感染科 辽宁省沈阳市 110004

马力, 中国医科大学第二临床学院传染科实验室 辽宁省沈阳市 110004

宋蕊, 女, 1974-01-14 生, 陕西省西安市人, 汉族, 2001 年中国医科大学第二临床学院传染科硕士研究生, 主要从事病毒性肝炎的研究。

项目负责人: 宋蕊, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第二临床学院感染科实验室. song_rui2002@yahoo.com.cn

电话: 024-83956981

收稿日期: 2004-03-31 接受日期: 2004-04-27

Relationship between PBMC apoptosis and serum HBV level in HBV positive patients

Rui Song, Yu-Mei Wang, Li-Lan Shi, Guo-He Feng, Li Ma, Xiao-Guang Dou

Rui Song, Yu-Mei Wang, Li-Lan Shi, Guo-He Feng, Li Ma, Xiao-Guang Dou, Department of Infectious Diseases, the Second Clinical Collage, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Rui Song, Department of Infectious Disease, the Second Clinical Collage, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. song_rui2002@yahoo.com.cn

Received: 2004-03-31 Accepted: 2004-04-27

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the serum HBV DNA quantification and the PBMCs apoptosis of the chronic hepatitis B.

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 10 healthy blood donors and 42 patients with HBV positive. PBMCs were cultured with PHA for 72 h *in vitro*. Then we used TUNEL and flow cytometry to assay the apoptosis. The HBV-DNA extracted from the serum in patients by PCR was quantified by ELISA. We used the one way ANOVA to analysis the apoptosis and the HBV-DNA quantity, and made correlation analysis between the apoptosis and the HBV-DNA quantity.

RESULTS: We identified the apoptosis by TUNEL and flow cytometry in cultured PBMCs. The apoptosis rate in mild type of chronic hepatitis B, moderate type of chronic hepatitis B and cirrhosis were (29.3±9.3%, 24.8±10.8%, 28.8±5.0%), compared to the healthy group (18.0±6.4%). Serum HBV-DNA level was the highest in mild type of chronic hepatitis B (14.3±24.8×10⁷cp/L), which was higher than other groups ($P < 0.05$). The serum HBV-DNA level in mild type of chronic hepatitis B is the highest. The serum HBV-DNA level had the correlation with the apoptosis in PBMC ($r = 0.338$, $P = 0.014$).

CONCLUSION: There is apoptosis in PBMC of the HBV chronic infections. The serum virus level is the highest in mild type of chronic hepatitis B, while its apoptosis is also the highest. The immune and HBV virus persistent condition are related to the apoptosis. The percentage of the apoptosis in PBMC

has the correlation with the virus level in serum of the HBV chronic infections.

Song R, Wang YM, Shi LL, Feng GH, Ma L, Dou XG. Relationship between PBMC apoptosis and serum HBV level in HBV positive patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1574-1577

摘要

目的: 研究HBV慢性感染患者血清HBV载量与外周血单个核细胞(PBMC)凋亡的关系。

方法: 无菌条件下分离42例HBV阳性患者及健康献血员10名外周血单个核细胞(PBMC), 在PHA的刺激下培养72 h后收集细胞。采用脱氧核糖核酸末端标记方法(terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick-end labeling, TUNEL)、流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测HBV慢性感染患者PBMC凋亡, 并用HBV-PCR定量试剂盒检测血清HBV-DNA的含量。对不同组的PBMC凋亡及血清HBV-DNA含量进行单因素方差分析, 并对凋亡情况及血清HBV-DNA含量进行相关性分析。

结果: TUNEL法与FCM检测HBV阳性患者PBMC, 证实PBMC存在凋亡, 慢性乙型肝炎轻度组、中度组与肝硬化组凋亡率明显升高分别为(29.3 ± 9.3%, 24.8 ± 10.8%, 28.8 ± 5.0%), 与健康对照(18.0 ± 6.4%)比较凋亡率显著升高($P < 0.05$)。血清HBV-DNA含量在慢性乙型肝炎轻度组最高(14.3 ± 24.8 × 10⁷cp/L), 与其他组比较病毒含量明显增高($P < 0.05$)。HBV慢性感染患者血清病毒载量与其PBMC凋亡率有一定的相关性, $r = 0.338$, $P = 0.014$ ($P < 0.05$)。

结论: HBV慢性感染患者PBMC存在凋亡, 其凋亡率较健康组明显增加。慢性乙型肝炎轻度患者血清病毒含量最高, 其凋亡率亦最高。凋亡状况与乙型肝炎的慢性化、机体的免疫状态相关。HBV慢性感染患者PBMC凋亡与其血清病毒载量有相关性。

宋蕊, 王玉梅, 石理兰, 冯国和, 马力, 窦晓光. HBV慢性感染患者PBMC凋亡与血清病毒载量. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1574-1577

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1574.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)常导致慢性感染, 易发展为重型肝炎^[1]。其慢性化、重型化的机制均与机体的免疫功能异常密切相关, 这种异常是否与活化的淋巴细胞凋亡有关目前尚不完全清楚^[2]。目前认为, HBV本身对肝细胞

胞无直接致病作用, 而 HBV 所致的免疫损伤可能是乙型肝炎重要的发病机制之一^[3]. HBV 为泛嗜性病毒, 在肝外组织细胞尤其是外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中可以复制^[4]. 有研究发现在 PBMC 中存在 HBV 的高度盘卷的 cccDNA^[5], 提示 PBMC 可以作为 HBV 转录和翻译的场所^[6]. 我们采用脱氧核糖核酸末端标记方法 (terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated biotinylated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 与流式细胞术(flow cytometry, FCM) 检测 PBMC 的凋亡状态, 并采用 HBV-DNA 定量 PCR 检测试剂盒检测血清 HBV-DNA 含量, 通过对 PBMC 凋亡的检测及患者血清 HBV-DNA 病毒量的检测, 探讨 PBMC 凋亡与 HBV 慢性感染患者血清 HBV 病毒载量的关系, 阐明 PBMC 凋亡在 HBV 慢性感染患者发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料

中国医科大学附属第二医院感染科 HBV 阳性患者 42 例, 健康对照 10 名, 男 39 例, 女 13 例, 年龄 18-64(平均 38 岁). 诊断均符合 2000 年西安会议“病毒性肝炎防治方案”的诊断标准. 根据临床指标及症状分为 5 组, HBV 携带者 9 例, 慢性乙型肝炎轻度组 10 例, 慢性乙型肝炎中度组 8 例, 慢性乙型肝炎重度组 7 例, 肝炎后肝硬化组(HBV 阳性)8 例. HBsAg 及抗 HBc-IgG 均阳性, 排除 HAV, HCV, HDV 和 HEV 感染, 排除近 3 mo 应用糖皮质激素、干扰素等影响免疫功能药物的患者. 淋巴细胞分离液(上海生化二厂)、RPMI 1640 培养液及新生小牛血清(GIBCO 公司)、植物血凝素(PHA)(广州生物制剂公司)、RNA 酶(武汉博士德生物制品有限公司)、细胞凋亡检测试剂盒(cell death detection kit, POD)(武汉博士德生物制品有限公司)、PI 染液(Sigma 公司)、流式细胞仪(美国 Beclon-Dickinson 公司产品)、HBV-DNA 定量 PCR 检测采用乙型肝炎病毒(HBV)核酸扩增(PCR)酶免疫定量(ELISA)试剂盒(上海浩源生物科技有限公司).

1.2 方法

无菌抽取 HBV 阳性患者空腹静脉血 8 mL, 肝素抗凝 6 mL. 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 分离血清 2 mL. 应用 HBV-DNA 定量检测试剂盒检测血清 HBV-DNA 含量(方法按说明书). 用含 10 mL/L 新牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释提取细胞成 1×10^6 /mL, 加入 PHA 100 μ g, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养箱温育 72 h, 收取培养细胞.

1.2.1 凋亡的检测

TUNEL 法: 细胞凋亡检测试剂盒(cell death detection kit, POD). 将培养的细胞收集, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 去上清, 留细胞沉淀, 将细胞涂片, 并用 40 g/L 多聚甲醛固定. 细胞涂片用 3 mL/L H₂O₂ 室温处理 10 min. 蒸馏水洗涤 2 min 3 次. 加入 Proteinase K 37 $^{\circ}$ C 消化 3 min. 0.1 mol/L PBS 洗 2 min 3 次. 加标记缓冲液, 置湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 标记 2 h. 0.1 mol/L PBS 洗 2 min 3 次. 加封闭液, 室温 30 min, 甩掉封闭液, 加生物素化

抗地高辛抗体 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min. 0.1 mol/L PBS 洗 2 min 3 次. 加 SABC, 37 $^{\circ}$ C 60 min 反应. 0.1 mol/L PBS 洗 5 min 4 次. DAB 显色, 苏木素复染. 脱水、透明, 封片. 流式细胞仪检测(Flow Cytometry FCM): 收取培养的细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加 700 mL/L 乙醇 1 mL -20 $^{\circ}$ C 固定过夜. 离心去掉固定液, 再用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加 RNA 酶(1 g/L)20 μ L 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 加入 PI (50 mg/L) 500 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 以上后上流式细胞仪. 以 G₀/G₁ 峰左侧出现的亚二倍体细胞群峰型来检测凋亡的细胞, 每次计数 10^5 个细胞.

1.2.2 HBV-PCR 定量检测

取血清 20 μ L + 病毒裂解液 20 μ L, 混匀 37 $^{\circ}$ C 1 h, 加入样品中和液 40 μ L, 混匀. 取出 15 μ L 加入盛有 15 μ L 主反应液的薄壁反应管中, 加入扩增液进行 PCR 反应. 反应后加入变性液 30 μ L, 混匀, 加入杂交液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 1 h. 洗板 5 次, 控干然后加酶联液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 15 min. 再次洗板, 控干, 加入显色液 100 μ L, 避光 10 min, 加终止液 100 μ L, 酶标仪读数.

2 结果

2.1 TUNEL 法检测 PBMC 凋亡结果 (图 1, 表 1), FCM

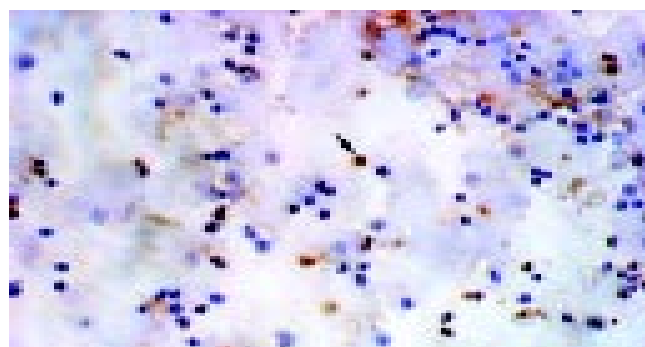


图 1 凋亡细胞胞核染色质特异性棕黄色 (40 \times).

表 1 PBMC 凋亡率检测 TUNEL 法计数结果(mean \pm SD, %)

分组	n	TUNEL 凋亡率	PI 凋亡率	血清 HBV-DNA 定量 ($\times 10^7$)cp/mL
对照(健康)	10	0.6 \pm 0.4	18.0 \pm 6.4	-
HBV 携带	9	2.5 \pm 1.2	20.2 \pm 6.3	2.3 \pm 4.4
CHB 轻度	10	9.1 \pm 0.9 ^{ab}	29.3 \pm 9.3 ^{ab}	14.3 \pm 24.8 ^e
CHB 中度	8	4.3 \pm 1.5 ^c	24.8 \pm 10.8 ^c	6.5 \pm 6.2
CHB 重度	7	1.0 \pm 0.8	15.2 \pm 5.0	1.1 \pm 0.8
肝硬化	8	7.6 \pm 2.2 ^{ab}	28.8 \pm 5.0 ^{ab}	4.0 \pm 8.2

^aP < 0.05 vs 重度, ^bP < 0.01 vs 对照, ^cP < 0.05 vs 健康, ^eP < 0.05 vs 重度.

检测 PBMC 凋亡结果(图 2 表 1), 血清 HBV-DNA 含量的检测结果(表 1). HBV 阳性患者 PBMC 存在凋亡, HBV 阳性患者 PBMC 凋亡率均较健康组高, 慢性乙型肝炎轻度组与肝硬化组凋亡率明显升高与健康组比较 P < 0.01,

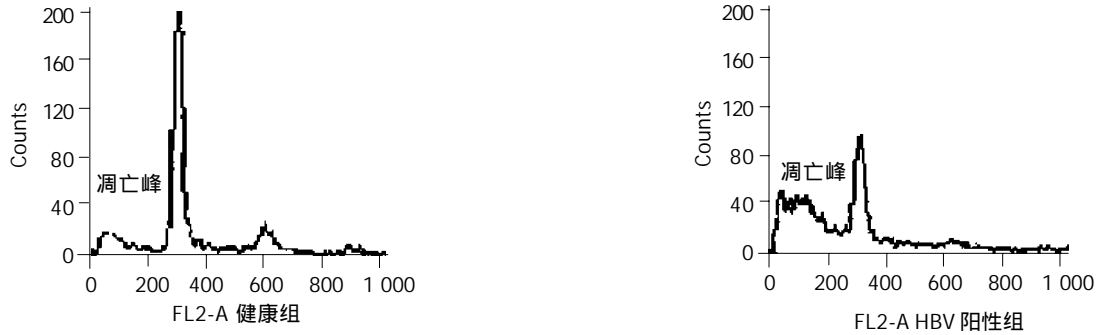


图2 HBV 阳性患者 PBMC G₀/G₁ 峰前凋亡的亚二倍体峰明显高于正常.

与重度组相比P <0.05; 慢性乙型肝炎中度组凋亡率亦升高与健康组比较P <0.05; 慢性乙型肝炎轻度组凋亡率最高; 重度组与 HBV 携带组凋亡率亦增高, 但与健康组比较 P >0.05. 轻度组的血清 HBV-DNA 含量最高, 与重度组相比 P <0.05; 与其他组比较 P >0.05.

2.2 血清 HBV-DNA 含量与 PBMC 凋亡率相关性结果 (图3) PBMC 凋亡率与血清 HBV-DNA 含量有相关性, 相关系数 r =0.338, P =0.014.

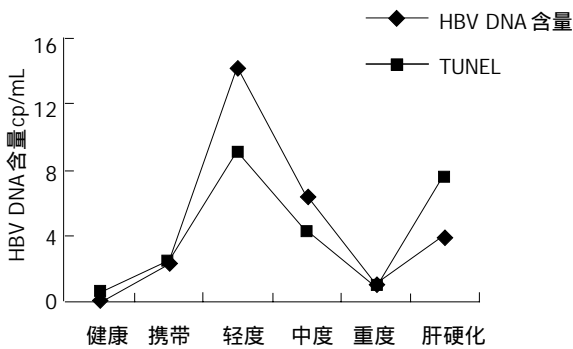


图3 HBV-DNA 含量与凋亡率.

3 讨论

HBV 本身并不直接导致肝细胞损伤, 病毒的复制和病毒抗原的表达可激发机体的免疫反应造成肝脏细胞炎症^[7], 多数研究认为 HBV 引起的慢性肝炎主要是免疫损伤所致, 乙型肝炎感染免疫状态研究对于进一步分析乙型肝炎的发病机制有重要的作用^[8]. 自 1972 年 Kerr et al 明确了细胞凋亡(apoptosis)的概念以来, 许多学者对病毒性肝炎肝细胞凋亡进行了广泛研究^[9]. 动物实验研究表明, 肝细胞凋亡是肝衰竭的一个早期过程^[10]. 肝细胞凋亡与慢性乙型肝炎患者病理损伤有关, 但这些研究都停留在单纯探讨肝细胞凋亡方面, 而其他细胞凋亡与肝病关系研究尚少^[11]. 有研究报道新鲜分离的外周血淋巴细胞对凋亡抵抗性很强, 几乎不能见凋亡细胞^[12], 本研究应用 TUNEL 及 FCM 检测乙型肝炎患者 PBMCs 凋亡, 实验结果表明 PBMCs 培养后检测到凋亡, 未培养的 PBMCs 未检测到凋亡(预实验检测新鲜提取的 PBMCs 未检测到凋亡). 有研究提出在体内凋亡小体很快被周围巨噬细胞所吞噬, 相反, 在体外, 巨噬细

胞接触凋亡小体机会减少, 因此在培养细胞中凋亡增加^[13], 本研究结果也证实了这一点.

在 PHA 等丝裂原刺激培养过程中 PBMC 逐渐对 PHA 等再刺激诱导的凋亡敏感, 这种淋巴细胞经活化后再发生凋亡的现象称为活化诱导的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)^[14]. AICD 与免疫功能的负调节有密切关系, 活化的淋巴细胞能否及时清除对于调节机体免疫反应程度起了重要作用^[15]. 一方面, 感染细胞凋亡是机体细胞免疫清除病毒感染的一种手段, 另一方面, 病毒可利用调节反应性淋巴细胞凋亡等手段力求在体内繁殖、复制及弥散^[16]. 但迄今有关慢性乙型肝炎免疫细胞状态和淋巴细胞凋亡的关系尚不清楚^[17]. 细胞凋亡与免疫学之间存在着极为密切的关系, 如参与免疫系统的发育调节; 参与免疫反应的调节, 外周 T、B 细胞在被激活同时, 也启动了凋亡控制系统; 参与 T 细胞介导的杀伤机制, 包括诱导靶细胞凋亡^[18]. 血清 HBV-DNA 含量高低反映了病毒在体内复制水平^[19]. 乙型肝炎病变活动是宿主免疫对病毒及其抗原的应答状态^[20]. 在对抗病毒感染过程中, 细胞免疫起了重要作用^[21]. PBMC 是 T、B 淋巴细胞、单核巨噬细胞及自然杀伤细胞等免疫活性细胞的集合体, 在机体免疫反应尤其是细胞免疫反应中起重要的作用^[22]. 在肝炎发病过程中, 肝炎病毒侵犯 PBMC 使其发生免疫反应可能引起机体免疫紊乱, 成为慢性肝炎发病原因之一^[23]. 因此研究肝炎病毒感染的 PBMCs 有助于对肝炎病毒的致病机制进行深入研究^[24].

我们发现, 在 HBV 慢性感染患者 PBMC 中存在凋亡, 其凋亡率均较健康对照组增高, 而慢性乙型肝炎轻度及肝硬化组 PBMC 凋亡率较健康组明显增高(P <0.01). 慢性乙型肝炎患者轻度组血清病毒载量与其他组比较亦最高, 与重度组比较差异有显著性(P <0.05). 本试验证明, HBV 慢性感染患者 PBMC 凋亡率与血清病毒载量有相关性. 考虑 HBsAg 携带者处于免疫耐受阶段, 病毒处于相对静止状态, HBV 慢性化主要是人体细胞免疫功能低下所致, 故凋亡较低. 慢性乙型肝炎轻度患者处于免疫耐受的高复制期, HBV 复制活跃, 病毒量与病变程度成反比, 病毒复制水平较高, 肝内病变以变性为主, 凋亡较高. 随着感染的持续, 病毒复制水平逐

渐降低^[25], 肝内病变以变性和坏死同时存在. 在重度组, 肝细胞以坏死为主, 反应性淋巴细胞活化低下, 淋巴细胞耗竭, 因此其 PBMC 的凋亡率下降. AICD 调节是一种生理性调节机制, 可限制淋巴细胞发生过强过度的免疫反应, 但同时可致外周免疫耐受^[26], 结果显示 HBV 慢性感染患者 PBMC 存在 AICD 现象. 在肝细胞损伤的过程中, 肝细胞凋亡由 T 细胞活化的抗原识别启动抗原非特异性效应子的级联系统, 在 HBV 慢性感染患者中阻止肝细胞肿瘤发生^[27].

本实验从慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞凋亡及血清 HBV 病毒载量的情况, 分析了 HBV 慢性感染患者免疫状况, 为 HBV 慢性感染的发病机制提供了一定的依据. 今后将对 PBMC 中 HBV-DNA 载量与 PBMC 凋亡的关系进行进一步研究.

4 参考文献

- Rivero M, Crespo J, Fabrega E, Casafont F, Mayorga M, Gomez-Fleitas M, Pons-Romero F. Apoptosis mediated by the Fas system in the fulminant hepatitis by hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2002;9:107-113
- Benedict C, Norris PS, Ware CF. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* 2002;3:1013-1013
- Pasquetto V, Wieland S, Chisari FV. Intracellular hepatitis B virus nucleocapsids survive cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J Virol* 2000;74:9792-9796
- 施军平, 郑亚琴, 陈海英. 慢性乙肝患者 PBMC 中 HBV-DNA 存在状态的测定及其临床意义. *临床肝胆病杂志* 2001;17:227-228
- Cabrero M, Bartolome inverted question mark J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000;32:116-123
- Lee JY, Chae DW, Kim SM, Nam ES, Jang MK, Lee JH, Kim HY, Yoo JY. Expression of FasL and perforin/granzyme B mRNA in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004;11:130-135
- Wang KX, Peng JL, Wang XF, Tian Y, Wang J, Li CP. Detection of T lymphocyte subsets and mIL-2R on surface of PBMC in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2017-2020
- Diepolder HM, Gruener NH, Gerlach JT, Jung MC, Wierenga EA, Pape GR. Different levels of T-cell receptor triggering induce distinct functions in hepatitis B and hepatitis C virus-specific human CD4(+) T-cell clones. *J Virol* 2001;75:7803-7810
- 闫玉萍, 阚晓, 常树珍, 朱彤宇, 郭超英. 慢性乙型肝炎活检组织 HBeAg 含量与肝细胞凋亡率、Apo2.7 因子表达的相关性. *上海免疫学杂志* 2003;23:47-49
- 王玉梅, 冯国和, 黄芬, 李颖, 赵桂珍. 肿瘤坏死因子 α 及 caspase-3 表达与暴发性肝衰竭细胞凋亡. *中华内科杂志* 2003;42:566-570
- Su F, Theodosis CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001;75:215-225
- 邢同京, 章廉, 骆抗先, 侯金林, 冯筱榕, 何海棠. 外周血淋巴细胞凋亡在慢性乙型肝炎发病机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:232-233
- Kiyici M, Gurel S, Budak F, Dolar E, Gulten M, Nak SG, Memik F. Fas antigen (CD95) expression and apoptosis in hepatocytes of patients with chronic viral hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1079-1084
- Ji W, Wang HF, Feng CQ. Activation-induced cell death in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with chronic hepatitis B may be related to abnormal production of interleukin 12 and 10. *J Viral Hepat* 2001;8:30-33
- Hou CS, Wang GQ, Lu SL, Yue B, Li MR, Wang XY, Yu JW. Role of activation-induced cell death in pathogenesis of patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2356-2358
- Tsamandas AC, Thomopoulos K, Zolota V, Kourelis T, Karatzas T, Ravazoula P, Tepetes K, Petsas T, Karavias D, Karatza C, Bonikos DS, Gogos C. Potential role of bcl-2 and bax mRNA and protein expression in chronic hepatitis type B and C: a clinicopathologic study. *Mod Pathol* 2003;16:1273-1288
- Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003;109:487-495
- Kottlilil S, Bowmer MI, Trahey J, Howley C, Gamberg J, Grant MD. Fas/FasL-independent activation-induced cell death of T lymphocytes from HIV-infected individuals occurs without DNA fragmentation. *Cell Immunol* 2001;214:1-11
- Simon K, Rotter K, Zalewska M, Gladysz A. HBV-DNA level in blood serum as a predictor of good response to therapy with interferon-alpha-2b of patients with chronic hepatitis B. *Med Sci Monit* 2000;6:971-975
- Rabe C, Cheng B, Caselmann WH. Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated liver cancer. *Dig Dis* 2001;19:279-287
- Tsutsui H, Adachi K, Seki E, Nakanishi K. Cytokine-induced inflammatory liver injuries. *Curr Mol Med* 2003;3:545-559
- 李玲, 顾长海, 李欣. 激活诱导细胞死亡在乙型肝炎发病机制中的意义. *中华医学杂志* 2003;83:1146-1149
- Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:491-508
- 王平忠, 张中伟, 周永兴, 白雪帆. 定量 PCR 检测慢性乙型肝炎患者 HBV-DNA 及其意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:755-758
- Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanoue T. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 2004;72:203-214
- Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7797-7802
- Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:537-544

丁型肝炎肝组织 Bcl-2/Bax、Bak 表达与细胞凋亡表达

顾小红, 张云东, 李奇芬, 王宇明

顾小红, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化科 重庆市 400042

张云东, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科 重庆市 400042

李奇芬, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病专科医院, 全军传染病研究中心 重庆市 400042

顾小红, 女, 1968-06-10 生, 四川省绵阳市人, 汉族. 2003 年第三军医大学博士, 现任副主任医师, 副教授, 发表论文 27 篇, 获首届全军优秀研究生论文奖, 军队科技进步二等奖一项, 参编专著 6 部, 主要从事病毒性肝炎发病机制研究.

项目负责人: 顾小红, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化科. zhanggxh@cta.cq.cn

电话: 023-66690688

收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2004-02-01

Expression of Bcl-2/Bax, Bak and hepatocytic apoptosis in tissues of patients with hepatitis D

Xiao-Hong Gu, Yun-Dong Zhang, Qi-Feng Li, Yu-Ming Wang

Xiao-Hong Gu, Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China.

Yun-Dong Zhang, Department of Neurosurgery, Daping Hospital Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Qi-Feng Li, Yu-Ming Wang, Infectious Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Xiao-Hong Gu, Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. zhanggxh@cta.cq.cn

Received: 2003-08-08 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To study the expression of Bcl-2, Bax, Bak and hepatocytic apoptosis in pathogenesis of hepatitis D.

METHODS: Expression of HDAg, Bcl-2, Bax, Bak and hepatocytic apoptosis in liver tissues of 77 patients with hepatitis D were studied by immunohistochemistry and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) technique. Meanwhile, the relationship between expression of HDAg, Bcl-2/Bax and hepatocytic apoptosis were studied by double labeling and serial sections.

RESULTS: Bcl-2 was mainly expressed in the cytoplasm of hepatocytes, Bax and Bak mainly in the cytoplasm of hepatocytes and partly in the nucleus of hepatocytes, and HDAg mainly in the nucleus of hepatocytes. Many HDAg and Bax or Bak positive cells were distributed among infiltrating lymphocytes at the periportal region especially at the advancing edges in the areas of piecemeal necrosis. Many apoptotic hepatocytes were found to locate near to positive cells of HDAg. There were positive correlations between degrees of HDAg expression, Bax or Bak expression, and hepatocytic apoptosis ($t=27.89$, $P<0.01$, $P<0.05$ $t=19.16$, $P<0.05$ $t=18.22$).

CONCLUSION: The distribution and expression of Bax, Bak, HDAg and hepatocytic apoptosis are significantly correlated with the activity of inflammation and the severity of the liver damage.

Gu XH, Zhang YD, Li QF, Wang YM. Expression of Bcl-2/Bax, Bak and hepatocytic apoptosis in tissues of patients with hepatitis D. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1578-1581

摘要

目的: 探讨 Bcl-2, Bax, Bak 及肝细胞凋亡在丁型肝炎发病机制中的意义.

方法: 采用 TUNEL 技术和免疫组化单、双标记染色, 检测 77 例丁肝患者肝组织中 HDAg, Bcl-2, Bax 和 Bak 表达, 以及肝细胞凋亡表达. 同时以 HDV 阴性的 67 例乙型肝炎患者作对照.

结果: Bcl-2, Bax 和 Bak 均以肝细胞质表达为主, HDAg 以肝细胞核表达为主. HDAg, Bax 和 Bak 与肝细胞凋亡表达及分布有相关性 ($t=27.89$, $P<0.01$, $P<0.05$ $t=19.16$, $P<0.05$ $t=18.22$), 四成分在各型肝炎中的表达强度有显著性差别意义 ($P<0.05$).

结论: HDAg, Bax, Bak 和肝细胞凋亡表达强度及阳性细胞分布均与肝组织炎症和病理损害程度相关, HDV 感染可诱导肝细胞表达 Bax 和 Bak, 增强肝细胞凋亡.

顾小红, 张云东, 李奇芬, 王宇明. 丁型肝炎肝组织 Bcl-2/Bax、Bak 表达与细胞凋亡表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1578-1581

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1578.asp>

0 引言

HBV 感染者重叠感染丁型肝炎病毒 (Hepatitis D virus, HDV) 后, 其病情加重、病程慢性化和死亡率增高的机制尚不十分清楚. 病毒性肝炎时常伴有肝细胞凋亡和坏死. 为了解细胞凋亡因子 Bcl-2/Bax, Bak 及其介导的肝细胞凋亡在丁型肝炎病情重型化机制中的作用, 我们对丁型肝炎患者肝组织 HDAg, Bcl-2/Bax, Bak 及细胞凋亡表达进行了研究如下.

1 材料和方法

1.1 材料 西南医院 1990-2002 院丁型肝炎患者 77 例, 其中急性肝炎 (AH) 8 例, 轻度慢性肝炎 (Mild-CH) 17 例, 中度慢性肝炎 (Mode-CH) 23 例, 重度慢性肝炎 (Seri-CH) 16 例, 重型肝炎 (SH) 13 例 (急性重型肝炎 1

例、亚急性重型肝炎 6 例、慢性重型肝炎 6 例). 以 67 例 HDV 阴性乙型肝炎作对照, 其中 AH 9 例, Mild-CH 13 例, Mode-CH 17 例, Seri-CH 18 例, SH 10 例(亚急性重型肝炎 5 例、慢性重型肝炎 5 例). 所有病例均经皮肝穿获得肝组织, 病理检查确诊, 诊断标准以 2000 年《病毒性肝炎防治方案》为依据. 兔抗人 Bcl-2, Bax, Bak 多克隆抗体为美国 Zymed 公司产品. 丁型肝炎多克隆抗体由本科自行选定的 HDV 合成肽抗原免疫家兔制备. 免疫组化染色的过氧化酶标记的链霉卵白素(S-P)试剂盒, 为美国 Maxin Biotech Inc 产品. TUNEL 试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品.

1.2 方法 操作步骤按说明书进行. 阳性对照为已知 Bcl-2, Bax 阳性肝癌组织切片, 阴性对照选自正常人肝组织, 其血清各型肝炎标志物均阴性. 此外, 分别用鼠血清和 PBS 代替第一抗体作替代实验. 每张切片先分别检测 HDAg, Bcl-2, Bax, Bak 和肝细胞凋亡. 免疫组化和细胞凋亡程度判断: 低倍镜视野阳性细胞少于 1/3 为(+), 2/3 为(++), 大于 2/3 为(+++).

统计学处理 采用计数资料的 χ^2 检验和秩相关分析.

2 结果

2.1 肝细胞凋亡 凋亡肝细胞体积变小, 胞质收缩, 核固缩, 核呈月牙型, 或形成核膜泡, 致密染色质边聚(图 1 A), 且可不伴有炎性细胞浸润. 各类丁型肝炎患者的肝细胞均有不同程度的凋亡, 凋亡细胞呈点或片簇状分布于肝小叶, 在门脉周围及坏死灶处较为密集, 科伴有炎症细胞浸润. 急性肝炎和轻度慢性肝炎组比较, 凋亡细胞的阳性程度无显著差异. 中、重度慢性肝炎和重型肝炎肝细胞凋亡表达明显强于前二者(P <0.05, 表 1). 丁型肝炎肝细胞凋亡表达强度及阳性率(96% ,74/77)略强于乙型肝炎(93% , 64/67), 但无统计学差异.

2.2 HDAg 表达 HDAg 主以肝细胞核表达, 其次是胞质表达. 在坏死灶边缘肝细胞和气球样变性肝细胞质内有大量的 HDAg 呈浆型强阳性表达. 中、重度慢性肝炎和重型肝炎中 HDAg 阳性细胞呈弥散型、灶型或片簇状分布于肝小叶内, 在门脉周围和坏死灶处较密集(图 1 B); 急性肝炎和轻度慢性肝炎 HDAg 阳性细胞多呈单个或小灶状稀疏分布于小叶内. 秩相关分析发现重型肝炎和慢性肝炎中、重度 HDAg 表达强于急性肝炎和轻度慢性肝

炎(P <0.05, 表 1).

表 1 丁型肝炎肝细胞凋亡和 HDAg 表达

type	TUNLE				HDAg		
	-	+	++	+++	+	++	+++
AH	1	6	1	0	6	2	0
Mild-CH	2	11	4	0	15	2	0
Mode-CH	0	4	16	3	7	10	6
Seri-CH	0	2	10	4	1	9	6
SH	0	1	5	7	0	7	6

Ridit 分析, 以轻度慢性肝炎为标准组, 中、重度慢性肝炎和重型肝炎的 R 值(0.82、0.86 和 0.91)均大于 0.5, P <0.05.

2.3 Bcl-2, Bax 和 Bak 表达 Bcl-2 阳性率为 35.1%(27/77), 以胞质表达为主, 可见核膜表达, 但未见核阳性表达. Bcl-2 阳性细胞以散在分布为主, 也可有片状分布(图 1 C). 肝细胞坏死区少见 Bcl-2 阳性细胞, 在少数浸润的炎性细胞和胆小管细胞可见阳性表达. 结果显示, 急性肝炎和轻度慢性肝炎中 Bcl-2 的表达明显高于中、重度慢性肝炎和重型肝炎(P <0.05). 连续切片观察在坏死区及周围有较多凋亡细胞, 而 Bcl-2 在此区却少有阳性细胞. Bax 和 Bak 阳性率分别为 83.1%(64/77)、65.5%(54/77), 以胞质表达为主. 急性肝炎和轻度慢性肝炎中, 阳性细胞较少且分散, 表达强度也较弱; 中、重度慢性肝炎和重型肝炎中 阳性细胞呈灶状或片簇状分布于肝小叶周边, 在门脉周围、碎屑状坏死区 Bax, Bak 表达尤为明显, 其表达较急性肝炎、轻度慢性肝炎组明显增强. 乙型肝炎肝组织中, Bax, Bak 表达及阳性细胞分布基本与丁型肝炎的一致, 但片簇状较少见, 表达程度稍弱.

2.4 HDAg, Bcl-2, Bax 和 Bak 表达与肝细胞凋亡的关系 双标记发现, 多数凋亡细胞位于 HDAg 阳性部位或其附近, 少数组织中二者无明显解剖学关系; 凋亡可发生于 HDAg 阳性细胞, 亦可发生在 HDAg 阴性细胞. 坏死区及其周围有较多凋亡细胞, 而 Bcl-2 在此区则很少有阳性信号. 但在 TUNEL 阳性的其他区域也可见 Bcl-2 阳性细胞. 与 Bcl-2 分布相反, Bax 表达阳性区域与肝细胞凋亡表达和程度密切相关(图 2, 表 2).

表 2 肝细胞 HDAg, Bax, Bak 表达与肝细胞凋亡的关系(n, χ test)

TUNEL	HDAg ^b			Bax ^a				Bak			
	+(n=29)	++(n=30)	+++ (n=18)	-(n=13)	+(n=28)	++(n=22)	+++ (n=14)	-(n=23)	+(n=22)	++(n=19)	+++ (n=13)
-	2	1	0	2	0	1	0	2	1	0	0
+	14	6	4	7	10	4	3	12	7	3	2
++	11	18	7	4	14	13	5	8	10	13	5
+++	2	5	7	0	4	4	6	1	4	3	6

^aP <0.05, t=19.16, ^bP <0.01, t=27.89, ^cP <0.05, t=18.22 .

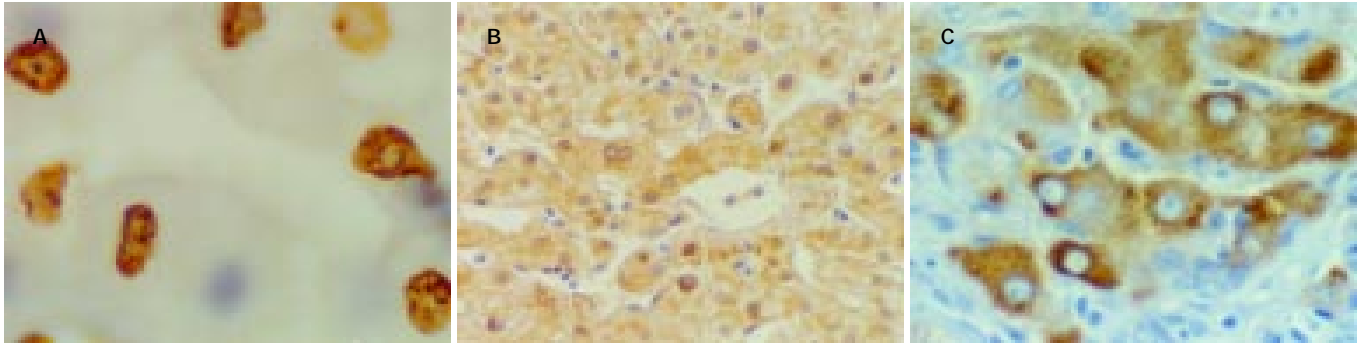


图1 丁型肝炎患者肝组织细胞凋亡和免疫组化检测. A: 肝细胞凋亡表达, TUNEL×1 000. B: 肝细胞HDAg表达, SP×200. C: 肝细胞 bcl-2 表达, SP×400.

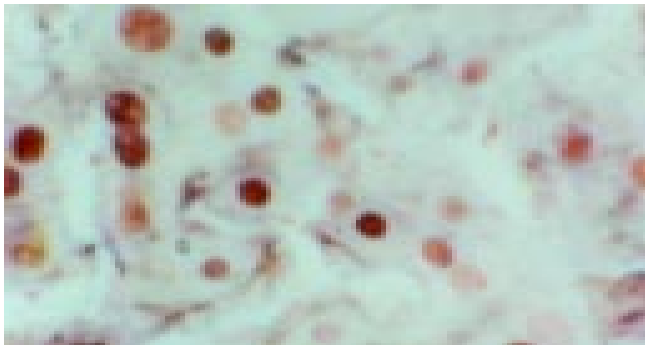


图2 丁型肝炎患者肝细胞凋亡(红色)和 bax(紫黑色)双标记表达, DS×400.

3 讨论

细胞凋亡是机体在生长发育和受到外来刺激时清除多余、衰老和受损伤的细胞以保持体内环境平衡的自我调节机制. 细胞凋亡过程受到一系列相关基因的调节和控制. 这种调节机制发生障碍和紊乱与多种疾病的发生、发展密切相关. 近年研究发现肝细胞凋亡在病毒性肝炎发病机制中有着重要作用. 细胞凋亡的强弱与患者病情的轻重直接相关. 线粒体功能改变是决定细胞死亡的关键因素, 而定位于线粒体膜的 Bcl-2, Bax 和 Bak 等蛋白可通过调节线粒体功能而制约细胞凋亡的发生^[1-3].

无能在生理或病理条件下, Bcl-2 为细胞凋亡过程中的一类重要的抑制基因, Bcl-2 的高度表达可阻断细胞凋亡的发生, 延长细胞存活时间, 而不影响细胞增生, 并在多种正常细胞的激活和发育过程中表达, 而在成熟或走向凋亡的细胞不表达或低表达^[4-6]. 已发现病毒编码蛋白与 Bcl-2 具有同源性, 可阻止细胞凋亡的发生, 有利病毒在宿主细胞内的长期潜伏, 在不出现细胞溶解坏死的情况下, 造成病毒的持续感染^[7-8].

Bax, Bak 为 Bcl-2 相关蛋白, 与 Bcl-2 的作用相反, 能加速细胞凋亡, Bcl-2 表达水平较高时, 可形成 Bcl-2 和 Bcl-2 同源二聚体, 抑制细胞凋亡; Bax 表达水平较高时, 则形成 Bax 和 Bax 同源二聚体, 加速细胞凋亡. Bax 可与 Bcl-2 蛋白形成异二聚体并使之失活, 加强表达 Bax 形成同二聚体, 加速细胞凋亡, 因此 Bcl-2 和 Bax 二者间的比率影响着细胞的凋亡状况. Bak 可直接抑

制 Bcl-2 活性以促进细胞凋亡^[4-5, 7-9].

Bcl-2 蛋白在丁型肝炎的表达与乙型肝炎和正常人肝组织中的表达无统计学差别意义. 而 Bax、Bak 表达明显高于 Bcl-2 蛋白的表达, 中、重度慢性肝炎和重型肝炎中的表达强于急性肝炎和轻度慢性肝炎, 重型丁型肝炎中 Bax, Bak 表达强于重型乙型肝炎 ($P < 0.05$). 双标记检测发现 HDAg 与 Bax, Bak 表达及阳性细胞分布呈一致性. 对各型肝炎 HDAg, Bcl-2 和 Bax, Bak 表达强度分析发现, HDAg 和 Bax 及肝细胞凋亡均与肝组织炎症活动和病理损害相关, 提示了丁型肝炎发病机制中 HDAg, Bax, Bak 和细胞凋亡的作用.

乙肝病毒对 Bax 蛋白表达可能有诱导作用, 对 Bcl-2 表达无明显影响, Bax 参与了肝细胞损害过程^[11, 16]. 认为丁型肝炎中除了乙肝病毒抗原可诱导肝细胞表达多种促凋亡因子外, HDAg 也有同样作用, 不仅可诱导 Fas/FasL 表达^[10, 16], 也可促进 Bcl-2、Bax、Bak 表达. 因此慢性乙肝患者或 HBsAg 携带者重叠 HDV 感染后, 乙肝病毒抗原和丁肝病毒抗原可同时促进多种促凋亡因子的表达, 增强宿主的免疫应答, 及肝组织中复制状态的 HDV 对肝细胞的直接细胞毒性作用^[11-16], 一方面导致肝细胞凋亡, 被病毒感染的细胞随之被清除; 另一方面则导致大量肝细胞坏死, 加重病理损害, 病情恶化, 临床死亡率增高, 预后明显变差. 提示, 在丁型肝炎病情重型化机制中, 多种促凋亡因子介导的肝细胞凋亡可能起了一定的重要作用.

4 参考文献

- 1 Tsamandas AC, Thomopoulos K, Zolota V, Kourelis T, Karatzas T, Ravazoula P, Tepetes K, Petsas T, Karavias D, Karatza C, Bonikos DS, Gogos C. Potential role of bcl-2 and bax mRNA and protein expression in chronic hepatitis type B and C: a clinicopathologic study. *Mod Pathol* 2003;16:1273-1288
- 2 Kobayashi M, Tsujitani S, Kurisu Y, Kaibara N. Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1602-1606
- 3 Upadhyay G, Singh R, Kumar A, Kumar S, Kapoor A, Godbole MM. Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver. *Hepatology* 2004;39:1120-1130
- 4 Zhang H, Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Liu HF, Luo YH. Effect of *Helicobacter pylori* infection on expression of Bcl-2 family members in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:227-230

- 5 Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF- κ B, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004;10:22-25
- 6 Akcali KC, Dalgic A, Ucar A, Haj KB, Guvenc D. Expression of bcl-2 gene family during resection induced liver regeneration: comparison between hepatectomized and sham groups. *World J Gastroenterol* 2004;10:279-283
- 7 Wang SS, Zhang T, Wang XL, Hong L, Qi QH. Effect of arsenic trioxide on rat hepatocellular carcinoma and its renal cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 2003;9:930-935
- 8 Zhou HB, Yan Y, Sun YN, Zhu JR. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:408-411
- 9 Li SM, Yao SK, Yamamura N, Nakamura T. Expression of Bcl-2 and Bax in extrahepatic biliary tract carcinoma and dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2579-2582
- 10 顾小红, 李奇芬, 王宇明. 丁型肝炎患者肝组织中 Fas/FasL 和肝细胞凋亡表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:35-38
- 11 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
- 12 顾小红, 李奇芬, 王宇明. 伴 HDV 感染的乙型肝炎患者的临床特征. *中华肝脏病杂志* 2001;7:34-36
- 13 顾小红, 李奇芬, 王宇明. 丁型肝炎患者肝组织 HDAg 与 HBsAg/HBcAg 和 HBVDNA 相关性研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:31-34
- 14 杨柳明, 吴志荣, 赵延龙, 陈杜芳, 伍桂荣. 青年乙型肝炎患者肝组织 Bcl-2, Bax 蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:966-967
- 15 王剑明, 邹倩, 邹声泉. 阻塞性黄疸大鼠肝组织 Bcl-2 及 Bax 的表达与细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2001;9:911-914
- 16 蒋业贵, 李奇芬, 王宇明, 顾长海. HDV/HBV 感染树鼯肝组织中 Bcl2/Bax 表达和肝细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2000;8:625-628

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

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

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

1 本系统的功能

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

2 网址

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

3 论文摘要格式

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

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287,30000188)

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

小鼠和大鼠NS5A TP4同源基因序列的生物信息学分析

成军, 杨倩, 刘妍, 王建军, 纪冬

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

成军, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1994年北京医科大学传染病学博士, 1994年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. 教授, 主任医师, 博士生导师, 出版专著5部, 发表论文400篇. 学会传染病与寄生虫病学会副主任委员.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-05-11

Identification and analysis of murine and rat homologous gene to human NS5A TP4 by bioinformatics method

Jun Cheng, Qian Yang, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Dong Ji

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

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2004-02-03 Accepted: 2004-05-11

Abstract

AIM: To identify and analyze murine and rat NS5A TP4 cDNA sequences homologous to human NS5A TP4 cDNA sequence.

METHODS: The human NS5A TP4 cDNA was identified by combination of molecular biology and bioinformatics methods. The GenBank was searched for NS5A TP4 homologous cDNA sequences from mouse and rat. The identity and similarity were compared between human mouse and rat NS5A TP4 cDNA sequences.

RESULTS: The murine and rat NS5A TP4 cDNAs were consisted of 762 nucleotides (nt) and 756 nt, respectively. They encoded a protein of 253 amino acid residues (aa) and 251 aa, respectively. The similarity of murine and rat NS5A TP4 to human homologue was 90.29% and 84.25%, respectively, and the identity of murine and rat NS5A TP4 to human homologue was 95.65% and 86.96%, respectively.

CONCLUSION: The murine and rat NS5A TP4 cDNAs are identified.

Cheng J, Yang Q, Liu Y, Wang JJ, Ji D. Identification and analysis of murine and rat homologous gene to human NS5A TP4 by bioinformatics method. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1582-1587

摘要

目的: 克隆、鉴定、分析小鼠和大鼠NS5A TP4基因序列, 确定编码产物序列, 并对于其与人的NS5A TP4基因及其编码产物的序列的同源性进行分析.

方法: 利用基因芯片技术获得了人NS5A TP4的cDNA序列, 利用生物信息学技术确定小鼠、大鼠的NS5A TP4的基因及其编码产物的序列, 并对于其同源性进行生物信息学分析.

结果: 利用生物信息学技术确定了小鼠和大鼠的NS5A TP4的基因及其编码产物的序列, 小鼠和大鼠的NS5A TP4编码基因区分别由762和756个核苷酸(nt)组成. 编码产物分别由263和261个氨基酸残基(aa)组成. 与人NS5A TP4基因和蛋白质一级结构序列的同源性分别为90.29%, 84.25%和95.65%, 86.96%.

结论: 应用生物信息学技术确定了小鼠和大鼠的NS5A TP4的基因及编码产物的序列.

成军, 杨倩, 刘妍, 王建军, 纪冬. 小鼠和大鼠NS5A TP4同源基因序列的生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1582-1587

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1582.asp>

0 引言

病毒性肝炎的发病机制, 就是肝炎病毒与肝细胞生物大分子之间相互作用的过程和结果^[1-3]. 丙型肝炎病毒(HCV)感染肝细胞之后, HCV的复制和表达过程, 即HCV的生活周期的完成, 需要有肝细胞生物大分子的参与与配合, 这是HCV等肝炎病毒相对嗜肝特性的分子生物学基础. 然而, 肝炎病毒与肝细胞之间相互作用的性质属于双向性的, 不仅肝细胞对于肝炎病毒的生活周期有影响, 肝炎病毒对于肝细胞正常的功能也产生显著的影响^[4-6]. 因此, 探索HCV对于肝细胞的影响及其机制也十分重要. HCV表达出各种各样的病毒蛋白, 通过直接或间接途径, 更多的是通过间接途径, 对于肝细胞正常的信号转导通路产生影响, 最终改变肝细胞的基因表达谱和表达水平, 这是HCV引起慢性肝炎、肝硬化、肝细胞癌(HCC)的重要的分子生物学机制所在^[7-10]. 我们曾经应用抑制性消减杂交技术、基因表达谱芯片技术, 研究了HCV各种病毒蛋白对肝细

胞基因表达谱的影响,发现 HCV 非结构蛋白 5A 反式激活基因4(NS5ATP4)基因并进行克隆化^[11].为了阐明不同生物种属来源的基因的结构关系,我们利用生物信息学(bioinformatics)技术对于小鼠和大鼠的NS5ATP4基因序列进行鉴定和分析.

1 材料和方法

人的NS5ATP4的基因克隆化,是通过构建HCV NS5A表达载体,利用基因芯片技术筛选NS5A蛋白表达时,反式调节的新型靶基因的克隆化完成的,具体见文献^[11].以人NS5ATP4的cDNA基因序列作为参照,应用BLASTn检索途径,对于美国国立卫生研究院(NIH)国立医学图书馆(NLM)生物工程学中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)进行同源基因序列的搜索,获得来源于小鼠和大鼠的同源基因序列^[12-15].将人、小鼠、大鼠NS5ATP4基因的序列进行比较,获得同源性的数据.将人、小鼠、大鼠NS5ATP4蛋白质一级结构序列的序列进行比较,获得同源性的数据.

2 结果

利用GenBank同源基因序列的搜索功能,以人的NS5ATP4作为参照,寻找并获得小鼠来源的基因序列,并命名为小鼠NS5ATP4,小鼠NS5ATP4编码基因由762 nt组成,编码产物由253 aa.小鼠NS5ATP4基因序列在GenBank中注册,登录号为:AY533135(图1).利用GenBank同源基因序列的搜索功能,以人的NS5ATP4作为参照,寻找并获得大鼠来源的基因序列,并命名为大鼠NS5ATP4,大鼠NS5ATP4编码基因由756 nt组成,编码产物由251 aa组成.大鼠NS5ATP4基因序列在GenBank中注册,登录号为:AY533136(图2).将人、小鼠、大鼠的NS5ATP4基因核苷酸序列进行同源性比较,人NS5ATP4基因和小鼠NS5ATP4基因同源性为90.29%(74/762);人NS5ATP4基因和大鼠NS5ATP4基因同源性为84.25%(120/762)图3).将人、小鼠、大鼠的NS5ATP4蛋白质一级结构序列进行同源性比较,人NS5ATP4和小鼠NS5ATP4氨基酸残基序列的同源性为95.65%(11/253);人NS5ATP4和大鼠NS5ATP4氨基酸残基序列的同源性为86.96%(33/253)图4).

```
ATG GCG TCT AGT AGT AAC TGG CTT TCT GGA
M A S S S N W L S G
GTG AAT GTC GTG CTG GTG ATG GCG TAC GGG
V N V V L V M A Y G
AGC CTG GTA TTC GTA CTG CTG TTT ATT TTT
S L V F V L L F I F
GTG AAG AGA CAA ATC ATG CGC TTT GCA ATG
V K R Q I M R F A M
AAA TCT AGA AGG GGA CCT CAT GTT CCT GTA
K S R R G P H V P V
```

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

图1 小鼠NS5ATP4基因序列及其编码产物的一级结构序列.

```
ATG GCG TCT AGT AGT AAC TGG CTG TCC GGA
M A S S S N W L S G
GTG AAT GTC GTT CTT GTG ACG GCG TAC GGG
V N V V L V T A Y G
AGC CTG GTA TTC GTA CTG CTG TTT ATT TTT
S L V F V L L F I F
```

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

人 ATGGCGTCCGGCAGTAACTGGCTCTCCGGG
小鼠 -----TA-T-----T - T--A
大鼠 -----TA-T-----G - C--A
人 GTGAATGTCGTGCTGGTGATGGCCTACGGG
小鼠 -----
大鼠 -----T - T----C---G-----
人 AGCCTGGTGTGGTACTGCTATTTATTTTT
小鼠 -----A - C-----G-----
大鼠 -----A - C-----G-----
人 GTGAAGAGGCAAATCATGCGCTTTGCAATG
小鼠 -----A-----
大鼠 -----AA-----T--
人 AAATCTCGAAGGGGACCTCATGTCCCTGTG
小鼠 -----A-----T-----A
大鼠 -----A-T-----CC-----
人 GGACACAATGCCCCAAGGACTTGAAGAG
小鼠 -----A-----
大鼠 -----A-----
人 GAGATTGATATTCGACTCTCCAGGGTTTCAG
小鼠 -----C-----A-----A
大鼠 -----C-----AG - A-----A-----
人 GATATCAAGTATGAGCCCCAGCTCCTTGCA
小鼠 -----A-----
大鼠 -----AG-G-----
人 GATGATGATGCTAGACTACTACAACCTGGAA
小鼠 -----A-C-----G - G-----
大鼠 -----A-C-----A - G---A--
人 ACCCAGGGAAATCAAAGTTGCTACAACCTAT
小鼠 -----G-----
大鼠 -----GG-----
人 CTGTATAGGATGAAAGCTCTGGATGCCATT
小鼠 -----C - A-----A-----C
大鼠 -----C - G-----A-----C
人 CGTACCTCTGAGATCCCATTTCATTCTGAA
小鼠 ---G-----G-----G-----
大鼠 ---G-----CG-----
人 GGCCGGCATCCCCGTTCCCTAATGGGCAAG
小鼠 -----C---T---T-----T---
大鼠 -----C-T-T---T-----T---
人 AATTTCCGCTCCTACCTGCTGGATCTGCGA
小鼠 -----T---A-----
大鼠 -----A-TA - xxxxxx---A-----G

图2 大鼠 NS5ATP4 基因序列及其编码产物的一级结构序列.

人	AACACTAGTACGCCTTCAAGGGTGTACGC	人	VKRQIMRFAMKSRRGPHVPVGH NAPKDLKE
小鼠	--T-----C - T-----TG--	小鼠	-----
大鼠	-----C - T-----T-----TCCA	大鼠	-----L - S----A-----
人	AAAGCACTCATTGATACCCCTTTGGATGGC	人	EIDIRLSRVQDIKYEPQLLADDDARLLQLE
小鼠	--G - C-----T - CC-----	小鼠	-----T-----
大鼠	--GA-C----C-----C - CC----C--A	大鼠	----Q-----A-----T-----K
人	TATGAAACAGCCCGCTATGGGACAGGGGTC	人	TQGNQSCYNYLYRMKALDAIRTSEIPFHSE
小鼠	-----G-----	小鼠	-----A-----A-
大鼠	-----G-----T---A-----	大鼠	---D-----A-----A-
人	TTTGCCAGAATGAGTACCTACGCTATCAG	人	GRHPRSLMGKNFRSYLLDLRNTSTPFKGVR
小鼠	-----G-----T---A-----A	小鼠	----C-----G
大鼠	-----GC-----T-G - T-----	大鼠	---LC-----xxY-----P
人	GAGGCCCTGAGTGAGCTGGCCACTGCGGTT	人	KALIDTLLDGYETARYGTGVFGQNEYLR YQ
小鼠	-----T-----T---C	小鼠	-----S-----
大鼠	xxxxxxT-----T-----T---C	大鼠	-T-----N-----S-----
人	AAAGCAxxxxxCGAATTGGGAGCTCTCAG	人	EALSELATAVKARIGSSQRHHQSAAKDLTQ
小鼠	-----xxxxxx-----A - T-----	小鼠	-----V-----Q-----
大鼠	-----GAGGCC-----C-----	大鼠	-----V-V-----R---Q-----E
人	CGACATCACCAGTCAGCAGCCAAAGACCTA	人	SPEVSPTTIQVTYLPSSQKSKRAKHFLLELK
小鼠	A----A-----	小鼠	---M-----P-----
大鼠	A----A-----T-----	大鼠	xx-M - K-----S-----P-----
人	ACTCAGTCCCCTGAGGTCTCCCAACAACC	人	SFKxxDNYNTLESTL
小鼠	-----A-----AA----A-----A	小鼠	---xx-----
大鼠	---G----GT----AA-G - G----A----	大鼠	--SSK---S---S-
人	ATCCAGGTGACATACCTCCCCTCCAGTCAG		
小鼠	-----G - T-----		
大鼠	--T-----C - G - TC-GT-C-----		
人	AAGAGTAAACGTGCCAAGCACTTCTTGAA		
小鼠	-----C-----CC-T-----G---		
大鼠	-----C-----CC-T-----C---		
人	TTGAAGAGCTTTAAGGATAACTATAACACA		
小鼠	C-----C-----		
大鼠	C-----A - C-----C-G-----		
人	TTGGAGAGTACTCTGTGA		
小鼠	C-----C-----		
大鼠	C-----CT-----		

图3 人、小鼠、大鼠NS5ATP4基因序列的比较。“x” - 缺失核苷酸;“-” - 相同核苷酸。

人	MASGSNWLSGVNVVLMAYGSLVFLLFIF
小鼠	---S-----
大鼠	---S-----T-----

人	VKRQIMRFAMKSRRGPHVPVGH NAPKDLKE
小鼠	-----
大鼠	-----L - S----A-----
人	EIDIRLSRVQDIKYEPQLLADDDARLLQLE
小鼠	-----T-----
大鼠	----Q-----A-----T-----K
人	TQGNQSCYNYLYRMKALDAIRTSEIPFHSE
小鼠	-----A-----A-
大鼠	---D-----A-----A-
人	GRHPRSLMGKNFRSYLLDLRNTSTPFKGVR
小鼠	----C-----G
大鼠	---LC-----xxY-----P
人	KALIDTLLDGYETARYGTGVFGQNEYLR YQ
小鼠	-----S-----
大鼠	-T-----N-----S-----
人	EALSELATAVKARIGSSQRHHQSAAKDLTQ
小鼠	-----V-----Q-----
大鼠	-----V-V-----R---Q-----E
人	SPEVSPTTIQVTYLPSSQKSKRAKHFLLELK
小鼠	---M-----P-----
大鼠	xx-M - K-----S-----P-----
人	SFKxxDNYNTLESTL
小鼠	---xx-----
大鼠	--SSK---S---S-

图4 人、小鼠、大鼠NS5ATP4蛋白质序列的比较。“x” - 缺失氨基酸残基;“-” - 相同氨基酸残基。

3 讨论

生物信息学的出现,改变了单纯的分子克隆技术在发现新基因中的独一无二的地位,使得目前基因克隆化的技术进入到分子克隆技术和生物学信息技术并存的状态^[16-26]。随着数据库技术及其分析技术的不断进步,生物信息学技术在分子生物学领域中的地位和作用日益受到重视。生物信息学技术正处在一个快速发展的阶段,一些生物信息学分析技术已经十分成熟,一些分析技术则处在不断的完善之中。例如不同种属生物核苷酸序列同源性的分析技术就已经相对成熟,这种核苷酸序列的同源性比对分析,不仅可以明确来源于不同生物体的同一基因的核苷酸序列的同源性,及其结构的一些特点,而且也可以用来在核苷酸序列数据库中进行数据的发掘,发现新的基因。因为在基因组计划中,世界上许多重要的实验室,构建了一系列的不同生物种属的cDNA文库和基因组DNA文库,对于不同来源的文库进行了序列测定,这些序列构成了目前核苷酸

序列数据库的一个组成部分. 这一部分文库的序列测定工作, 还必须结合其他的分子生物学分析和研究结果, 才能阐明编码基因序列及其产物的生物学功能. 因此, 在目前的核苷酸序列的数据库中还有很多发现新基因的机会. 我们应用抑制性消减杂交技术和表达谱及因芯片技术, 寻找HCV NS5A蛋白的反式激活新基因, 首先克隆了人的NS5ATP4基因^[11], 为了比较来源于不同种属生物的NS5ATP4基因序列的结构特点, 我们利用生物信息学技术克隆了小鼠和大鼠NS5ATP4基因序列, 并在GenBank中进行注册. 小鼠和大鼠NS5ATP4基因的克隆和鉴定, 再一次证明了生物信息学技术在新基因的发现和鉴定中的独特的作用和地位^[27-36]. 本结果表明, 不同种属生物的NS5ATP4的序列和结构是存在一定差别的. 首先从基因的长度来说就存在差别, 人、小鼠、大鼠NS5ATP4的cDNA序列长度分别为762 nt、762 nt、756 nt, 人与小鼠、大鼠NS5ATP4的cDNA序列的同源性分别为90.29%和84.25%. 从其结构来说, 在NS5ATP4分子结构中还存在一些位点的插入和缺失的位点.

人NS5ATP4的基因是肝细胞中存在的一种新的基因, 其结构和功能、表达与调控、分子生物学意义及其医学意义目前还不十分清楚, 目前只知道这种NS5ATP4是HCV NS5A蛋白的反式激活新基因, 但是具体的还需要进行细致的研究. 我们曾经利用基因表达谱芯片技术对于NS5ATP4的反式调节基因类型进行筛选, 在1 152个候选基因序列中, 发现12种基因的表达水平显著上调, 6种基因的表达水平显著下调^[37]. 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等基因, 如: 细胞色素P450, 肝细胞生长因子(HGF)激活因子, 谷胱甘肽过氧化酶1, 肿瘤抑制亚转移物候选物1. CD95 (CD95/APO-1)受体/CD95配体(CD95L)是调节不同细胞凋亡的关键信号转导系统. 表达水平上调的基因谷胱甘肽过氧化酶1能够阻断CD95诱导的凋亡, 保护细胞免受过氧化作用诱发的凋亡^[38-42]. 表达水平上调的基因富含半胱氨酸的血管生成诱导因子(CYR61)是生长调节因子家族成员之一, 能够与细胞外基质、细胞表面受体结合促进细胞生长、迁移. 研究者发现CYR61能够通过激活MAPK和Akt信号传导途径, 诱导胸壁肿瘤的形成及肿瘤血管化. 研究者亦发现CYR61是整合素受体的配体之一, 当配体与整合素受体结合可以介导细胞内外的信号传导, 从而激活5种与血管化有关的反应, 包括: 上皮细胞的黏附、迁移、增生、存活、血管化^[43-50]. 在下调表达的基因中, 转胶蛋白2(transgelin 2)的缺失与肿瘤的发生密切相关. 但是关于NS5ATP4的深入研究还有待于进一步进行.

4 参考文献

- 1 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒NS5A蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 2 成军. 肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制研究策略. 中西医结合肝病杂志 2003;14:321-323

- 3 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004;12:1-5
- 4 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒NS3蛋白结合蛋白. 解放军医学杂志 2003;28:31-33
- 5 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒核心抗原与金属硫蛋白相互作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:161-163
- 6 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
- 7 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活SV40病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2003;28:44-46
- 8 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 杨倩, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3与乙型肝炎病毒X蛋白协同反式激活作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:47-49
- 9 刘妍, 成军, 王建军, 陆荫英, 杨倩. 应用基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白反式调节基因. 解放军医学杂志 2003;28:55-57
- 10 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein—a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 11 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 王春花, 纪冬, 党晓燕, 张树林. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因4的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:258-259
- 12 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 13 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- 14 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 15 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 16 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:935-938
- 17 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934
- 18 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 牛丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. 中国人兽共患病杂志 2003;19:73-76
- 19 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-761
- 20 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 猪丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. 生物学杂志 2003;20:10-13
- 21 成军. 坚持相对稳定的科研方向是关键. 世界华人消化杂志 2003;11:1857-1861
- 22 成军, 李克, 王琳, 刘妍, 钟彦伟, 李莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化与序列分析. 中西医结合肝病杂志 2003;14:349-351
- 23 成军. 噬菌体表面展示技术的新发展及在病毒性肝炎研究中的应用. 解放军医学杂志 2004;29:4-7
- 24 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白. 世界华人消化杂志 2004;12:286-290
- 25 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析. 世界华人消化杂志 2004;12:291-297
- 26 成军. 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:253-257
- 27 王琳, 李克, 成军, 张健, 梁耀东, 刘妍. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因11的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:257-259

- 28 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 王春花, 党晓燕. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活基因 1 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:237-240
- 29 党晓燕, 成军, 刘妍, 邓红, 杨倩, 王建军, 纪冬, 王春花. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活基因 2 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:241-244
- 30 刘敏, 成军, 王琳, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 HCTP4 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:233-236
- 31 李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 程明亮. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP9 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:254-256
- 32 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活基因 6 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:245-247
- 33 王建军, 杨倩, 成军, 刘妍, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP6 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:251-253
- 34 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活 SV40 病毒启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;24:81-83
- 35 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896
- 36 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:951-954
- 37 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:947-950
- 38 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘连蛋白 B1 链基因表达. 世界华人消化杂志 2003;11:955-958
- 39 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;11:959-962
- 40 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:765-777
- 41 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5B 结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:768-770
- 42 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 陈天艳, 刘妍, 钟彦伟, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 结合蛋白 37 基因的克隆. 解放军医学杂志 2003;28:774-776
- 43 王春花, 郎振为, 成军, 刘妍, 王建军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 XTP8 的克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:1883-1888
- 44 王春花, 成军, 郎振为, 刘妍, 王建军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 XTP7 的克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:1878-1882
- 45 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 TAHCCP2 的克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:1893-1896
- 46 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 应用淋巴细胞表达型 cDNA 文库的酵母双杂交技术筛选白蛋白中 HCV NS3 蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:1897-1900
- 47 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP5 的克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:1901-1904
- 48 巨立中, 钟彦伟, 成军, 王建军, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP9 启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 中西医结合肝病杂志 2003;14:357-359
- 49 巨立中, 钟彦伟, 成军, 王建军, 洪源. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 HCTP4 启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 中西医结合肝病杂志 2003;14:354-356
- 50 杨倩, 成军, 洪源, 刘妍, 王建军, 党晓燕, 张树林. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 2 的克隆化研究. 中西医结合肝病杂志 2003;14:352-353

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

• 消息 •

世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003年版):2002年度世界华人消化杂志总被引频次4151,影响因子1.926,即年指标0.424,他引总引比0.45,引用刊数173,扩散因子4.2,被引半衰期2.99,地区分布数26,机构数138,国际论文比0.03,基金论文比0.27.2002年度各学科影响因子较高的3种期刊排名:世界华人消化杂志影响因子1.926,临床医学排名第2位.2002年度总被引频次较高的20种期刊排名:世界华人消化杂志总被引频次4151,排名第1位.世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊.《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊,中国科技论文统计源期刊,2001年度第一届中国百种杰出学术期刊.世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,荷兰《医学文摘库/医学文摘》,俄罗斯《文摘杂志》收录.为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展,从2005年开始,世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊,大16开,160页,每月1,15日出版,50元/期,全年24期,邮发代号82-262,北京报刊发行局发行.(世界胃肠病学杂志2004-06-15)

幽门螺杆菌外膜蛋白对 *Helicobacter pylori* 感染的诊断

姜 政, 黄爱龙, 郑 健, 陶小红, 蒲 丹, 王丕龙

姜政, 陶小红, 蒲丹, 王丕龙, 重庆医科大学第一附属医院消化科
重庆市 400016
黄爱龙, 郑健, 重庆医科大学肝炎研究所 重庆市 400010
姜政, 男, 1965-06-06, 四川省武胜县人, 汉族, 2003 年重庆医科大学博士
毕业, 副教授, 主要从事胃肠疾病的研究。
重庆市科委应用基础研究计划项目, No. [2002]18-86
国家自然科学基金资助, No. 30371318
项目负责人: 姜政, 400016, 重庆市渝中区医学院路 1 号, 重庆医科大学第
一附属医院消化内科. jiangz@mail.china.com
电话: 023-68891218
收稿日期 2004-03-20 接收日期 2004-04-13

Helicobacter pylori outer membrane proteins in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection

Zheng Jiang, Ai-Long Huang, Jian Zheng, Xiao-Hong Tao,
Dan Pu, Pi-Long Wang

Zheng Jiang, Xiao-Hong Tao, Dan Pu, Pi-Long Wang, Department of
Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical
University, Chongqing 400016, China
Ai-Long Huang, Jian Zheng, Institute of Viral Hepatitis, Chongqing
Medical University, Chongqing 400010, China
Supported by the Basic Research Fund of Science and Technology Com-
mittee of Chongqing, No.[2002]18-86; National Natural Science Foun-
dation of China, No. 30371318
Correspondence to: Dr. Zheng Jiang, Department of Gastroenterology,
the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing
400016, China. jiangz@mail.china.com
Received: 2004-03-20 Accepted: 2004-04-13

Abstract

AIM: To examine the serological response of patient with various upper gastrointestinal diseases and *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection to *H pylori* outer membrane proteins (OMP) with M_r 18 000 and 26 000 acquired by gene recombinant technique, and to determine its diagnostic significance.

METHODS: The recombinant vectors encoding OMP of *H pylori* with M_r 18 000 and 26 000 identified by restriction enzyme or PCR were used to transform and express in BL21 (DE3) *E. coli* respectively. After purification with Ni^{2+} -NTA agarose resin, the colloid gold kits were prepared with purified recombinant proteins to detect *H pylori* infection and disease associated with *H pylori* by immunity-marker technology. We selected 150 patients with *H pylori* infection and digestive symptoms without previous treatment, including chronic superficial gastritis ($n=60$), duodenal ulcer ($n=30$), gastric ulcer ($n=30$), and gastric cancer ($n=30$) during one year. Simultaneously, 33 cases without digestive symptoms and *H pylori* infection were used as controls. All sera were collected and the antibody responded to specific proteins of *H pylori* was tested with the colloid gold test kit. Taking as reference a combination of standard diagnostic methods (^{13}C urea breath test, cultivate) and the classic enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) serological tests was com-

pared with the results of this technique, and the sensitivity, specificity and accuracy of the colloid gold test were evaluated.

RESULTS: After purification with Ni^{2+} -NTA agarose resin, the purities of recombinant fusion proteins were all about 95%. The ELISA results showed that recombinant fusion proteins could be recognized by monoclonal antibody of anti-*H pylori* with M_r 18 000 and 26 000 respectively. The results detected using colloid gold kits were as follows: all patients' sera infected with *H pylori* showed response to recombinant protein with M_r 26 000 were 94.0%, while 95.0%, 96.7%, 96.7% and 90.0% of patients with *H pylori*-infected chronic superficial gastritis, duodenal ulcer, gastric ulcer, and gastric cancer respectively, showed responses. Compared with the serum-based ELISA results in detecting *H pylori*-infection, there was no significant difference with the colloid gold kits ($P > 0.05$). The sensitivity, specificity, and accuracy of the rapid test kit with M_r 26 000 protein were 94.0%, 97.0%, and 94.5%, respectively; To recombinant protein with M_r 18 000, 52.0%, 40.0%, 40.0%, 53.3% and 86.7%, of patients with *H pylori*-infected chronic superficial gastritis, duodenal ulcer, gastric ulcer, and gastric cancer respectively, showed responses. There were a significant difference ($P < 0.05$) in the detecting rates of *H pylori* infection between gastric cancer (86.7%) and the other diseases (43.3%). The results showed the colloid gold kits with M_r 26 000 proteins of *H pylori* could be used as a conventional examination method, with similar sensitivity and specificity as other conventional examination method, and simultaneously a significant association was found between the serologic response to M_r 18 000 OMP antigen and malignant outcome of *H pylori* infection.

CONCLUSION: The two colloid gold kits with M_r 18 000 and 26 000 proteins of *H pylori*, can be a useful tool for detecting *H pylori* infection, as well as predicting *H pylori* related gastrointestinal diseases, such as gastric malignancy and peptic ulcer.

Jiang Z, Huang AL, Zheng J, Tao XH, Pu D, Wang PL. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1588-1592

摘要

目的: 通过检测伴有 *H pylori* 感染的上消化道疾病患者血清对 *H pylori* OMP 的反应性, 来探讨基因重组 *H pylori* OMP 对 *H pylori* 感染及其相关性疾病的诊断价值, 为进一步开发诊断试剂盒及其临床应用奠定基础。

方法: 分别将已鉴定、测序的含 *H pylori* M_r 为 18 000, 26 000 OMP 重组质粒转化表达菌 - 大肠杆菌 BL21 中, 让其大量表达、纯化, 制备金标免疫检测试纸; 选择 2002-01/2002-12 因消化道症状来我院就诊的 *H pylori* 阳性患者 150 例, 经胃镜证实: 慢性浅表性胃炎 60 例;

胃溃疡 30 例; 十二指肠球部溃疡 30 例; 胃癌 30 例, 以及 33 例 H pylori 阴性的健康者作为对照, 分别采用以 H pylori M_r 为 18 000, 26 000 OMP 为抗原制备金标免疫检测试纸, 对 183 例受试者血清进行特异性抗体检测。

结果: 重组蛋白经 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖树脂纯化后, 其纯度高达 95% 以上, 经检测其抗原性良好。用金标免疫试纸对 H pylori 感染的上消化道疾病患者 150 例, 以及 H pylori 阴性的健康者 33 名进行了检测, 其结果为: 26 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率为 94.0%, 对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡以及胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 95.0%, 96.7%, 96.7% 和 90.0%, 与常规 ELISA 方法检测结果相比, 二者无显著性差异(χ^2 检验, $P > 0.05$), 其敏感性、特异性和准确性分别为 94.0%、97.0%、94.5%; 而 18 000 OMP 对 H pylori 感染患者的检出率为 52.0%, 对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡和胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 40.0%、40.0%、53.3% 和 86.7%, 对胃癌患者中 H pylori 感染检出率 86.7% 与慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡总检出率 43.3% 相比, 具有显著的差异性($P < 0.05$)。因此以 26 000 OMP 的金标免疫检测试纸可以作为 H pylori 感染的常规检测方法, 他与常规 ELISA 检测方法相比具有可靠的特异性以及敏感性, 同时与 18 000 OMP 金标免疫检测试纸一起, 对胃癌患者中 H pylori 感染检出率高对胃肠道肿瘤特别是胃癌的诊断及预测方面具有独特之处, 这值得进一步的研究。

结论: H pylori M_r 18 000, 26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染及其相关性疾病, 尤其对消化道恶性肿瘤的诊断及预测具有重要的价值, 可以作为常规检测手段对消化道溃疡及肿瘤高危人群进行检测。

姜政, 黄爱龙, 郑健, 陶小红, 蒲丹, 王丕杰. 幽门螺杆菌外膜蛋白对 Helicobacter pylori 感染的诊断. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1588-1592
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1588.asp>

0 引言

自 1983 年 Marshall 和 Warren 从慢性活动性胃炎患者的胃黏膜中分离出 H pylori 之后, H pylori 与上胃肠道疾病之间的关系受到消化学界和微生物学界的极大关注。我国普通人群的感染率为 50-80%^[1], 每年新增感染人数近千万。H pylori 感染不但与 B 型胃炎、消化性溃疡、MALT 淋巴瘤、胃癌的发生有密切关系^[2-13], 而且与肠外疾病的发生也有重要作用^[14-16], 在动物实验中已证明 H pylori 的致癌性^[17], 世界卫生组织已明确指出 H pylori 为第一类致癌因子。因此对 H pylori 感染的诊断及其治疗显得十分必要。

常规诊断方法有着各自的适应范围和特点^[18-23]。鉴于 ELISA 可同时处理大量标本, 适合流行病学调查、研

究等特点, 应用较为广泛^[24]。目前 H pylori 血清 ELISA 抗原主要采用 H pylori 的培养所得, 由于 H pylori 培养条件比较苛刻, 需要用特殊的厌氧培养设备, 不易获得大量的有效抗原成分; 而基因重组的纯化抗原, 目前 H pylori 多种 OMP 基因已被克隆, 并在大肠杆菌中得到了成功表达^[25-30], 但低分子 OMP 应用于 H pylori 的诊断, 目前国内外很少报道。为了获得大量的纯化 H pylori 低分子的 OMP 抗原, 我们采用了基因重组技术, 分别构建了 H pylori M_r 为 18 000, 26 000 OMP 编码基因重组载体, 并在大肠杆菌中得到了高效表达, 对其抗原性进行了鉴定^[31-34]。因此我们将纯化的重组融合 OMP 用于以抗原抗体反应及胶体金标记技术为基础的金标免疫检测试纸, 对 H pylori 感染及其相关疾病的诊断价值进行了研究如下。

1 材料和方法

1.1 材料 BL21/pET32a(+)/Omp₂₆, BL21/pET32a(+)/Omp₁₈ 和 H pylori 18 000, 26 000 低 M_r OMP mAb 由本实验室构建、鉴定; 收集 2002-01/2002-12 上消化道症状就诊 H pylori 阳性患者血清 150 例, 以及 H pylori 阴性健康者血清 33 名, 要求所有受试者在 4 wk 内未服用抗生素、糖皮质激素、 H_2 受体拮抗剂以及质子泵抑制剂。¹³C 尿素呼吸实验由海德威公司提供; 金标免疫检测试纸(分别以 H pylori M_r 为 18000, 26 000 OMP 制作金标免疫检测试纸, 由肝炎所提供); Ni^{2+} -NTA 多聚组氨酸蛋白纯化试剂盒为 QIAGEN 产品; 超声破碎液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH 7.0); 洗涤液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L 的 NaCl, 20 mmol/L imidazole, pH7.8); 洗脱液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , imidazole 300 mmol/L 的 NaCl, 250 mmol/L Imidazole, pH7.8)由肝炎研究所提供。

1.2 方法 将酶切、PCR 鉴定的重组载体转化大肠杆菌 BL21, 随后分别挑选含重组载体 pET32a (+)/Omp₁₈ 和 pET32a(+)/Omp₂₆ 的单克隆菌落于盛有 2 mL LB 培养基的各试管中(含氨苄青霉素 100 mg/L), 于 37 °C, 250 r/min 培养过夜, 次日将过夜培养液加入盛有 100 mL LB(含氨苄青霉素 100 mg/L)、容积为 500 mL 的三角瓶中, 各培养 500 mL 细菌液, 于 37 °C 培养至 A_{600} 为 0.4-0.6 时, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 4 h, 以 4 °C, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 于 -20 °C 冻存备用; 由于重组载体表达的融合蛋白质 C 端带有 6 聚组氨酸, 故表达产物用 Ni^{2+} -NTA 树脂纯化。分别制备 500 mL 细菌培养液, 离心, 菌体混悬于 50 mL 超声破碎液中, 在 35% × 600 W 低温条件下, 超声破碎 40 min, 以 4 °C, 10 000 r/min 离心 15 min, 将上清液按常规方法过滤柱子(Ni^{2+} -NTA agarose), 以 10 mL 洗涤液洗脱 2 次, 然后以 10 mL 洗脱液洗脱并分 3 段收集过滤液, 分别取 3 段收集液 10 μ L 以等量 2 × 蛋白上样缓冲液混匀, 煮沸 5 min, 进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳。同时

采用相应的单克隆抗体以及免疫的动物血清，以 Western blot 方法检测表达的目的蛋白的生物活性。同时进行蛋白质含量的检测；H pylori 外膜蛋白金标免疫检测试验是采用高度特异性的抗原抗体反应及胶体金标记技术，通过双抗原夹心法(抗原 - 抗体 - 抗原)，实现对 H pylori 抗体特异检测。即：将重组 H pylori 抗原包被在反应膜 - 硝酸纤维素膜上作为检测带，同时将重组 H pylori 抗原标记上胶体金作为显色剂，利用双抗原夹心法原理，一步检测血清样品中的 H pylori 抗体。关于金标免疫检测试纸组装示意图如图 1 所示。其结果判断标准为：阴性(-)，表示出现一条紫红色条带，位于质控区(C)内。如样本中不含特定的 H pylori 抗体蛋白，胶体金抗体在层析过程中不会被固定在膜上检测带内的单抗免疫，因而测试区内(T)不会出现一条紫红色检测带。质控区内(C)所显现的紫红色条带是判定是否有足够的样品液，层析过程是否正常的标准，同时也作为试剂的内控标准。阴性结果表明，待测样品中不含 H pylori 抗体蛋白；阳性(+)则表示质控区(C)出现一条紫红色条带，同时在测试区(T)内也出现一条紫红色条带。如果待测样品中 H pylori 抗体蛋白浓度高于其检测阈值时，抗原免疫金与检测带上的另一单抗结合，因此在测试区内(T)出现紫红色检测带。阳性结果表明，特定 H pylori 抗体蛋白含量在阈值以上；无效则是在质控区(C)未出现紫红色条带，表明不正确的操作过程(图 2)；所有受试者经 ¹³C 呼吸试验、细菌学培养上述检查方法中，任意一种检测为阳性，被确定为 H pylori 感染；而前二种检测手段中任意一种检测为阴性，说明该患者无 H pylori 的感染。若 H pylori 感染患者，H pylori OMP 金标免疫检测为阴性，则视为假阴性；若无 H pylori 感染患者，H pylori OMP 金标免疫检测出现阳性，则视为假阳性，以此来判断 H pylori OMP 金标免疫检测试纸在临床中的应用价值。

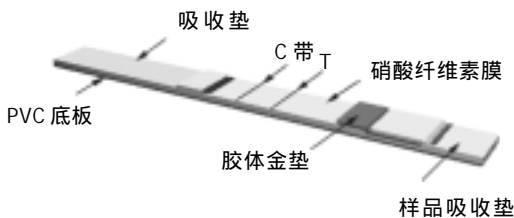


图 1 金标免疫检测试纸组装示意图

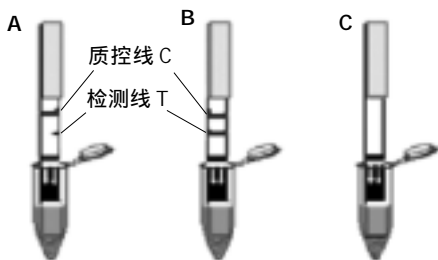


图 2 H pylori 外膜蛋白金标试纸检测示意图。A: 阴性; B: 阳性; C: 无效。

2 结果

2.1 重组融合蛋白的质和量 分别收集BL21/pET32a (+)/Omp₁₈ 和 BL21/pET32a(+)/Omp₂₆ 菌体，进行 15% SDS-PAGE，结果发现，经 IPTG 诱导后，融合蛋白的表达量分别占菌体总蛋白的 18.96%，26.38%。同时分别将 LB 培养基制备的大量细菌混悬于超声破碎液中，在 35% × 600 W 低温条件下，超声破碎 40 min，以 4 10 000 r/min 离心 15 min，将上清液按常规方法过柱 (Ni²⁺-NTA agarose resin)，以洗涤液洗涤 2 次，然后洗脱液洗脱，并分 3 段收集，分别取 3 段收集液 20 μL 以等量 2 × 蛋白上样缓冲液混匀，煮沸 5 min，以 150 g/L SDS-PAGE 进行凝胶电泳，通过染色、脱色，可见大部分目的蛋白在第 2 段收集液中，通过 Image Master Totallab v1.11 软件进行凝胶自动扫描分析，分别获得了纯度达 95% 以上的 1.25 g/L 的重组融合蛋白，其 M_r 为 3 8000，46 000 的融合蛋白，其中 M_r 20 000 的蛋白为 pET32a(+) 所表达。目的蛋白能够被相应 H pylori M_r 为 18 000，26 000 的 OMP mAb 以及免疫的动物血清所识别，说明表达的目的蛋白的生物活性良好。

2.2 金标免疫检测 H pylori 感染 对 H pylori 感染的上消化道疾病患者 150 例，以及 H pylori 阴性的健康者 33 名进行了金标免疫试纸检测，其结果为：26 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率为 94.0%，对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡以及胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 95.0%，96.7%，96.7% 和 90.0%，与常规的 ELISA 检测方法相比，二者无显著性差异(χ² 检验，P >0.05)，其敏感性、特异性和准确性分别为 94.0%，97.0%，94.5%；而 18 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率为 52.0%，对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡和胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 40.0%，40.0%，53.3% 和 86.7%，对胃癌患者中 H pylori 感染检出率 86.7% 与慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡总检出率 43.3% 相比，具有显著的差异性(P <0.05，表 1-2)。分别采用 M_r 18 000，26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染检测结果比较(见图 3)。

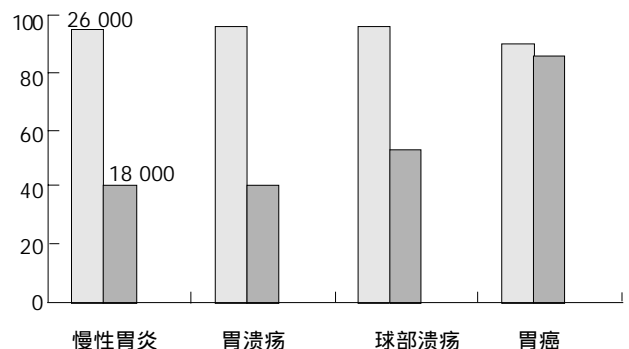


图 3 M_r 18 000，26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染检测结果比较。

表1 Mr 18 000, 26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染检测的结果

试验方法	受试者例数	阳性	阴性	假阳性	假阴性
ELISA	183	144	32	1	6
26 000 胶体金	183	141	32	1	9
18 000 胶体金	183	78	33	0	72

表2 Mr 18 000, 26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染检测的结果

试验方法	受试者例数	年龄	阳性	阴性
Mr 26 000 OMP				
慢性浅表性胃炎	60	50.3±15.9	57	3
胃溃疡	30	57.3±13.2	29	1
十二指肠球部溃疡	30	46.5±14.2	29	1
胃癌	30	64.7±17.4	27	3
Mr 18 000 OMP				
慢性浅表性胃炎	60	50.3±15.9	24	36
胃溃疡	30	57.3±13.2	12	18
十二指肠球部溃疡	30	46.5±14.2	16	14
胃癌	30	64.7±17.4	26	4

3 讨论

所有 H pylori 都表达 Mr 18 000、26 000 外膜蛋白, 而且与其他菌群的外膜蛋白无交叉反应^[33]. 我们在大肠杆菌中表达了完整的 H pylori Mr 18 000, 26 000 OMP, 经 Western-blot 鉴定, 有很强的抗原性. 分别将重组蛋白作为抗原, 采用高度特异性的抗原-抗体反应及胶体金标记技术, 通过双抗原夹心法(抗原-抗体-抗原), 一步检测血清样品中的 H pylori 抗体, 建立检测 H pylori 特异性 IgG 的金标免疫检测试纸, 从而实现了 H pylori 特异抗体的检测. 我们通过 Ni²⁺-NTA agarose resin, 将重组蛋白进行纯化, 并且将蛋白浓度调整到 1 g/L, 同时将胶体金的颗粒直径调整到 40-60 nm, 并将抗体的浓度调至最佳, 获得稳定性的胶体金标记物以及满意的实验效果.

本实验我们选择了 H pylori 感染的上消化道疾病患者 150 例, 以及 H pylori 阴性的健康者 33 名作为对照, 金标免疫检测试验结果为: 26 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率为 94.0%, 对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡以及胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 95.0%, 96.7%, 96.7% 和 90.0%, 与常规的 ELISA 检测方法相比, 二者无显著差异(χ^2 检验, $P > 0.05$), 其敏感性、特异性和准确率分别为 94.0%, 97.0%, 94.5%; 而 18 000 OMP 对 H pylori 感染患者的检出率为 52.0%, 对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡和胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 40.0%, 40.0%, 53.3% 和 86.7%, 对胃癌检出率 86.7% 与慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡总检出率 43.3% 相

比, 具有显著的差异性($P < 0.05$). 因此以 26 000 OMP 的金标免疫检测试纸可以作为 H pylori 感染的常规检测方法, 与常规的检测方法相比具有可靠的特异性以及敏感性, 同时与 18 000 OMP 金标免疫检测试纸一起, 在胃肠道肿瘤的诊断和预测方面具有独特之处, 这值得进一步的研究, 上述结果与文献^[35]报道一致. 据 Raymond et al 报道, 以免疫印迹方法检测 H pylori 血清抗体, 发现对 H pylori Mr 26 000 OMP 抗原敏感性 89.4%, 特异性 87.9%, 正确率为 88.7%; 同时 Shiesh et al 报道, H pylori 阳性患者的血清对 H pylori 低分子量 OMP 116 000 (CagA), 89 000 (VacA), 60 000 (Hsp), 45 000, 35 000, 30 000, 26 500 和 19 500 的反应性分别为 76.5%, 42.9%, 23.6%, 46.7%, 84.1%, 76.5%, 82.9% 和 32.4%, 同时提出 H pylori 低分子量 OMP 19 500, 26 500 对上消化道溃疡、恶性肿瘤的高危人群可以作为有效的检测抗原.

研究发现表明, 虽然所有的 H pylori 菌株都能表达 Mr 为 18 000, 26 000 的 OMP, 刺激机体产生相应的抗体, 但抗体的产生与抗原分子大小、机体的免疫状态等诸多因素有关, 而且抗体滴度的衰减与相应抗体分子大小等密切相关, 本实验结果也表明, 26 000 OMP 对 H pylori 感染患者的阳性检出率(86.7%)明显高于 18 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率(52%); 而胃癌的发生是一个多因素、多阶段的过程, 在慢性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌这样一个漫长的过程中, 各种致病因子可能单独或协同作用于癌变的起始阶段, 实验结果也表明 18 000 OMP 对胃癌的 H pylori 感染的检出率(86.7%)与 26 000 OMP 对胃癌的 H pylori 感染的检出率(90.0%)几乎一致, 综上所述, Mr 为 18 000, 26 000 的 OMP 不仅可作为检测 H pylori 感染的一种标志性抗原, 同时对胃癌以及胃癌高发人群的筛选具有重要的价值.

总之, 用 OMP 作为抗原而建立的金标免疫检测试验用于检测抗 H pylori IgG 抗体是可行的. 该方法体现了快速、简单以及无痛苦, 具有可靠的特异性, 而且与其他检测方法相比, 具有对胃癌患者 H pylori 感染检出率高对胃肠道肿瘤特别是胃癌的诊断及预测方面具有独特之处.

4 参考文献

- Chen M, Chen J, Liao W, Zhu S, Yu J, Leung WK, Hu P, Sung JJ. Immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing catalase in protection against gastric *Helicobacter pylori* infection in mice. *Helicobacter* 2003;8:613-625
- Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:734-739
- Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, Takeshita M, Hizawa K, Kawasaki M, Yao T, Tsuneyoshi M, Iida M, Fujishima M.

- Predictive value of endoscopic ultrasonography for regression of gastric low grade and high grade MALT lymphomas after eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001; 48:454-460
- 4 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789
- 5 Kate V, Ananthkrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies. *Br J Surg* 2001;88: 1054-1058
- 6 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 7 Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, Siepman NY, Sugg JE, Hopkins RJ. *Helicobacter pylori* and early duodenal ulcer status post-treatment: a review. *Helicobacter* 2001;6:84-92
- 8 Hurenkamp GJ, Grundmeijer HG, Van Der Ende A, Tytgat GN, Assendelft WJ, Van Der Hulst RW. Arrest of chronic acid suppressant drug use after successful *Helicobacter pylori* eradication in patients with peptic ulcer disease: a six-month follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1047-1054
- 9 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:734-739
- 10 Morgner A, Miehleke S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol* 2001;19:2041-2048
- 11 Rieder G, Hofmann JA, Hatz RA, Stolte M, Enders GA. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori*-associated gastritis may represent an increased risk factor to develop gastric carcinoma of the intestinal type. *Int J Med Microbiol* 2003;293:403-412
- 12 Brenner H, Arndt V, Stegmaier C, Ziegler H, Rothenbacher D. Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am J Epidemiol* 2004;159:252-258
- 13 Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003;125:1636-1644
- 14 Ojetti V, Armuzzi A, De-Luca A, Nucera E, Franceschi F, Candelli M, Zannoni GF, Danese S, Di-Caro S, Vastola M, Schiavino D, Gasbarrini G, Patriarca G, Pola P, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* infection affects eosinophilic cationic protein in the gastric juice of patients with idiopathic chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:66-72
- 15 Emilia G, Longo G, Luppi M, Gandini G, Morselli M, Ferrara L, Amari S, Cagossi K, Torelli G. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001;97:812-814
- 16 Choe YH, Kwon YS, Jung MK, Kang SK, Hwang TS, Hong YC. *Helicobacter pylori*-associated iron-deficiency anemia in adolescent female athletes. *J Pediatr* 2001;139:100-104
- 17 Crabtree JE, Court M, Aboshkiwa MA, Jeremy AH, Dixon MF, Robinson PA. Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Pathol* 2004;202:197-207
- 18 Chua TS, Fock KM, Teo EK, Ng TM. Validation of 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in the Singapore population. *Singapore Med J* 2002;43:408-411
- 19 Kawai T, Kawakami K, Kudo T, Ogiyama S, Handa Y, Moriyasu F. A new serum antibody test kit (E plate) for evaluation of *Helicobacter pylori* eradication. *Intern Med* 2002;41: 780-783
- 20 Day AS, Sherman PM. Accuracy of office-based immunoassays for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter* 2002;7:205-209
- 21 Oyedede KS, Smith SI, Arigbabu AO, Coker AO, Ndububa DA, Agbakwuru EA, Atoyebi OA. Use of direct Gram stain of stomach biopsy as a rapid screening method for detection of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer and gastritis patients. *J Basic Microbiol* 2002;42:121-125
- 22 Wong WM, Wong BC, Tang VS, Lai KC, Yuen ST, Leung SY, Hu WH, Lam SK. An evaluation of the PyloriTek test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Chinese patients before and after eradication therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:976-980
- 23 Fujisawa T, Kaneko T, Kumagai T, Akamatsu T, Katsuyama T, Kiyosawa K, Tachikawa T, Kosaka O, Machikawa F. Evaluation of urinary rapid test for *Helicobacter pylori* in general practice. *J Clin Lab Anal* 2001;15:154-159
- 24 Miwa H, Akamatsu S, Tachikawa T, Sogabe T, Ohtaka K, Nagahara A, Sugiyama Y, Sato N. On-site diagnosis of *H pylori* infection by urine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:95-97
- 25 Yan J, Liang SH, Mao YF, Li LW, Li SP. Construction of expression systems for flaA and flaB genes of *Helicobacter pylori* and determination of immunoreactivity and antigenicity of recombinant proteins. *World J Gastroenterol* 2003;9:2240-2250
- 26 Liu X, Hu J, Zhang X, Fan D. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease B subunit. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1513-1516
- 27 Bai Y, Li LR, Wang JD, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity. *World J Gastroenterol* 2003;9:2711-2714
- 28 Yan J, Mao YF. Construction of a prokaryotic expression system of vacA gene and detection of vacA gene, VacA protein in *Helicobacter pylori* isolates and ant-VacA antibody in patients' sera. *World J Gastroenterol* 2004;10:985-990
- 29 Mao YF, Yan J. Construction of prokaryotic expression system of ureB gene from a clinical *Helicobacter pylori* strain and identification of the recombinant protein immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10:977-984
- 30 Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M,1 8 000 OMP from *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2003;9:1756-1761
- 31 Jiang Z, Huang A, Wang P. Gene cloning and expression of outer membrane protein of *Helicobacter pylori*. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:1416-1419
- 32 Jiang Z, Tiao XH, Huang AL, Wang PL. A study of recombinant protective *H pylori* antigens. *World J Gastroenterol* 2002;8:308-311
- 33 Jiang Z, Pu D, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction, expression and antigenic study of bivalent vaccine candidate with 26,000 OMP and heat shock protein A of human *Helicobacter pylori*. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:862-867
- 34 Bode G, Piechotowski I, Rothenbacher D, Brenner H. *Helicobacter pylori*-specific immune responses of children: implications for future vaccination strategy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9: 1126-1128
- 35 Chua TS, Fock KM, Chan YH, Dhamodaran S, Sim CS, Ng TM, Teo EK. Seroreactivity to 19.5-kDa antigen in combination with absence of seroreactivity to 35-kDa antigens is associated with an increased risk of gastric adenocarcinoma. *Helicobacter* 2002;7:257-264

广东潮阳地区海尔曼螺杆菌感染与食管疾病的相关性研究

周志韶, 马澄城, 廖赞豪, 赵毅, 郑永雄, 潘文雄, 黄盛宜

周志韶, 马澄城, 廖赞豪, 赵毅, 郑永雄, 潘文雄, 黄盛宜, 大峰医院病理科, 消化内科 广东省潮阳市 515154
周志韶, 男, 1932-01-06 生, 山东省荣成县人, 汉族. 1962 年第七军医大学本科毕业, 南京军区南京总医院、南京大学医学院临床学院主任医师, 汕头大学医学院客座教授, 中国抗癌协会淋巴瘤委员会委员, 中国癫痫外科协会理事. 主要从事消化、神经、淋巴等系统的病理研究, 有专著 2 本(主编、副主编), 参与专著编写 6 本, 发表论文 98 篇, 获国际、国家、军队和省市科技进步二、三、四等奖共 30 项. 现受聘于大峰医院.
项目负责人: 周志韶, 515154, 广东省潮阳市大峰医院病理科, 消化内科.
电话: 0661-2256686 传真: 0661-2256686
收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-03-24

Relationship between *Helicobacter heilmannii* infection and esophageal diseases in Chaoyang, Guangdong Province, China

Zhi-Shao Zhou, Cheng-Cheng Ma, Zhan-Hao Liao, Yi Zhao, Yong-Xiong Zheng, Wen-Xiong Pan, Cheng-Yi Huang

Zhi-Shao Zhou, Cheng-Cheng Ma, Zhan-Hao Liao, Yi Zhao, Yong-Xiong Zheng, Wen-Xiong Pan, Cheng-Yi Huang, Department of Pathology and Digestive Medicine, Dafeng Hospital, Chaoyang 515154, Guangdong Province, China
Correspondence to: Dr. Zhi-Shao Zhou, Department of Pathology, Dafeng Hospital, Chaoyang 515154, Guangdong Province, China.
Received: 2004-01-09 Accepted: 2004-03-24

Abstract

AIM: To study the relationship of *Helicobacter heilmannii* (Hh) infection with esophageal diseases in Chaoyang, Guangdong Province, China.

METHODS: A total of 92 cases of endoscopic biopsies and esophagostomies were collected. Hh and *Helicobacter pylori* (*Hp*) infection were detected by Warthin-Starry silver stain.

RESULTS: Among 92 cases, 43 cases were Hh positive (46.74%), 32 cases were *Hp* positive (37.78%), and mixed infection with Hh and *Hp* were detected in 12 cases (13.04%). Among 43 Hh positive cases, there were 19 cases of esophageal carcinoma, 14 esophagocardiac adenocarcinoma, 3 esophageal ulcers, 4 epithelial hyperplasia, 1 esophagitis and 1 Barrett' esophagitis. Following-up data showed that 16 patients had a history of raising dogs, swines or cats, in which Hh infection were found in 10.23 patients denied having a history to contact the animals mentioned above, in which 8 cases were Hh positive.

CONCLUSION: Hh infection has a close connection with esophageal carcinoma, cardiac adenocarcinoma and epithelial hyperplasia, and may be a high risk factor for those diseases in the area. The pathogenesis of the disease may be related to domestic animal raising.

Zhou ZS, Ma CC, Liao ZH, Zhao Y, Zheng YX, Pan WX, Huang CY. Relationship between *Helicobacter heilmannii* infection and esophageal diseases in Chaoyang, Guangdong Province, China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1593-1595

摘要

目的: 探讨广东省潮阳地区海尔曼螺杆菌(*Helicobacter Heilmannii*, Hh)感染与食管疾患的关系。

方法: 集我院内镜活检标本和连有部分食管的胃切除标本, 共 92 例. 以 Warthin-Starry 银染色, 镜检 Hh 和幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, Hp). 结果与临床和病理结果对比分析。

结果: 92 例共检出 Hh(+)者 43 例, 占 46.74%, Hp(+)者 32 例, 占 37.78%, 二者混合感染者 12 例, 占 13.04%. 43 例 Hh (+)者中: 食管癌 19/33 例(占本组的 20.65%, 占该疾病的 57.58%, 下同), 食管贲门腺癌 14/22 例(15.22%, 63.64%), 食管溃疡 3/11 例(3.26%, 27.27%), 食管上皮增生 4/8 例(4.35%, 50.0%), 食管炎 1/3 例(1.09%, 33.33%), 食管平滑肌瘤 1/2 例(1.09%, 50.0%), Barrett 食管 1/1 例(1.09%, 100%). 随访家中养有猪狗猫或其中之一者 16 例, Hh(+)者 10 例(62.5%), 未养上述动物者 23 例, 其中 Hh(+)者 8 例(34.78%).

结论: 食管 Hh 感染明显与食管癌、食管贲门腺癌、食管上皮增生等相关, Hh 感染可能是潮阳地区上述疾病高发的重要因素之一, 感染又可能与该地区普遍养有猪狗猫等动物有关。

周志韶, 马澄城, 廖赞豪, 赵毅, 郑永雄, 潘文雄, 黄盛宜. 广东潮阳地区海尔曼螺杆菌感染与食管疾病的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(7): 1593-1595

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1593.asp>

0 引言

海尔曼螺杆菌是新发现的胃内另一种螺杆菌, 有关其与相关疾病的关系, 报告较少, 而与食管疾病的关系, 几乎无报告. 本文试图通过螺杆菌感染这个侧面, 探讨粤东地区食管疾病高发与之可能的关系。

1 材料和方法

集我院 1999-01/2001-01 期间, 内镜食管活检或胃活检同时取有食管及手术切除胃标本同时连有食管者, 共 92 例. 标本甲醛固定, 石蜡包埋, HE 染色, 同时以连续切片作 Warthin-Starry 银染色(均设阳性对照),

高倍镜或油镜下观察 Hh 和 Hp 感染状况，以食管检出阳性为难，胃检出阳性食管未检出者未列入。同时复习病史和 HE 切片，39 例随访了家中有否养有猪狗猫等动物。结果与临床及病理结果对比分析。

2 结果

2.1 临床概况 男 59 例，女 33 例，男 女=1.79 1，最大年龄 83 岁，最小年龄 17 岁，平均年龄 55.4 岁，

年龄分布见表 1。

2.2 螺杆菌检出率及其与食管疾病的关系 92 例中 Hh(+) 者 45 例(48.91%)，Hp(+) 者 32 例(34.78%)，Hh 与 Hp 混合感染者 12 例(13.04%)。螺杆菌感染与年龄分布，见表 1。从表 1 可以看出 Hh 感染 51 岁以上者占 66.67%，61 岁以上占 48.89%。螺杆菌感染与食管疾病的关系，见表 2，从表 2 可以看出 Hh 感染明显与食管癌(主要为鳞癌)、食管贛门腺癌和食管上皮增生等病变相关。

表 1 螺杆菌感染的年龄分布

年龄段(岁)	20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71	合计
例数	1	3	11	17	17	26	17	92
Hh (+)数	1	1	6	7	8	11	11	45
Hp (+)数			5	6	7	6	8	32
二者均(+)数			2	2	3	2	3	12

表 2 食管疾病与螺杆菌检出率

疾病	n	Hh (+)数(%)	Hp (+)数(%)	二者均(+)数(%)	继发霉菌感染
食管癌(鳞癌为主)	33	19 (57.58)	9 (27.27)	5 (15.15)	8
食管贛门腺癌	22	14 (63.64)	11 (50)	2 (9.09)	2
食管溃疡	11	3 (27.27)	5 (45.45)	2 (18.18)	1
食管上皮增生	8	4 (50)	3 (37.5)	2 (25)	
慢性胃炎顺取食管	4	2 (50)			
食管炎	3	1 (33.33)	1 (33.33)	1 (33.33)	
食管胃黏膜异位	3		3 (100)		
食管“平肉”	2	1 (50)			
Barrett 食管	1	1 (100)			

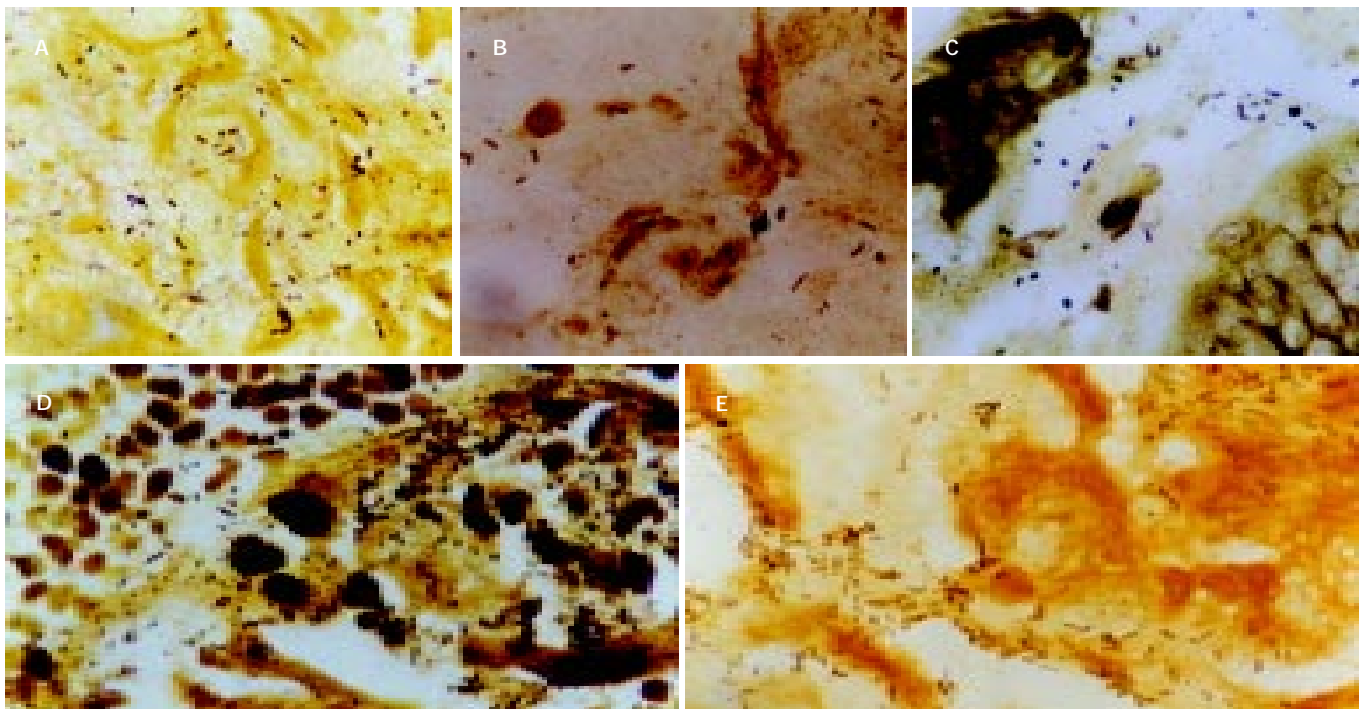


图 1 广东潮阳地区海尔曼螺杆菌感染与食管疾病的相关性研究。A - D: 示海尔曼螺杆菌。Warthin - Starry 银染色 ×7 425; E: 示幽门螺杆菌。Warthin - Starry 银染色 ×7 425。

另有胃体癌顺取食管2例, 食管血管畸形、食管淋巴瘤和贲门癌术后食管溃疡各1例, 共5例, 均未检出螺杆菌。

2.3 Hh感染与家养有关动物的关系 随访家养猪狗猫或其中之一者16例, Hh(+)者10例(62.50%), Hp(+)者5例(31.25%), Hh和Hp均(+)者3例(18.75%)。未养上述动物者23例, 其中Hh(+)者8例(34.78%), Hp(+)者11例(47.83%), Hh、Hp均(+)者2例(8.70%)。养动物者Hh感染明显高于未养者。

3 讨论

Hh是Dent et al^[1]于1987年发现的定植于胃的不同于Hp的另一株螺杆菌, 已有报告其感染率明显低于Hp, 但我国南方的感染明显高于国外^[2]。现今认为他与消化性溃疡(Pu)、胃癌、胃黏膜相关淋巴瘤(MALT-ML)和活动或非活动性胃炎等密切相关^[2-12]。但其在食管的检出及其与食管疾患的关系, 几乎无报告。Debonnie et al^[13]曾报告1例食管炎活检检出Hh; Queiroz et al^[14]对猪的研究发现Hh强有力的与自然发生于猪的部分食管溃疡和溃疡前病变伴行, 并伴有相应部位的炎症, 作者认为Hh在这些病变的发病机制上是一个重要因素; Roosendaal et al^[15]对猪的研究也发现Hh和猪的胃溃疡及部分食管溃疡相关, 也认为Hh在猪食管病变的发生上是一个重要因素。本组结果显示Hh在食管疾病的检出率高达48.91%, 且主要见于老年人, 61岁以上者占48.89%, 并且明显与一些食管疾患相关, 尤其是食管癌和食管上皮增生, 分别达57.58%和50%, 而食管贲门腺癌竟高达63.64%。这明显提示Hh是这些疾病发生的一个重要因素, 也说明潮阳地区食管癌、食管贲门腺癌等高发与Hh的高检出率不无关系, 可能是一个不可忽视的重要因素。现今认为, Hh感染来源于某些动物, 尤其家养食肉动物和观赏动物, 如猪狗猫等, 他们被认为是Hh的自然宿主, 是传染给人类的贮存库和危险的感染源^[8,10,16-18], 而潮阳地区家养猫猪狗等相当普遍, 在农村猪为放养, 是具有感染Hh的环境条件的, 当然也不能忽视人到人这一可能的传播途径。故在潮阳地区消化道疾病的防治上, 根除螺杆菌的传播应予重视, 并应从人和动物两方面着手。已有报告证实抗Hp治疗方案对Hh有效^[7,9,11,18-19]。

4 参考文献

1 Dent JC, McNulty CAM, Uff JC, Wilkinson SP, Gear MWL. Spiral organisms in the gastric antrum. *Lancet* 1987;2:96

- 2 周志韶, 马澄城, 廖赞豪, 赵毅. 粤东潮汕地区海尔曼螺杆菌感染的研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:497-499
- 3 马澄城, 周志韶, 赵毅, 黄进, 孙桂勤. 粤东潮汕地区胃内螺杆菌感染与上消化道疾病的相关性研究. *临床消化病杂志* 2000;12(增刊):3-6
- 4 廖赞豪, 周志韶, 赵毅. 消化性溃疡与螺杆菌关系的临床病理研究. *汕头大学医学院学报* 2001;14:29-31
- 5 Mones-Xiol J. *Helicobacter pylori*-negative peptic ulcer. What is its aetiopathogenesis and treatment? *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94:687-696
- 6 Kaklikkaya N, Ozgur O, Aydin F, Cobanoglu U. *Helicobacter heilmannii* as causative agent of chronic active gastritis. *Scand J Infect Dis* 2002;34:768-770
- 7 Yoshimura M, Isomoto H, Shikuwa S, Osabe M, Matsunaga K, Omagari K, Mizuta Y, Murase K, Murata I, Kohno S. A case acute gastric mucosal lesions associated with *Helicobacter heilmannii* infection. *Helicobacter* 2002;7:322-326
- 8 De-Groote D, Ducatelle R, Haesebrouck F. Helicobacter of possible zoonotic origin: a review. *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:380-387
- 9 Bartolome-Resano R, Martinez-Martinez B, Martinez-Echverria A, Martinez-Penuela J, Isturiz-Abadia A, Olcoz-Flamarique F, del-Cazo-Cativiela J. Gastritis caused by *Helicobacter heilmannii* (*Gastrospirillum hominis*). Report of 3 cases. *Gastroenterol Hepatol* 2001;24:202-204
- 10 Trebesius K, Adler K, Vieth M, Stolte M, Haas R. Specific detection and prevalence of *Helicobacter heilmannii*-like organisms in the human gastric mucosa by fluorescent in situ hybridization and partial 16S ribosomal DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 2001;39:1510-1516
- 11 Texereau P, Briaud M, Gavard J. Endoscopic aspect of ulcerated tumor-like gastritis associated with *Helicobacter heilmannii*. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25:543-545
- 12 Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, Neubauer B, Neubauer A, Stolte M, Bayerdorffer E. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 2000;118:821-828
- 13 Debonnie JC, Donnay M, Mairese J. *Gastrospirillum hominis* ("*Helicobacter heilmannii*"): A cause of gastritis, sometimes transient, better diagnosed by touch cytology? *Am J Gastroenterol* 1995;90:411
- 14 Queiroz DM, Rocha GA, Mendes EN, De-Moura SB, De-Oliveira AM, Miranda D. Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine [see comments]. *Gastroenterology* 1996;11:19-27
- 15 Roosendaal R, Vos JH, Roumen T, van Vugt R, Cattoli G, Bart A, Klaasen HL, Kuipers EJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Slaughter pigs are commonly infected by closely related but distinct gastric ulcerative lesion-inducing *gastrospirilla*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2661-2664
- 16 Solnick JV. Clinical significance of *Helicobacter species* other than *Helicobacter pylori*. *Clin Infect Dis* 2003;36:349-354
- 17 Jalava K, On SL, Harrington CS, Andersen LP, Hanninen ML, Vandamme P. A cultured strain of "*Helicobacter heilmannii*", a human gastric pathogen, identified as *H. bizzozeronii*: evidence for zoonotic potential of *Helicobacter*. *Emerg Infect Dis* 2001;7:1036-1038
- 18 Svec A, Kordas P, Pavlis Z, Novotny J. High prevalence of *Helicobacter heilmannii*-associated gastritis in a small, predominantly rural area: further evidence in support of a zoonosis? *Scand J Gastroenterol* 2000;35:925-928
- 19 Cales V, Pariente A, Benazzouz P, Berthelemy P, Etcharry F. *Helicobacter heilmannii* ulceronecrotic acute gastritis: a report of 5 cases. *Ann Pathol* 2000;20:612-615

中药肝脂复煎剂对酒精和高脂饲养诱导的大鼠脂肪肝的影响

陆付耳, 董 慧, 高志强, 徐丽君, 魏世超, 王开富, 邹 欣

陆付耳, 董慧, 高志强, 徐丽君, 魏世超, 王开富, 邹欣, 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
陆付耳, 男, 1961-03-04 生, 汉族, 教授, 博士生导师, 享受国务院特殊津贴, 主要从事中西医结合治疗内分泌及代谢性疾病, 发表论文 70 篇。
湖北省重点攻关项目, No. 2002AA302B13
项目负责人: 陆付耳, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所. felu@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662577 传真: 027-83646605
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-11-19

Effect of Chinese medicine Ganzhifu decoction on murine fatty liver induced by alcohol and high fat feeding

Fu-Er Lu, Hui Dong, Zhi-Qiang Gao, Li-Jun Xu, Shi-Chao Wei, Kai-Fu Wang, Xin Zou

Fu-Er Lu, Hui Dong, Zhi-Qiang Gao, Li-Jun Xu, Shi-Chao Wei, Kai-Fu Wang, Xin Zou, Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030 Hubei Province, China Supported by Key Research Projects of Hubei Province. No.2002AA302B13
Correspondence to: Dr Fu-Er Lu, Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030 Hubei Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-11-19

Abstract

AIM: To explore the effects of Chinese medicine Ganzhifu decoction on fatty liver in rats.

METHODS: The fatty liver model was established by feeding with high caloric laboratory chow and alcohol. Sixty male Wistar rats were randomized into 6 groups, i.e. a normal control group, a model group, three Ganzhifu groups treated with Ganzhifu decoction (giant knotweed 20 g, rhubarb 5 g, Bupleurum 10 g) in different concentrations and a metformin group. All the animals were killed after treatment for 8 weeks. The activities of alkaline phosphatase and gamma glutamyl transferase, blood lipid, liver triglycerin and pathological changes in all groups were assayed.

RESULTS: The activities of alkaline phosphatase and gamma glutamyl transferase, blood lipid, liver triglycerin of model group increased significantly (ALP: $8\ 156 \pm 2\ 696$ vs $4\ 478 \pm 2\ 229$; GGT: 52 ± 14 vs 24 ± 21 ; TG: 615 ± 106 vs 454 ± 113 , $P < 0.05$; Liver triglycerin: 53 ± 10 vs 27 ± 8 , $P < 0.01$). Liver histology showed mild to moderate steatosis. Those indexes of Ganzhifu groups were significantly lower than those of model group (ALP: $5\ 666 \pm 2\ 187$ vs $8\ 156 \pm 2\ 696$; GGT: 24 ± 14 vs 52 ± 14 ; TG: 442 ± 148 vs 615 ± 106 ; Liver triglycerin: 35 ± 4 , 36 ± 6 , 38 ± 6 vs 53 ± 10 , $P < 0.05$, $P < 0.01$). The hepatic steatosis was also improved. Liver triglycerin

of metformin group was significantly reduced (32 ± 1 vs 53 ± 10 , $P < 0.01$), but there was no significant difference in other indexes between metformin and model groups.

CONCLUSION: Ganzhifu decoction can protect fatty liver in rats.

Lu FE, Dong H, Gao ZQ, Xu LJ, Wei SC, Wang KF, Zou X. Effect of Chinese medicine Ganzhifu decoction on murine fatty liver induced by alcohol and high fat feeding. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7): 1596-1599

摘要

目的: 观察中药肝脂复煎剂对酒精和高脂饲养诱导的大鼠脂肪肝的防治作用。

方法: 采用高浓度酒精灌胃合高脂饲料饲养制备大鼠脂肪肝模型, 同时给予不同剂量肝脂复煎剂治疗, 以二甲双胍为对照。通过检测血清肝酶谱、肝组织匀浆甘油三酯含量和肝脏组织学变化, 观察不同剂量肝脂复煎剂对脂肪肝的防治作用。

结果: 模型组大鼠肝脏出现明显的脂肪变性, 肝酶活性 (ALP、GGT)、血脂和肝组织甘油三酯含量升高 (ALP: $8\ 156 \pm 2\ 696$ vs $4\ 478 \pm 2\ 229$; GGT: 52 ± 14 vs 24 ± 21 ; TG: 615 ± 106 vs 454 ± 113 , $P < 0.05$; 肝 TG: 53 ± 10 vs 27 ± 8 , $P < 0.01$)。肝脂复剂量组肝细胞脂肪变显著减轻, 肝酶活性 (ALP、GGT)、血脂和肝组织甘油三酯含量较模型组显著下降 (ALP: $5\ 666 \pm 2\ 187$ vs $8\ 156 \pm 2\ 696$; GGT: 24 ± 14 vs 52 ± 14 ; TG: 442 ± 148 vs 615 ± 106 ; 肝 TG: 35 ± 4 , 36 ± 6 , 38 ± 6 vs 53 ± 10 , $P < 0.05$ - $P < 0.01$)。二甲双胍组肝组织甘油三酯含量较模型组下降 (32 ± 1 vs 53 ± 10 , $P < 0.01$), 其余指标无显著差异。

结论: 肝脂复煎剂对脂肪肝具有良好的防治作用。

陆付耳, 董慧, 高志强, 徐丽君, 魏世超, 王开富, 邹欣. 中药肝脂复煎剂对酒精和高脂饲养诱导的大鼠脂肪肝的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(7): 1596-1599

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1596.asp>

0 引言

脂肪肝是由多种疾病和病因引起的肝脏脂肪性变^[1-6]。流行病学调查表明主要为酒精、肥胖等引起的慢性脂肪肝^[7-12]。肝脂复煎剂治疗脂肪肝多年, 取得了满意疗效。

为进一步观察其防治实验性脂肪肝的药理作用, 特进行该复方防治脂肪肝的实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 Wistar 大鼠 60 只, 体质量 150 ± 10 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。测血脂和肝酶的试剂盒均购自浙江东瓯生物工程有限公司; 猪油, 玉米油购自超市; 胆固醇购自郑州利伟生物化工有限公司。肝脂复煎剂(组成: 虎杖 20 g, 生大黄 5 g, 柴胡 10 g。将虎杖、生大黄用乙醇回流提取 2 次, 合并提取液, 回收乙醇至无醇味, 得浸膏 1; 另将柴胡用水煎煮 2 次, 将提取液合并浓缩得浸膏 2; 将 1、2 合并即得肝脂复煎剂浸膏。)由同济医院药剂科提供, 每克浸膏含生药 3.5 g, 双蒸水稀释成不同浓度备用。盐酸二甲双胍片由法国里昂医药工业公司生产, 研制成粉末, 双蒸水溶解成含药 10g/L 混悬液, 其余试剂均为分析纯。

1.2 方法 Wistar 大鼠 60 只, 适应性喂养 1 wk 后随机分为 6 组, 即正常组、模型组、肝脂复低、中、高剂量组(浸膏浓度依次为 0.05, 0.1, 0.2 kg/L)和二甲双胍组, 每组 10 只。正常组予标准饲料饲养, 生理盐水 10 mL/kg 灌胃, 2 次/d, 其余各组均高脂饲料(835 g/kg 标准饲料 +15 g/kg 胆固醇 +50 g/kg 猪油 +100 g/kg 玉米油)饲养, 60 mL/L 酒精按 10 mL/kg 灌胃, 2 次/d。肝脂复各剂量组每日 14:00 分别按照肝脂复低中高剂量给予灌胃, 二甲双胍组给二甲双胍混悬液 10 ml/kg 每日灌胃, 各组均正常饮水, 观察大鼠的食欲、体重、行为、状态、毛发及死亡情况, 连续 8 wk。末次给药 24 h 后, 20 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行腹腔麻醉。腹主动脉取血, 常规制备血清。同时称体质量及肝质量, 摘取部分肝组织进行生化指标测试和 HE 染色。用赖氏法测 ALT, AST 活性, 酶法 GGT、ALP, 总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)的含量。取新鲜肝脏适量, 制成组织匀浆, 用抽提液(甲醇与氯仿 1:1, V/V)抽提脂质, 用分光光度法测定 TG 的含量。将取出的肝组织用中性甲醛固定, 石蜡包埋, HE 染色, 光镜下观察肝组织学的改变, 肝细胞脂肪变等情况。

统计学处理 实验数据以 mean±SD 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

模型组及实验观察组大鼠毛发光泽度差, 体重增长较缓慢, 多数大鼠食欲差。正常组大鼠则精神状态好, 食欲佳。体质量及肝质量/体质量均无显著性差异。将各组死亡大鼠剔除, 最后共取得有效标本 50 份。

2.1 血清肝酶谱变化 模型组与正常组比较, ALT 与 AST 有升高趋势, 但无显著性差异。而 ALP 与 GGT 则显著升高; 与模型组比较, 肝脂复低剂量组 ALP 与 GGT 则显著降低($P < 0.05$, 表 1); 二甲双胍组肝酶活性则无

显著改善。

表 1 各组大鼠酶活性的变化 (mean±SD, nkat/L)

分组	n	ALT	AST	ALP	GGT
正常组	9	347 ± 154	970 ± 763	4 478 ± 2 229	24 ± 21
模型组	8	412 ± 168	1 157 ± 211	8 156 ± 2 696 ^a	52 ± 14 ^a
低剂量组	10	302 ± 137	1 102 ± 300	5 666 ± 2 187 ^b	24 ± 14 ^c
中剂量组	9	459 ± 134	1 498 ± 281	8 230 ± 2 539	46 ± 25
高剂量组	8	386 ± 173	1 402 ± 329	7 251 ± 3 215	46 ± 9
二甲双胍组	6	560 ± 126	1624 ± 370	7000 ± 4555	29 ± 31

^aP < 0.05 vs 正常组; ^bP < 0.05 vs 模型组。

2.2 血清和肝组织匀浆脂质的变化 模型组血清 TG 较正常组显著升高($P < 0.05$), 但各治疗组中只有高剂量组降低血清 TG 作用明显($P < 0.05$), 并显示出剂量相关性。模型组肝组织 TG 显著升高($P < 0.01$), 各治疗组均显示出降低肝组织 TG 的作用($P < 0.05$ - $P < 0.01$, 表 2)。模型组血清 TC 有升高趋势, 但无显著性差异。

表 2 各组大鼠血清及肝匀浆脂质的变化 (mean±SD)

分组	n	血清 TG(μmol/L)	血清 TC(μmol/L)	肝 TG(mg/g)
正常组	9	454 ± 113	1 513 ± 191	27 ± 8
模型组	8	615 ± 106 ^a	1 857 ± 455	53 ± 10 ^b
低剂量组	10	551 ± 214	1 582 ± 421	35 ± 4 ^d
中剂量组	9	527 ± 182	1 887 ± 329	36 ± 6 ^c
高剂量组	8	442 ± 148 ^c	1 954 ± 488	38 ± 6 ^c
二甲双胍组	6	650 ± 190	1 814 ± 198	32 ± 1 ^c

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 正常组; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 模型组。

2.3 病理学改变 正常组大鼠肝色鲜红、边缘锐利、质韧; 模型组大鼠肝外观呈奶油黄或红黄相间, 体积明显增大, 边缘变钝, 质地变软, 切面略带油腻感。药物防治组肝外观均接近对照组。光镜下正常组大鼠肝小叶清晰, 肝细胞索排列整齐, 模型组肝小叶中央静脉区小泡状脂肪变, 小叶内及汇管区灶性炎细胞浸润(图 1); 高倍镜下, 大鼠肝小叶中心带肝细胞中出现大小不等的脂肪滴, 一些肝细胞核则被脂肪滴挤得明显偏位(图 2)。肝脂复组肝病理学改变较模型组显著减轻(图 3-6), 二甲双胍组较模型组亦有明显改变(图 7, 8)。

3 讨论

脂肪肝目前缺乏有效防治的药物^[13-16]。肝脂复煎剂成分为虎杖、大黄、柴胡, 其中虎杖、大黄苦寒, 既可清热解毒燥湿, 又可活血化瘀, 柴胡调肝理气。现代研究也表明, 对酒精性肝病的治疗, 活血化瘀的方剂可以奏效^[17]。肝脏组织切片镜检结果表明, 肝脂复 3 个剂量组肝脏脂肪变性程度都比模型组明显减轻。肝脂复高剂量是低

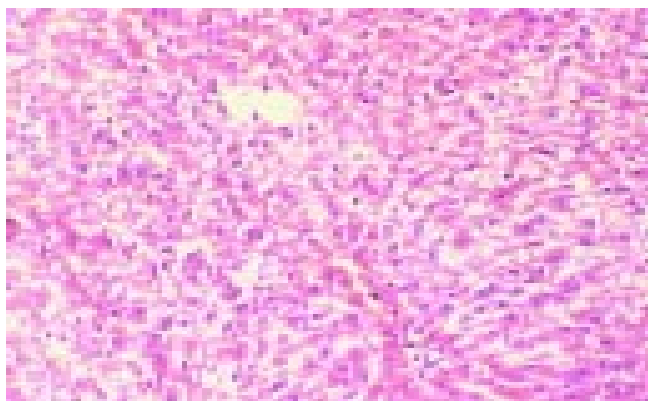


图1 模型组大鼠肝脏病理改变. HE×100.

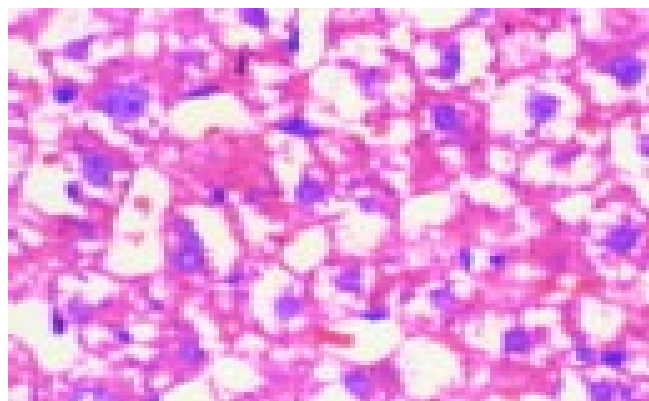


图2 模型组大鼠肝脏病理改变. HE×400.

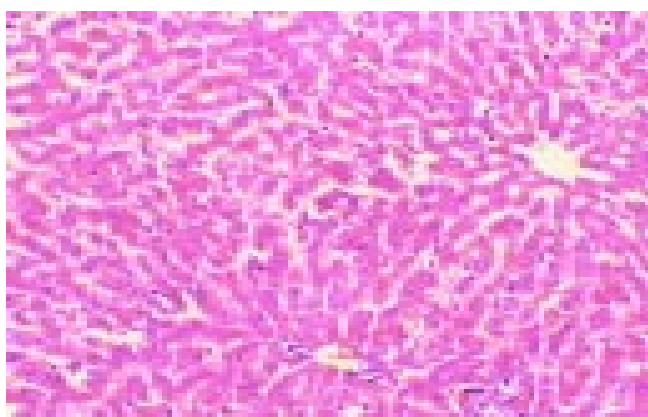


图3 肝脂复组大鼠肝脏病理改变. HE×100.



图4 肝脂复组大鼠肝脏病理改变. HE×400.

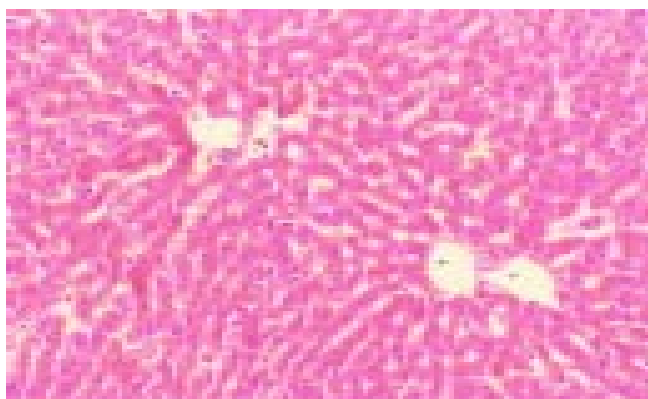


图5 肝脂复组大鼠肝脏病理改变. HE×100.



图6 肝脂复组大鼠肝脏病理改变. HE×400.

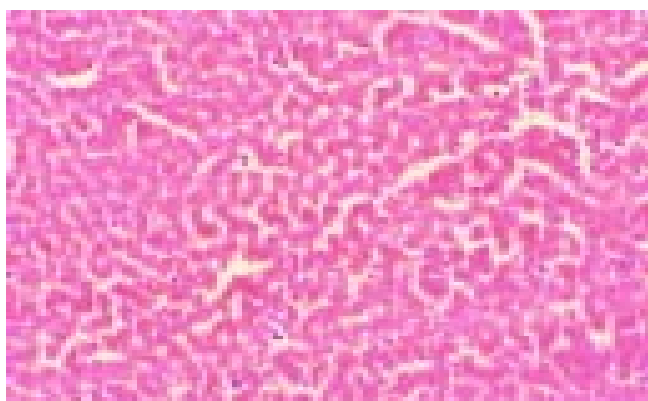


图7 二甲双胍组大鼠肝脏病理改变. HE×100.



图8 二甲双胍组大鼠肝脏病理改变. HE×400.

剂量的4倍;不同剂量肝脂复对于脂肪肝的影响有较大差异.低剂量组改善肝功能效果较好,而降低血脂效果不明显;高剂量组降低血脂效果优于低剂量组,但对肝功能改善不如低剂量组,提示脂肪肝和高脂血症的发生并不平行^[18-21].肝脏是药物代谢的主要器官,尚无降脂药物有效防治脂肪肝的足够证据^[22],并且,脂肪化的肝脏比正常肝脏更不耐受降血脂药物治疗.在综合治疗的基础上,酌情应用降血脂药物,但需适当减量和监测肝功能.因此,脂肪肝的治疗不应滥用降脂药物^[23].

实验采用文献[24]报道的造模方法,加以改进,成功地制造出大鼠的脂肪肝模型.模型组肝小叶中央静脉区小泡状脂肪变;血清学指标也表明模型组GGT、ALP均高于正常组,具有显著性差异($P < 0.05$),说明本研究模型复制成功^[25-26].其中ALT、AST未见明显差异,有资料显示脂肪肝患者的此两项指标可仅轻度增高^[27],而GGT是反映肝细胞功能的敏感指标^[28-29].因此,GGT常作为酒精所引起脂肪肝的重要监测指标^[30-31].

肝脏是血清胆固醇的重要来源,有极旺盛的胆固醇合成能力,在肝细胞功能受损时,从其处理血浆脂蛋白和合成胆固醇到组装血浆脂蛋白的全过程,都可发生障碍,血清胆固醇可不升高.实验中,大鼠长期灌入乙醇,肝细胞功能受损,故血清总胆固醇未见明显升高.而血清甘油三酯显著增高,与文献[32]报道一致.肝脏甘油三酯明显增多、沉积,可能与酒精灌胃和高脂喂养有关.二甲双胍能促进肝细胞脂蛋白合成转运,减少甘油三酯在肝脏沉积,实验中,二甲双胍组肝脏甘油三酯含量与模型组比较显著降低,但未显示出明显的降低血脂和改善肝功能的作用,与文献报道不一致,可能与样本较少,用剂量及疗程不足等有关.实验结果证明,肝脂复煎剂对大鼠脂肪肝有良好的防治作用.但用药组无1例能达到治愈脂肪肝的目的,这可能与实验中用药同时仍持续高脂饮食和酒精饲养有关.

4 参考文献

- 1 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
- 2 Fan JG, Chen LH, Xu ZI, Zeng MD. Overexpression of hepatic plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rabbits with fatty liver. *World J Gastroenterol* 2001;7:710-712
- 3 冯志强, 沈志祥, 谭诗云. 酒精性脂肪肝的发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:346-348
- 4 丁小云, 李定国, 徐芹芳, 陆汉明. 辛伐他汀对大鼠实验性脂肪肝的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:650-653
- 5 高健, 吴显才, 李孝生, 沈鼎明. 还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:809-811
- 6 Piao YF, Li JT, Shi Y. Relationship between genetic polymorphism of cytochrome P45011E1 and fatty liver. *World J Gastroenterol* 2003;9:2612-2615
- 7 Chen WX, Li YM, Yu CH, Cai WM, Zheng M, Chen F. Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 mRNA in patients with alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2002;8:379-381
- 8 Shen L, Fan JG, Shao Y, Zeng MD, Wang JR, Luo GH, Li JQ, Chen SY. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey. *World J Gastroenterol* 2003;9:1106-1110
- 9 Fan JG, Zhong L, Xu ZJ, Tia LY, Ding XD, Li MS, Wang GL. Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity

- and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2045-2049
- 10 Iwamoto N, Ogawa Y, Kajihara S, Hisatomi A, Yasutake T, Yoshimura T, Mizuta T, Hara T, Ozaki I, Yamamoto K. Gln27Glu beta2-adrenergic receptor variant is associated with hypertriglyceridemia and the development of fatty liver. *Clin Chim Acta* 2001;314:85-91
- 11 Molina PE, McClain C, Valla D, Guidot D, Diehl AM, Lang CH, Neuman M. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:120-128
- 12 Farrell GC. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:124-138
- 13 Tsutsumi And M, Takase S. Effect of fenofibrate on fatty liver in rats treated with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25(6 Suppl):75S-79S
- 14 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:638-644
- 15 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100
- 16 Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1136-1143
- 17 薄爱华, 田翠时, 薛贵平, 杜建华, 许永利. 大鼠免疫性和酒精性肝病的形态学变化. 世界华人消化杂志 2001;9:157-160
- 18 Tacikowski T, Dzieniszewski J, Nowicka G, Ciok J. Comparative analysis of lipid profiles assessed by ultracentrifugation in patients with various hyperlipoproteinaemia types in correlation with hepatic steatosis. *Med Sci Monit* 2002;8:CR697-701
- 19 Omagari K, Kadokawa Y, Masuda J, Egawa I, Sawa T, Hazama H, Ohba K, Isomoto H, Mizuta Y, Hayashida K, Murase K, Kadota T, Murata I, Kohno S. Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1098-1105
- 20 Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Non-alcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002;35:367-372
- 21 Bloks VW, Plosch T, van Goor H, Roelofsens H, Baller J, Havinga R, Verkade HJ, van Tol A, Jansen PL, Kuipers F. Hyperlipidemia and atherosclerosis associated with liver disease in ferrochelatase-deficient mice. *J Lipid Res* 2001;42:41-50
- 22 Garcia-Mediavilla V, Villares C, Culebras JM, Bayon JE, Gonzalez-Gallego J. Effects of dietary beta-cyclodextrin in hypercholesterolaemic rats. *Pharmacol Toxicol* 2003;92:94-99
- 23 Angulo P, Lindor KD. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:797-810
- 24 黄哲, 田德录, 原爱红. 酒精性肝病的实验动物模型的研究. 华人消化杂志 1998;6:712-713
- 25 Lukivskaya OY, Maskevich AA, Buko VU. Effect of ursodeoxycholic acid on prostaglandin metabolism and microsomal membranes in alcoholic fatty liver. *Alcohol* 2001;25:99-105
- 26 Gilat T, Leikin-Frenkel A, Goldiner I, Juhel C, Lafont H, Gobbi D, Konikoff FM. Prevention of diet-induced fatty liver in experimental animals by the oral administration of a fatty acid bile acid conjugate (FABAC). *Hepatology* 2003;38:436-442
- 27 Yano E, Tagawa K, Yamaoka K, Mori M. Test validity of periodic liver function tests in a population of Japanese male bank employees. *J Clin Epidemiol* 2001;54:945-951
- 28 Maher JJ. Treatment of alcoholic hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:448-455
- 29 Lee DH, Ha MH, Kim JH, Christiani DC, Gross MD, Steffes M, Blomhoff R, Jacobs DR Jr. Gamma-glutamyltransferase and diabetes-a 4 year follow-up study. *Diabetologia* 2003;46:359-364
- 30 Rukkumani R, Sri Balasubashini M, Vishwanathan P, Menon VP. Comparative effects of curcumin and photo-irradiated curcumin on alcohol- and polyunsaturated fatty acid-induced hyperlipidemia. *Pharmacol Res* 2002;46:257-264
- 31 肖湘君, 肖强, 明西林, 张振海, 徐丹生, 胡家全. 复方参七胶囊治疗肝功异常性脂肪肝 62 例. 世界华人消化杂志 2002;10:1062-1064
- 32 Kusunoki M, Tsutsumi K, Hara T, Ogawa H, Nakamura T, Miyata T, Sakakibara F, Fukuzawa Y, Suga T, Kakumu S, Nakaya Y. Correlation between lipid and glycogen contents in liver and insulin resistance in high-fat-fed rats treated with the lipoprotein lipase activator NO-1886. *Metabolism* 2002;51:792-795

小檗碱对大鼠肝细胞钾电流和钙电流的影响

王芳, 程岚, 赵刚, 周红义, 姚伟星

王芳, 程岚, 周红义, 姚伟星, 华中科技大学同济医学院药理学系
湖北省武汉市 430030
赵刚, 华中科技大学同济医学院协和医院胰腺外科中心
湖北省武汉市 430022
王芳, 女, 1975-03-22 生, 湖北省武汉市人, 汉族, 华中科技大学同济医学院药理学系讲师, 主要从事离子通道药理研究。
项目负责人: 王芳, 430030, 湖北省武汉市航空路 13 号, 华中科技大学同济医学院药理学系。 wangfang0322@yahoo.com.cn
电话: 027-83691793
收稿日期: 2004-02-23 接受日期: 2004-04-05

Wang F, Cheng L, Zhao G, Zhou HY, Yao WX. Effects of berberine on potassium and calcium currents in isolated rat hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1600-1603

摘要

目的: 研究小檗碱对大鼠肝细胞延迟外向钾电流(I_K)和钙释放激活钙电流(I_{CRAC})的影响。

方法: 用酶消化法分离大鼠肝细胞, 应用全细胞膜片钳技术研究小檗碱对大鼠肝细胞延迟外向钾电流(I_K)和钙释放激活钙电流(I_{CRAC})的影响。

结果: 小檗碱 1-300 $\mu\text{mol/L}$ 浓度依赖性地抑制 I_K , 其 EC_{50} 值为 $39 \pm 5 \mu\text{mol/L}$, n_H 为 0.82 ± 0.05 , 30 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱在膜电位为 +60 ~ +140 mV 显著降低 I_K 幅值, I-V 曲线下移 ($n=8$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$ vs control)。小檗碱 1-300 $\mu\text{mol/L}$ 亦浓度依赖性地抑制 I_{CRAC} , EC_{50} 值为 $47 \pm 11 \mu\text{mol/L}$, n_H 为 0.71 ± 0.09 。小檗碱 30 $\mu\text{mol/L}$ 使各膜电位下 I_{CRAC} 幅值降低, 对内向电流和外向电流均明显减小, 尤其减小膜电位为 -100 ~ -80 mV 时的 I_{CRAC} 幅值 ($n=8$, $P < 0.05$ vs control)。

结论: 小檗碱对大鼠肝细胞钾电流和钙电流均有抑制作用, 该作用可能与其肝保护作用有关。

王芳, 程岚, 赵刚, 周红义, 姚伟星. 小檗碱对大鼠肝细胞钾电流和钙电流的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1600-1603

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1600.asp>

Effects of berberine on potassium and calcium currents in isolated rat hepatocytes

Fang Wang, Lan Cheng, Gang Zhao, Hong-Yi Zhou, Wei-Xing Yao

Fang Wang, Lan Cheng, Hong-Yi Zhou, Wei-Xing Yao, Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Gang Zhao, Pancreatic Surgery Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Fang Wang, Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. wangfang0322@yahoo.com.cn
Received: 2004-02-23 Accepted: 2004-04-05

Abstract

AIM: To study the effects of berberine on ion channels in isolated rat hepatocytes.

METHODS: Tight-seal whole-cell patch-clamp techniques were performed to investigate the effects of berberine on the delayed outward potassium currents (I_K) and Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current (I_{CRAC}) in enzymatically isolated rat hepatocytes.

RESULTS: Berberine 1-300 $\mu\text{mol/L}$ reduced I_K in a concentration-dependent manner with EC_{50} of $39 \pm 5 \mu\text{mol/L}$ and n_H of 0.82 ± 0.05 ($n=8$). When the bath solution was changed to tetraethylammonium (TEA) 8 mmol/L, I_K was inhibited. Berberine 30 $\mu\text{mol/L}$ reduced I_K at all membrane potentials examined, especially at potentials positive to +60 mV ($n=8$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$ vs control). Berberine 1-300 $\mu\text{mol/L}$ also inhibited I_{CRAC} in a concentration-dependent manner. The fitting parameters were as follows: $EC_{50} = 47 \pm 11 \mu\text{mol/L}$, $n_H = 0.71 \pm 0.09$ ($n=8$). The peak value of I_{CRAC} in the I-V relationship was decreased by berberine 30 $\mu\text{mol/L}$ at potential negative to -80 mV ($n=8$, $P < 0.05$ vs control). But the reverse potential of I_{CRAC} occurred at voltage = 0 mV in all cells.

CONCLUSION: Berberine has inhibitory effects on potassium and calcium currents in isolated rat hepatocytes, which may be involved in the hepatoprotective effect.

0 引言

小檗碱(berberine, Ber)是从毛茛科黄连属(*Coptis chinensis franch*)根状茎中提取的异喹啉类生物碱。Ber可浓度依赖性地抑制豚鼠心室肌细胞延迟整流钾电流和L-型钙电流^[1-2]。Hwang et al^[3]报道Ber可拮抗叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)诱导的大鼠氧化应激性肝损伤,降低血清转氨酶及碱性磷酸酶,增加肝血流量,增强肝细胞再生能力,促进肝损伤的修复过程。Ber的肝脏保护作用是否与其对肝细胞离子通道的作用有关,目前尚未见相关研究报道。我们采用全细胞膜片钳技术,研究Ber对大鼠肝细胞延迟外向钾电流(I_K)和钙释放激活钙电流(I_{CRAC})的影响,以期从通道水平阐明其肝保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 D-Hanks液成分为(mmol/L): NaCl 137, KCl 5.4, NaH_2PO_4 0.5, Na_2HPO_4 4.16, Glucose 5.5, 用

NaOH 调节 pH 值至 7.3. KB 液成分为(mmol/L): Glutamic acid 70, KCl 130, taurine 15, K_2HPO_4 10, $MgCl_2$ 0.5, HEPES 10, Glucose 11, EGTA 0.5, 用 KOH 调节 pH 值至 7.4. 记录 I_K 的细胞外液为改良 Tyrode 液 (mmol/L): NaCl 144, KCl 4.0, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 0.53, Na_2HPO_4 0.33, HEPES 5, Glucose 5.5, 用 NaOH 调节 pH 值至 7.4. 电极内液为(mmol/L): KCl 130, K_2ATP 5.0, creatine phosphate 5.0, HEPES 5.0, 用 KOH 调节 pH 值至 7.4. 记录 I_{CRAC} 的细胞外液为(mmol/L): NaCl 140, KCl 2.8, $CaCl_2$ 10, $MgCl_2$ 0.5, HEPES 10, Glucose 11, 用 NaOH 调节 pH 值至 7.4. 电极内液为(mmol/L): Potassium glutamate 145, NaCl 8.0, $MgCl_2$ 1.0, $MgATP$ 0.5, EGTA 10, HEPES 10, 用 CsOH 调节 pH 值为 7.2. Ber 为黄色结晶粉末, M_r : 407.85, 纯度 >95%, 购自宜昌制药厂. Collagenase I, HEPES, K_2ATP , creatine phosphate, Potassium glutamate 和 $MgATP$ 均为 Sigma 公司产品. EGTA 购自 Fluka Biochemika 公司.

1.2 方法 采用改良的 Seglen 法 (Methods Cell Biol 1976; 13: 29-83). 成年 Wistar 大鼠(雌雄不限, 180 ± 20 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物部提供)采用 30 g/L 戊巴比妥钠 50 mg/kg ip 麻醉. 肝素抗凝, 行门静脉插管. 首先用无 Ca^{2+} , 无 Mg^{2+} 的 D-Hanks 液灌流肝脏数分钟, 直至肝脏内残血排尽. 改用含 I 型胶原酶 0.3 g/L D-Hanks 液, 循环灌流 10 min, 直至肝实质变软, 压之凹陷不易恢复, 肝包膜下组织呈“龟背状”裂隙为止. 灌流液均用 O_2 饱和, 并保持 37 °C 恒温. 完整剥离肝脏并置于 4 °C 的 D-Hanks 液中撕碎, 制成混合肝细胞悬液. 细胞悬液经 200 目筛网过滤至离心管中, 500 r/min 离心 2 min, 去上清, 重复离心 3 次以除去非肝实质细胞. 细胞接种在盖玻片上, 并保存在 4 °C KB 液中, 供 8 h 内使用. 此方法可获得 85-95% 活细胞. 有活性的肝细胞胞体在相差显微镜下透亮呈圆形, 细胞膜完整无损且边界清晰. 而无活性的肝细胞肿胀, 出现空泡及胞膜破损. 将盖玻片放入 1 mL 的灌流槽中, 置于倒置显微镜 (XD-101_{2B}, 南京) 载物台上. 用细胞外液冲洗多余的组织碎片和未覆着在盖玻片上的细胞. 采用全细胞膜片钳技术, 在电压钳模式下记录电流. 实验在室温 (20-22 °C) 下进行. 玻璃毛胚 GG-17 (南京六合泉水教学实验

仪器厂) 经微电极控制仪 (pp-83, Narishige, Japan) 分两步拉制成尖端直径为 1-1.5 μm 的电极, 充灌电极内液并浸入细胞外液后电阻为 2-4 $M\Omega$ 电极与膜片钳放大器 (PC-II 型, 华中科技大学) 连接, 放大器通过 12 位 A/D 和 D/A 数据转换器 (DA-1 型, 华中科技大学) 由计算机控制. 刺激产生和信号采集由 Pclamp 软件 (IbbClamp32, 华中科技大学) 控制. 电极入水后补偿液接电位, 然后再进行封接, 封接电阻达 1 $G\Omega$ 以上, 补偿快电容. 破膜后调节慢电容补偿和串联电阻补偿 (50-80%), 以减少钳位误差和记录信号失真. 当记录电流稳定, 即电流幅度保持稳定时开始加药进行实验.

统计学处理 实验数据用 mean \pm SD 表示, 采用 t 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示差异有显著性.

2 结果

2.1 Ber 对大鼠肝细胞 I_K 的影响 保持电位为 -50 mV, 以 0.1 Hz 的频率, 施予 +140 mV, 900 ms 的除极化脉冲, 可引出一外向电流, 此电流可被 TEA 8 mmol/L 阻滞, 即 I_K . 将测试脉冲末的电流幅值作为 I_K 的幅值. Ber 10, 30 $\mu mol/L$ 分别使 I_K 由给药前的 2815 ± 243 pA 减小至 2273 ± 202 pA 和 1889 ± 137 pA (抑制率分别为 $19.3 \pm 2.7\%$ 和 $34.1 \pm 6.0\%$). 1-300 $\mu mol/L$ 浓度依赖性地抑制 I_K , 经 Hill 方程拟合后, EC_{50} 为 39 ± 5 $\mu mol/L$, n_H 为 0.82 ± 0.05 (图 1B). 保持电位为 -50 mV, 施予 +30 ~ +140 mV, 阶跃为 10 mV, 900 ms 的除极化脉冲, 记录 I_K , 并以各电流幅值对相应除极化膜电位作图得 I_K 的 I-V 曲线 (图 1A, 1C). Ber 30 $\mu mol/L$ 在膜电位为 +60 ~ +140 mV 显著降低 I_K 幅值, I-V 曲线下移 ($n = 8$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$ vs control).

2.2 Ber 对大鼠肝细胞 I_{CRAC} 的影响 保持电位 0 mV, 以 0.2 Hz 的频率, 施予 -100 mV, 200 ms 的脉冲刺激, 可记录到 I_{CRAC} . Ber 10, 30 $\mu mol/L$ 分别使 I_{CRAC} 由给药前的 -238 ± 22 pA 下降至 -195 ± 18 pA 和 -162 ± 17 pA (抑制率分别为 $18.2 \pm 3.5\%$ 和 $32.1 \pm 4.0\%$). Ber 1-300 $\mu mol/L$ 浓度依赖性地抑制 I_{CRAC} , EC_{50} 为 47.2 ± 10.9 $\mu mol/L$, n_H 为 0.71 ± 0.09 (图 2B). 保持电位 0 mV, 以 0.2 Hz 的频率, 施予 -100 ~ +80 mV, 持续时间为 200 ms, 阶跃为 20 mV 的脉冲刺激, 得到一系列电流, 即 I_{CRAC} , 分别测量

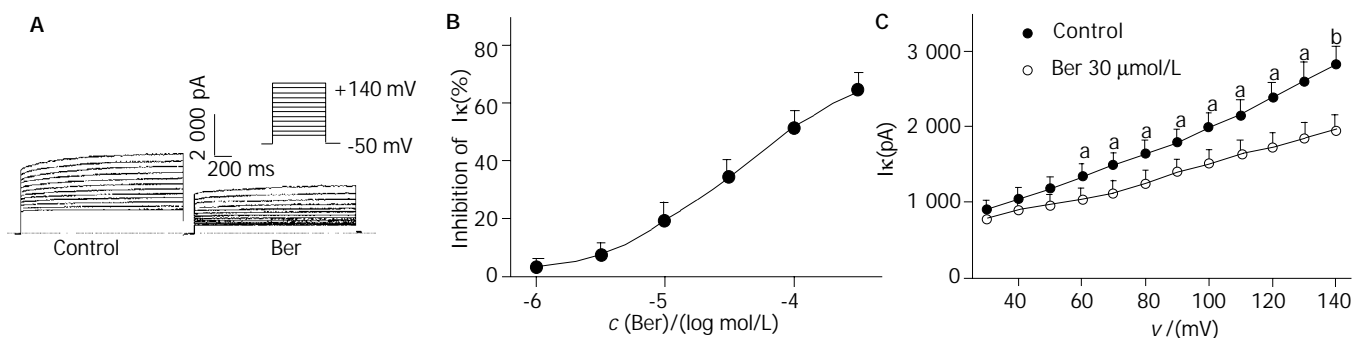


图 1 Ber 对大鼠肝细胞 I_K 的影响. A: Ber 30 $\mu mol/L$ 前后 I_K 的变化. 虚线代表零电流水平. B: Ber 对 I_K 量效曲线的影响. C: Ber 30 $\mu mol/L$ 对 I_K I-V 曲线的影响. $n = 8$, mean \pm SD. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs control.

各膜电位下的 I_{CRAC} ，以各脉冲下电流幅值对相应膜电位作图得 I_{CRAC} I-V 曲线(图 2A, C)，其反转电位约为 0 mV. Ber 30 $\mu\text{mol/L}$ 使各膜电位下 I_{CRAC} 幅值降低，对

内向电流和外向电流均明显减小，尤其减小膜电位为 -100~-80 mV 时的 I_{CRAC} 幅值，但不改变 I-V 曲线的形状及反转电位($n=8$, $P<0.05$ vs control).

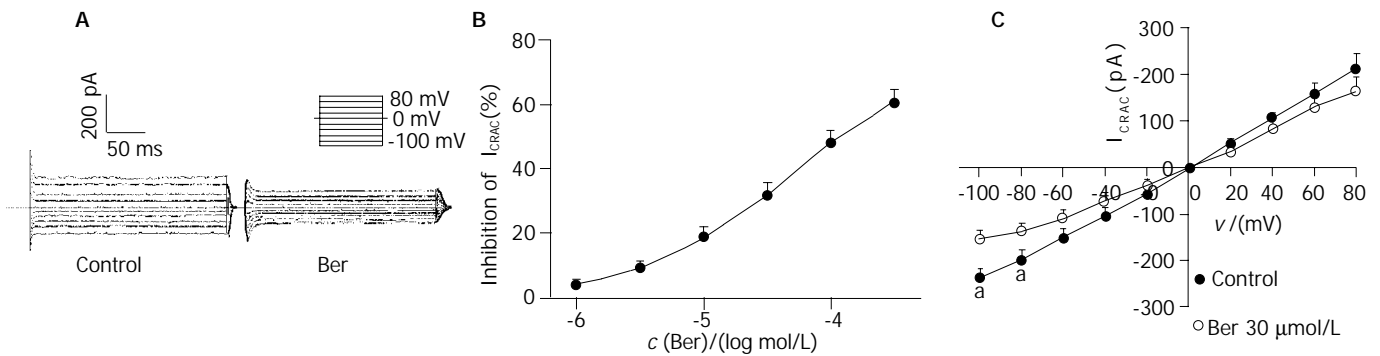


图2 Ber 对大鼠肝细胞 I_{CRAC} 的影响. A: Ber 30 $\mu\text{mol/L}$ 前后 I_{CRAC} 曲线的变化. 虚线代表零电流水平. B: Ber 对 I_{CRAC} 量效曲线的影响. C: Ber 30 $\mu\text{mol/L}$ 对 I_{CRAC} I-V 曲线的影响. $n=8$, mean \pm SD. $^aP<0.05$ vs control.

3 讨论

我们首次观察到 Ber 对大鼠肝细胞 I_K 和 I_{CRAC} 均有抑制作用. 许多非兴奋细胞膜的电学改变与其生理功能直接相关, 如瞬时外向钾电流调节血小板的黏附和聚集. 肝细胞是一种非兴奋性细胞, 其膜电位在调节肝脏代谢, 物质转运以及细胞容积等方面起重要作用, 如影响葡萄糖生成, 氨基酸转运和胆盐摄取速度等^[4]. 膜电位主要由细胞内、外 K^+ 浓度及细胞膜对 K^+ 通透性所决定. 文献报道, 跨膜胆汁酸的转运与 K^+ 有关. 细胞内低 K^+ 时, 可使胆汁淤积^[5-6]. 另外, 细胞 K^+ 平衡与维持肝细胞的水化状态和蛋白代谢亦密切相关. 肝脏缺血缺氧时, 肝细胞体积与 K^+ 电导增加, 导致细胞死亡^[7-8]. Nietsch et al^[9] 研究表明改变 K^+ 通道活性所引起的膜电位改变可能是人肝细胞凋亡的机制之一, 抑制 K^+ 通道可延迟肝细胞凋亡和死亡. Neveux et al^[10] 研究表明钾通道阻滞剂通过影响大鼠肝细胞的能量代谢而发挥保护作用.

Hwang et al^[3] 报道, Ber(0.5, 5 mg/kg, ip) 对 t-BHP 诱导的大鼠氧化应激性肝损伤具有保护作用. 我们观察到, Ber 浓度依赖性地抑制 I_K , 其剂量范围与 Hwang et al 的报道相似, 我们亦发现海葵毒素(anthopleurin-Q, AP-Q)能选择性地增大大鼠肝细胞 I_K , 该作用与其抗 CCl_4 所致肝损伤有关^[11]. 而本实验中表明 Ber 通过选择性地抑制大鼠肝细胞 I_K , 来拮抗 t-BHP 诱导的大鼠氧化应激性肝损伤. 这种矛盾现象主要是由于 CCl_4 和 t-BHP 诱导肝损伤的作用机制不同. Ber 对 t-BHP 诱导的肝损伤有保护作用, 而对 CCl_4 诱导的肝损伤没有保护作用, 这与本课题组的实验结果相一致^[12].

Ca^{2+} 内流主要包括3种方式: 依靠浓度梯度的被动扩散, 受体门控性钙通道和电压依赖性钙通道. 大鼠肝细胞不存在电压依赖性 Ca^{2+} 通道, 但具有钙释放激活的钙通道, 在调节肝细胞膜内外 Ca^{2+} 交换中起重要作用^[13-15]. I_{CRAC} 能通过两种耗竭 Ca^{2+} 库的方式激活. 一种为 EGTA 通过螯合胞内 Ca^{2+} , 被动地耗竭 Ca^{2+} 贮库, 缓慢激活

I_{CRAC} ; 另一种为 IP_3 通过与内质网 IP_3 受体结合, 主动地耗竭 Ca^{2+} 贮库, 迅速激活 I_{CRAC} ^[16-18]. 我们主要通过向电极内液中加入高浓度 EGTA 螯合胞内 Ca^{2+} , 缓慢激活 I_{CRAC} ^[19].

Ca^{2+} 作为第二信使, 在肝细胞的糖原合成与分解、电解质转运, 以及肝细胞的生长增生过程中起着重要作用. 一旦细胞内外 Ca^{2+} 失衡, 细胞将遭受功能性损伤, 甚至死亡^[20-23]. 缺血再灌注肝损伤时, 肝细胞内 Ca^{2+} 超载发生早, 明显先于肝细胞内其他生物化学改变, 很可能是重要的始动因素之一^[24-26]. 肝细胞内 Ca^{2+} 超载可激活磷脂酶和蛋白水解酶, 促进氧自由基大量生成, 使线粒体内 ATP 的合成减少, 是受损肝细胞死亡的最后共同通路, 也是细胞凋亡的关键因素之一^[27-29]. 因此, 阻断肝细胞内 Ca^{2+} 超载这一重要环节, 对于减轻肝缺血再灌注损伤, 保护肝功能, 具有重要的临床意义.

Ber 抑制 I_{CRAC} 的 EC_{50} 为 47.20 $\mu\text{mol/L}$, 高于其抑制心肌细胞电压依赖性钙通道的 EC_{50} ^[30]. Ber 对这两种电流的敏感性不同进一步说明 I_{CRAC} 不同于电压依赖性的 Ca^{2+} 通道. Ber 通过抑制肝细胞 I_K , 减少钾离子外流, 有利于维持肝细胞内外离子环境的稳定, 调节肝脏的代谢. 另外 Ber 通过抑制肝细胞 I_{CRAC} , 阻滞 Ca^{2+} 内流, 防止肝细胞内 Ca^{2+} 超载, 从而发挥其肝保护作用.

4 参考文献

- Li Y, Fu LY, Yao WX, Xia GJ, Jiang MX. Effects of benzyltetrahydropalmatine on potassium currents in guinea pig and rat ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:612-616
- Li BX, Yang BF, Zhou J, Xu CQ, Li YR. Inhibitory effects of berberine on I_{K1} , I_K , and HERG channels of cardiac myocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22:125-131
- Hwang JM, Wang CJ, Chou FP, Tseng TH, Hsieh YS, Lin WL, Chu CY. Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. *Arch Toxicol* 2002; 76:664-670
- Roman R, Feranchak AP, Troetsch M, Dunkelberg JC, Kilic G, Schlenker T, Schaack J, Fitz JG. Molecular characterization of volume-sensitive SK (Ca) channels in human liver cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G116-122

- 5 Denk GU, Soroka CJ, Mennone A, Koepsell H, Beuers U, Boyer JL. Down-regulation of the organic cation transporter 1 of rat liver in obstructive cholestasis. *Hepatology* 2004;39:1382-1389
- 6 Cho WK, Siegrist VJ, Zinzow W. Impaired regulatory volume decrease in freshly isolated cholangiocytes from cystic fibrosis mice: implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator effect on potassium conductance. *J Biol Chem* 2004;279:14610-14618
- 7 Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999;248:280-293
- 8 Abrahamse SL, van Runnard Heimel P, Hartman RJ, Chamuleau RA, van Gulik TM. Induction of necrosis and DNA fragmentation during hypothermic preservation of hepatocytes in UW, HTK, and Celsior solutions. *Cell Transplant* 2003;12:59-68
- 9 Nietsch HH, Roe MW, Fiekers JF, Moore AL, Lidofsky SD. Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor- α role in liver cell death. *J Biol Chem* 2000;275:20556-20561
- 10 Neveux N, De Bandt JP, Fattal E, Hannoun L, Poupon R, Chaumeil JC, Delattre J, Cynober LA. Cold preservation injury in rat liver: effect of liposomally-entrapped adenosine triphosphate. *J Hepatol* 2000;33:68-75
- 11 Zhou HY, Wang F, Zhang KQ, Cheng L, Zhou J, Fu LY, Yao WX. Electrophysiological effects of anthopleurin-Q on rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2004;10:96-99
- 12 Janbaz KH, Gilani AH. Studies on preventive and curative effects of berberine on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 2000;71:25-33
- 13 Gregory RB, Rychkov G, Barritt GJ. Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca^{2+} channels in liver cells and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. *Biochem J* 2001;354(Pt 2):285-290
- 14 Cheng JS, Lo YK, Yeh JH, Cheng HH, Liu CP, Chen WC, Jan CR. Effect of gossypol on intracellular Ca^{2+} regulation in human hepatoma cells. *Chin J Physiol* 2003;46:117-122
- 15 Yule DI, Straub SV, Bruce JL. Modulation of Ca^{2+} oscillations by phosphorylation of Ins(1,4,5)P₃ receptors. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 5):954-957
- 16 Gregory RB, Sykiotis D, Barritt GJ. Evidence that store-operated Ca^{2+} channels are more effective than intracellular messenger-activated non-selective cation channels in refilling rat hepatocyte intracellular Ca^{2+} stores. *Cell Calcium* 2003;34:241-251
- 17 Gregory RB, Barritt GJ. Evidence that Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} channels in rat hepatocytes are required for the maintenance of hormone-induced Ca^{2+} oscillations. *Biochem J* 2003;370(Pt 2):695-702
- 18 Wissing F, Nerou EP, Taylor CW. A novel Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism mediated by neither inositol trisphosphate nor ryanodine receptors. *Biochem J* 2002;361(Pt 3):605-611
- 19 Rychkov G, Brereton HM, Harland ML, Barritt GJ. Plasma membrane Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels with a high selectivity of Ca^{2+} identified by patch-clamp recording in rat liver cells. *Hepatology* 2001;33:938-947
- 20 Kim JS, Qian T, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 2003;124:494-503
- 21 Zhu LP, Yu XD, Ling S, Brown RA, Kuo TH. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in the regulation of apoptotic and necrotic cell deaths. *Cell Calcium* 2000;28:107-117
- 22 Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003;3:527-535
- 23 Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003;125:1246-1257
- 24 Silomon M, Pizanis A, Rose S. Oxyradical-mediated hepatocellular Ca^{2+} alterations during hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 1999;11:193-198
- 25 Sung YJ, Sung Z, Ho CL, Lin MT, Wang JS, Yang SC, Chen YJ, Lin CH. Intercellular calcium waves mediate preferential cell growth toward the wound edge in polarized hepatic cells. *Exp Cell Res* 2003;287:209-218
- 26 Ben Abdennebi H, Steghens JP, Hadj-Aissa A, Barbieux A, Ramella-Virieux S, Gharib C, Boillot O. A preservation solution with polyethylene glycol and calcium: a possible multiorgan liquid. *Transpl Int* 2002;15:348-354
- 27 Jambriana E, Alonso R, Alcalde M, del Carmen Rodriguez M, Serrano A, Martinez AC, Carcia SJ, Izquierdo M. Calcium influx through receptor-operated channel induces mitochondria-triggered paraptotic cell death. *J Biol Chem* 2003;278:14134-14145
- 28 Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:769-781
- 29 Nieminen AL. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol* 2003;224:29-55
- 30 Xu SZ, Zhang Y, Ren JY, Zhou ZN. Effects of berberine of L- and T-type calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 1997;18:515-518

World Journal of Gastroenterology 被国际检索系统收录

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

螺内酯对大鼠肝纤维化及 TGF β_1 TIMP-1 表达的作用

黄欣, 朱纲, 王磊

黄欣, 朱纲, 王磊, 上海市第九人民医院消化内科 上海市 200011
黄欣, 女, 1973-07-19 生, 福建省莆田市人, 汉族, 主治医师。
项目负责人: 黄欣, 200011, 上海市第九人民医院消化内科. huangx201@sina.com.cn
收稿日期: 2004-03-26 接受日期: 2004-04-15

Effects of spironolactone on rat liver fibrosis and expression of transforming growth factor β_1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1

Xin Huang, Gang Zhu, Lei Wang

Xin Huang, Gang Zhu, Lei Wang, Department of Gastroenterology, Ninth People's Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China
Correspondence to: Xin Huang, Department of Gastroenterology, Ninth People's Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China. huangx201@sina.com.cn
Received: 2004-03-26 Accepted: 2004-04-15

Abstract

AIM: To identify the effects of spironolactone on expressions of transforming growth factor β_1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and to evaluate the curative effect of spironolactone.

METHODS: Thirty four male SD rats were randomly divided into 3 groups: Hepatic fibrosis model group: the rats were injected with 400 mL/L CCl₄ 3 mL/kg subcutaneously two times a week; Spironolactone group: the rats were injected with 400 mL/L CCl₄ 3 mL/kg subcutaneously two times a week; Spironolactone equivalent to 20 mg/kg per day was given intragastrically; Normal control group: normal chow. Hepatic tissue was observed with light microscopy to compare histological alterations dynamically. The expression of transforming growth factor β_1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 was detected by RT-PCR.

RESULTS: The grades of fibrosis in spironolactone group were less than those in hepatic fibrosis model group at the end of the week 10 ($P < 0.05$). However, at the end of week 13, there was no significant difference between the two groups. The expression of TGF β_1 and TIMP-1 mRNA was up-regulated when fibrogenesis occurred ($P < 0.05$). Although at the end of week 10 there was an inclination that the levels of TGF β_1 and TIMP-1 mRNA in spironolactone group were less than those in hepatic fibrosis model group, there was no significant difference between two groups.

CONCLUSION: The expression of TGF β_1 and TIMP-1 mRNA is up-regulated significantly when fibrogenesis occurs. Spironolactone may have a fibrogenesis-inhibiting effect on CCl₄-induced hepatic fibrosis in some degree. Spironolactone has no significant effect on the expression of TGF β_1

and TIMP-1 mRNA

Huang X, Zhu G, Wang L. Effects of spironolactone on rat liver fibrosis and expression of transforming growth factor β_1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1604-1607

摘要

目的: 探讨醛固酮受体拮抗剂螺内酯对 TGF β_1 和 TIMP-1 表达的作用, 评价螺内酯的抗纤维化作用。

方法: SD 大鼠 34 只, 随机分为 3 组。肝硬化模型组: 400 mL/L CCl₄ 油 3 mL/kg, sc, 2 次/wk; 螺内酯组: CCl₄ 油注射的同时予螺内酯 20 mg/(kg/d) 灌胃; 正常对照组: 正常饮食、饮水。光镜下动态观察组织学改变, RT-PCR 检测肝组织中 TGF β_1 和 TIMP-1 的表达。

结果: 10 wk 时, 螺内酯组肝纤维化级别显著低于肝纤维化模型组 ($P < 0.05$); 但在 13 wk, 螺内酯组与肝纤维化模型组相比无显著性差异。肝纤维化时 TGF β_1 和 TIMP-1 mRNA 水平与正常组相比显著升高 ($P < 0.05$)。在 10 wk 时, 螺内酯组 TGF β_1 、TIMP-1 mRNA 水平与肝纤维化模型组相比有下降的趋势, 但无显著性差异。

结论: TGF β_1 和 TIMP-1 在肝纤维化时表达显著增加, 螺内酯对肝纤维化有一定程度的抑制作用, 但对 TGF β_1 和 TIMP-1 mRNA 的表达作用不明显。

黄欣, 朱纲, 王磊. 螺内酯对大鼠肝纤维化及 TGF β_1 、TIMP-1 表达的作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1604-1607

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1604.asp>

0 引言

肝损伤时释放转化生长因子 β_1 (TGF β_1) 等可直接激活肝星形细胞 (HSC), 而活化的 HSC 又可自分泌 TGF β_1 进一步发挥作用。在肝纤维化形成过程中, 除了胶原的合成增多外, 胶原降解减少也是一个重要因素。I, II 型胶原主要由基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 降解, 金属蛋白酶组织抑制因子-1 (TIMP-1) 可与 MMP-1 特异性结合而抑制其活性。肝纤维化时 TIMP-1 的表达显著增加^[1-14]。TGF β_1 不仅能促进胶原的合成, 而且可增加 TIMP-1 表达^[15], 因而是肝纤维化过程中关键的细胞因子之一。近年来的研究表明, 除肾上腺外, 心脏、血管、脑、肝、肺、肾等均能合成醛固酮, 并且在器官纤维化中具有重要作用。醛固酮受体拮抗剂螺内酯能有效减轻心脏和肺的纤维化程度^[16-24]。为了探讨螺内酯对肝纤维化的

作用及其机制, 我们研究了螺内酯对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化程度以及肝组织 TGF β_1 和 TIMP-1 表达的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠 34 只, 清洁级, 质量 250-300 g. 购自上海中英合资必凯公司. 随机分为 3 组. 肝纤维化模型组 (15 只): 400 mL/L CCl₄ (精制橄榄油配制) sc, 3 mL/kg, 2 次/wk; 螺内酯组 (13 只): 在 CCl₄ 诱导肝纤维化的同时, 予螺内酯 (溶于蒸馏水中) 20 mg/(kg/d) 灌胃; 正常对照组 (6 只): 正常饮食、饮水. 分别于造模后 10, 13 wk 末处死肝纤维化模型组及螺内酯组大鼠各 6 只, 正常对照组 6 只大鼠全部于 13 wk 末处死. 取肝脏右叶组织, 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色后由同一病理专科医师按文献 [25] 标准进行肝纤维化分级. 0 级正常, 6 级为早期肝硬化. RT-PCR 试剂盒、dNTP、TaqDNA 聚合酶等均为大连 Takara 公司产品. 所用引物由上海生物工程技术有限公司合成. TGF- β_1 引物序列为上游 5' CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGACTGC3', 下游 5' CACGATCATGTTGGACAAGTCTCC 3', 扩增长度 324 bp; TIMP-1 引物序列为上游: 5' GACCTGGTCATAAGGGCTAAA 3', 下游: 5' GCCCGTGATGAGAAACTCTTCACT 3', 扩增长度 219 bp; β -actin 引物序列为上游: 5' GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA 3', 下游: 5' CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC 3', 扩增长度 540 bp.

1.2 方法 大鼠肝组织总 RNA 抽提, 操作步骤按说明书进行. 剪取 50-100 mg 肝组织加入 Trizol 试剂 (美国 Gibco 公司) 溶液 1 mL, 冰浴中彻底匀浆, 在匀浆后的样本中加入氯仿 0.4 mL, 混匀, 冰置 15 min 后 4 12 000 g 离心 15 min. 取上清液, 加入等体积的异丙醇, 混匀, 放置 10 min 后 4 12 000 g 离心 10 min, 弃上清液, 加入 75% 乙醇 1 mL, 混匀, 4 7 500 g 离心 5 min, 弃去上清液. 紫外分光光度计于 260 nm 波长测定 RNA 含量. 然后按逆转录反应试剂盒操作程序进行逆转录合成 cDNA. 取总 RNA 4.5 μ g, 逆转录酶 1 μ L, dNTP 混合物 (10 mmol/L) 2 μ L, oligo dT-Adaptor 引物 1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, 加无 RNA 酶水至总体积 20 μ L. 反应条件: 30 10 min, 42 60 min, 99 5 min, 5

5 min, 合成 cDNA. PCR 扩增反应体系: dNTP 混合物 (10 mmol/L) 0.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μ L, Taq 酶 (5 MU/L) 0.25 μ L, 上下游引物 (20 mmol/L) 各 1 μ L, 逆转录 cDNA 产物 2 μ L, 其余为无 RNA 酶水, 反应总体积 20 μ L. TGF- β_1 扩增参数: 首先 94 预变性 5 min; 然后 94 变性 30 s, 61 退火 1 min, 72 延伸 45 s, 共 35 个循环, 最后 72 10 min 以充分延伸. TIMP-1 扩增参数: 首先 94 预变性 5 min; 之后 94 变性 1 min; 退火 56 2 min; 延伸 72 1.5 min; 共 35 个循环, 最后 72 10 min, 终止反应. 分别以相同条件扩增鼠 β -actin, 作为内参照. 取 15 μ L CR 产物于 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳. 凝胶图像分析系统 (上海天能科技有限公司) 检测 DNA 条带平均灰度值.

统计学处理 等级资料采用 Ridit 检验; 计量资料用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 两组均数比较用 t 检验.

2 结果

肝纤维化模型组大鼠毛色暗淡, 厌食, 消瘦, 尿色深黄, 死亡 3 只. 螺内酯组大鼠毛色较好, 食欲尚可, 质量较重, 死亡 1 只. 正常组大鼠一般情况良好, 无死亡.

2.1 肝纤维化程度 肝纤维化模型组 10 wk 时汇管区纤维组织增生, 伴明显的 P-P 桥 (汇管区间的桥状纤维化) 或 P-C 桥 (汇管区 - 中央静脉间纤维组织增生) 形成, 或可见结节形成. 螺内酯组肝纤维化程度低于模型组, 两组肝纤维化分级有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 1). 13 wk 时, 肝纤维化模型组和螺内酯组均纤维组织增生明显, 肝纤维化分级两组无显著性差异 ($P > 0.05$). 但螺内酯组仅有 1 只大鼠发生肝硬化, 而肝纤维化模型组则有 3 只. 肝硬化发生率有下降的趋势 (表 1) 图 1.

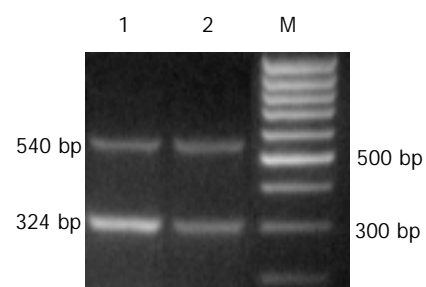


图 1 肝纤维化大鼠肝组织 TGF- β_1 的表达. 1: 肝纤维化 5 级; 2: 肝纤维化 3 级; M: PCR marker.

表 1 病理学改变

t/wk	分组	n	肝纤维化分级						
			0	1	2	3	4	5	6
10	肝纤维化模型组	6	0	0	1	0	0	2	3
	螺内酯组 ^a	6	0	0	2	1	2	1	0
13	肝纤维化模型组	6	0	0	0	0	1	2	3
	螺内酯组	6	0	0	1	3	0	1	1

^a $P < 0.05$, vs 10 wk 肝纤维化模型组.

表2 TGF-β₁, TIMP-1 mRNA 的表达(mean±SD)

t/wk	分组	n	TGFβ ₁	TIMP-1
10	肝纤维化模型组	6	2.0 520 ± 0.7 487 ^a	1.2 721 ± 0.4 866 ^a
	螺内酯组	6	1.3 939 ± 0.3 526 ^b	1.0 044 ± 0.2 101 ^b
13	肝纤维化模型组	6	1.5 429 ± 0.4 725 ^a	1.1 197 ± 0.1 607 ^b
	螺内酯组	6	2.1 679 ± 0.7 825 ^b	1.2 262 ± 0.1 452 ^b
13	正常组	6	0.8 970 ± 0.1 980	0.5 986 ± 0.1 157

^aP <0.05, vs 正常组; ^bP <0.01, vs 正常组.

2.2 TGFβ₁ 和 TIMP-1 mRNA 肝纤维化时 TGFβ₁ 和 TIMP-1 mRNA水平与正常组相比显著升高(P <0.05). 在 10 wk 时, 螺内酯组 TGFβ₁, TIMP-1 mRNA 水平与肝纤维化模型组相比有下降的趋势, 但 10 及 13 wk 两组间表达均无显著性差异(表 2; 图 2-4).

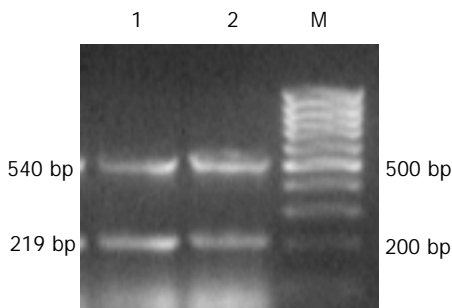


图2 肝纤维化大鼠肝组织 TIMP-1 的表达. 1: 肝纤维化 4 级; 2: 肝纤维化 3 级; M: PCR marker.

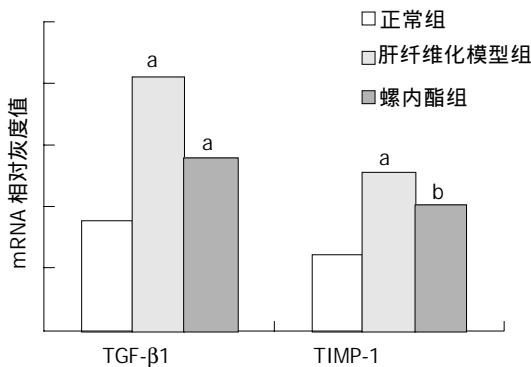


图3 10 wk TGF-β₁, TIMP-1 mRNA 的表达. ^aP <0.05, vs 正常组; ^bP <0.01, vs 正常组

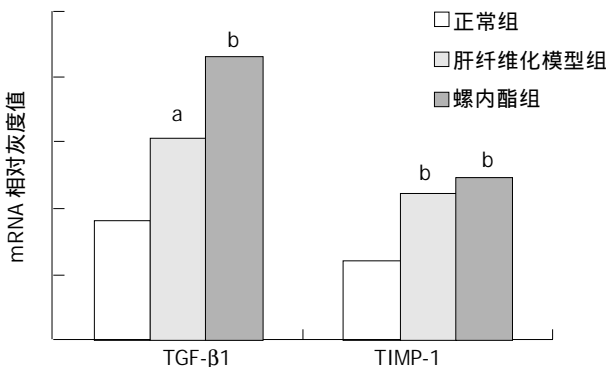


图4 13 wk TGF-β₁, TIMP-1 mRNA 的表达. ^aP <0.05, vs 正常组; ^bP <0.01, vs 正常组

3 讨论

在实验性大鼠肝纤维化的发展过程中, 肝脏编码醛固酮合成酶的 CYP11B₂ 基因表达明显上调. 由于 CYP11B₂ 基因编码的是醛固酮合成后期阶段的关键酶, 因此, 提示醛固酮合成增加与肝纤维化的形成可能有密切关系. 原位杂交显示 CYP11B₂ 定位于肝星状细胞(HSC)内^[26]. 在体外用无血清培养基培养原代 HSC 和 HSC-T6 细胞株, 同样能检测到 CYP11B₂ mRNA 的表达和醛固酮的合成^[27]. 说明 HSC 表达和合成醛固酮. 进一步研究发现, 醛固酮可促进体外培养 HSC-T6 的 α₁ 型前胶原 mRNA 的表达与胶原合成, 并对 TIMP-1 mRNA 的表达也具有促进作用^[28-29].

螺内酯作为醛固酮的拮抗剂, 可通过与醛固酮竞争性结合受体, 以抑制醛固酮的作用. 本结果显示, 在 10 wk 时, 螺内酯组大鼠的肝纤维化程度较模型组明显减轻, 具有统计学意义(P <0.05). 至 13 wk 时, 模型组有 3 只大鼠发生肝硬化, 而螺内酯组仅有 1 只. 从肝纤维化分级来看, 螺内酯组大多处于 2 级(1 只)和 3 级(3 只), 而模型组为 4 级(1 只)和 5 级(2 只). 虽然统计学处理二组之间无显著差异, 但螺内酯组肝硬化的发生率和肝纤维化程度均较模型组有下降趋势. 这可能与实验大鼠数量较少有关, 增加样本量有可能使这一趋势更加明确. 这表明螺内酯对 CCl₄ 诱导的肝纤维化, 特别是在早期具有一定的预防作用, 与文献^[26]报道的一致. 推测在肝纤维化早期, 肝组织中醛固酮的表达量可能相对较少, 因此螺内酯的拮抗作用较为明显, 以后随着病程发展, 醛固酮含量增多, 螺内酯的竞争性抑制作用被削弱. 研究发现^[30], 随着肝纤维化的进展, 醛固酮的生成增加, 对此提供了证据. 此外, 肝纤维化是一个由多种因素共同参与、相互作用的复杂过程, 醛固酮只是其中的因素之一. TGFβ₁, TIMP-1 在肝纤维化时表达显著增加, 但 10 及 13 wk 螺内酯组和模型组间表达均无显著性差异. 提示螺内酯对肝纤维化的抑制作用有可能不是通过直接抑制 TGFβ₁、TIMP-1 的表达实现的. 另外, 我们仅对 TGFβ₁, TIMP-1 的转录水平进行了研究, 还没有观察两个分子在转录后蛋白质水平有无变化. 关于醛固酮对肝纤维化的作用及其机制, 目前尚未完全明了, 有待进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:282-287
- 2 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:86-90
- 3 Zhang BB, Cai WM, Weng HL, Hu ZR, Lu J, Zheng M, Liu RH. Diagnostic value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood mononuclear cells for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2490-2496
- 4 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- 5 Garcia-Tevijano ER, Berasain C, Rodriguez JA, Corrales FJ, Arias R, Martin-Duce A, Caballeria J, Mato JM, Avila MA. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension* 2001;38:1217-1221
- 6 Arthur MJ, Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245-249
- 7 Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabber AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, Urbanski SJ. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998;153:1895-1902
- 8 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549
- 9 Boker KH, Pehle B, Steinmetz C, Breitenstein K, Bahr M, Lichtinghagen R. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver and serum/plasma in chronic active hepatitis C and HCV-induced cirrhosis. *Hepatology* 2000;47:812-819
- 10 Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002;316:71-81
- 11 Melgert BN, Olinga P, Van Der Laan JM, Weert B, Cho J, Schuppan D, Groothuis GM, Meijer DK, Poelstra K. Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):719-728
- 12 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;113:443-453
- 13 Murawaki Y, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1. *Clin Chim Acta* 1999;281:109-120
- 14 Lichtinghagen R, Breitenstein K, Arndt B, Kuhbacher T, Boker KH. Comparison of matrix metalloproteinase expression in normal and cirrhotic human liver. *Virchows Arch* 1998;432:153-158
- 15 Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997;150:1647-1659
- 16 Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, Fujii M, Taniguchi A, Hamatani T, Nozato Y, Kataoka K, Morigami N, Ohnishi M, Kinoshita M, Horie M. Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:2559-2565
- 17 Mandarim-de-Lacerda CA, Pereira LM. The effects of spironolactone monotherapy on blood pressure and myocardial remodeling in spontaneously hypertensive rats: a stereological study. *J Biomed Sci* 2003;10:50-57
- 18 Pereira LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Myocardial changes after spironolactone in spontaneous hypertensive rats. A laser scanning confocal microscopy study. *J Cell Mol Med* 2002;6:49-57
- 19 Gallego M, Espina L, Vegas L, Echevarria E, Iriarte MM, Casis O. Spironolactone and captopril attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats. *Pharmacol Res* 2001;44:311-315
- 20 Miric G, Dallemagne C, Endre Z, Margolin S, Taylor SM, Brown L. Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2001;133:687-694
- 21 Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Matsui T, Kinoshita M. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1228-1233
- 22 Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000;102:2700-2706
- 23 Sato A, Suzuki Y, Saruta T. Effects of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 1999;22:17-22
- 24 赵力, 赵鸣武, 方秋红, 顾国忠, 唐朝枢. 安体舒通减轻博莱霉素 A₅ 引起的大鼠肺纤维化. *中华结核和呼吸杂志* 1998;21:300-302
- 25 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RNM, Phillips MJ, Portmann BG, Poulson H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699
- 26 李旭, 孟莹, 杨希山, 吴平生, 张虹, 李素梅, 赖文岩. 肝星状细胞表达醛固酮合成酶基因及安体舒通抗肝纤维化的研究. *中华肝脏病杂志* 2001;9:75-77
- 27 张晶, 宗春华, 李定国, 邹仁建, 杜学亮, 徐芹芳, 陆汉明. 肝星形细胞存在局部肾素-血管紧张素-醛固酮系统. *中华消化杂志* 2003;23:38-40
- 28 Rombouts K, Niki T, Wielant A, Hellemans K, Schuppan D, Kormoss N, Geerts A. Effect of aldosterone on collagen steady state levels in primary and subcultured rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001;34:230-238
- 29 王磊, 刘海林, 黄欣, 朱纲. 醛固酮对肝星状细胞 I 型胶原合成及组织金属蛋白酶抑制因子-1 mRNA 表达的作用. *中华肝脏病杂志* 2004;12:308-310
- 30 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

热盐水致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜 COX-2 的表达

陶梅, 张沥, 张玲霞, 江梅, 曹广周

陶梅, 西安交通大学医学院 陕西省西安市 710061
张沥, 张玲霞, 江梅, 曹广周, 西安市中心医院消化科 陕西省西安市 710003
陶梅, 女, 1970-11-15 生, 陕西省安康市人, 汉族, 1995 年西安交通大学医学院临床医学系学士, 2001 级西安交通大学硕士生。
项目负责人: 张沥, 710003, 陕西省西安市中心医院消化科。
电话: 029-7218916-3061
收稿日期: 2004-03-23 接受日期: 2004-04-16

Expression of COX-2 in gastric mucosa of atrophic gastritis caused by hot high-salt water in rats

Mei Tao, Li Zhang, Ling-Xia Zhang, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao

Mei Tao, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Li Zhang, Ling-Xia Zhang, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao, Department of Gastroenterology, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Li Zhang, Department of Gastroenterology, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China. wu-taomei@163.com
Received: 2004-03-23 Accepted: 2004-04-16

Abstract

AIM: To measure the expression of COX-2 in gastric mucosa of chronic atrophic gastritis (CAG) caused by hot high-salt water in rats and to study the pathogenesis of atrophic gastritis caused by hot high-salt diet.

METHODS: The atrophic gastritis rat model was made by hot high-salt water ig perfusion. The expression of COX-2 in gastric mucosa in 4, 8, 12, and 32 wks was detected by immunohistochemical method and the PEG2 levels were tested by ELISA.

RESULTS: All the model group rats formed CAG at the end of 12 weeks with the following pathological changes of CAG under microscope, such as thin mucosa layer, thick muscle layer, decreased glands, and infiltration of inflammatory cells. With the time prolonging, the atrophy of gastric mucosa became more seriously. There was little or no expression of COX-2 in gastric mucosa in normal control group. While in hot high-salt water perfusion group, there was a little expression from the 8th week, and over expression in 12th week. There was a significant difference between the two groups ($4.5 \pm 2.1\%$, vs $14.7 \pm 5.7\%$, $P < 0.05$). The expression of COX-2 increased with the time and it reached the peak value in the 32th week. The PEG2 levels in hot high-salt water perfusion group increased in the 12th week. There was a significant difference between the two groups (125.6 ± 21.2 ng/g vs 188.4 ± 37.6 ng/g, $P < 0.05$), and it reached the peak value in the 32th week.

CONCLUSION: COX-2 plays an important role in the formation of atrophic gastritis and alteration of diet habitation may help prevent the formation of atrophic gas-

tritis and gastric cancer.

Tao M, Zhang L, Zhang LX, Jiang M, Cao GZ. Expression of COX-2 in gastric mucosa of atrophic gastritis caused by hot high-salt water in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1608-1611

摘要

目的: 检测热盐水灌胃导致的大鼠萎缩性胃炎(CAG)胃黏膜组织 COX-2 的表达情况, 探讨长期热咸饮食造成萎缩性胃炎的机制。

方法: 用热盐水灌胃建立大鼠萎缩性胃炎动物模型, 用免疫组化方法检测各实验组 4, 8, 12, 32 wk 胃黏膜组织 COX-2 的表达情况, 用 ELISA 方法检测胃黏膜组织 PGE2 的含量。

结果: 灌胃至 12 wk 时出现胃黏膜层变薄, 固有层腺体减少, 固有层纤维结缔组织增生, 黏膜肌层明显增生, 慢性炎症细胞浸润等萎缩性胃炎表现。随着热盐水灌胃时间的延长, 32 wk 胃黏膜萎缩程度明显加重。正常对照组大鼠胃黏膜组织细胞 COX-2 蛋白不表达或仅有微量表达; 实验组 8 wk 开始有少量表达, 12 wk 胃黏膜出现萎缩时, COX-2 表达明显增加, 与正常组相比具有显著差异 ($4.5 \pm 2.1\%$ vs $14.7 \pm 5.7\%$, $P < 0.05$)。后随着灌胃时间的延长, COX-2 的表达持续性上升, 32 wk 达高峰。实验组 12 wk PGE2 水平升高, 与正常组相比有显著差异 (125.6 ± 21.2 ng/g vs 188.4 ± 37.6 ng/g, $P < 0.05$), 32 wk 升至最高。

结论: 在热盐水引起的大鼠萎缩性胃炎的形成和发展过程, COX-2 扮演了重要角色, 提示热咸饮食可导致萎缩性胃炎的发生, 而改变喜食高盐热烫的饮食习惯将有助于预防萎缩性胃炎及胃癌的发生。

陶梅, 张沥, 张玲霞, 江梅, 曹广周. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜 COX-2 的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1608-1611
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1608.asp>

0 引言

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是合成前列腺素(PGs)的关键酶。COX 有两种, COX-1 是结构酶, 其产生的前列腺素与胃肠黏膜的完整性相关。COX-2 是诱导型酶, 参与炎症等病理反应过程^[1-2]。最近许多研究表明, COX-2 的表达和胃肠道肿瘤发生相关^[3-12]。慢性萎缩性胃炎属癌前状态, 他是胃癌发生的重要环节。为此, 我们对热盐水所致的大鼠萎缩性胃炎胃黏膜 COX-2 表达进

行动态观察,探讨热咸饮食对胃黏膜COX-2表达的影响及其与萎缩性胃炎形成的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 健康、性成熟7周龄SD大鼠56只,体重170-200g,由第四军医大学动物实验中心提供;SP即用型试剂盒、生物素化的二抗由北京中山公司提供;COX-2一抗、PGE2 ELISA试剂盒由R & D公司提供;吲哚美辛购自Sigma公司;其余化学试剂均购自第四军医大学;全自动酶联免疫分析仪由Tecan公司提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠萎缩性胃炎动物模型的制作 SD大鼠56只,采用架式笼养,恒温 24 ± 1 ,湿度50-60%。按随机化原则分为2组,正常对照组24只,25 蒸馏水2.5 mL灌胃,1次/d;实验组32只,55 150 g/L盐水2.5 mL灌胃,1次/d进行造模^[13],制模过程中每隔4 wk,处死对照组和模型组大鼠各4只,观察胃黏膜动态变化。制模成功后,处死模型组和对照组各一半大鼠,其余继续按上述方法喂养至32 wk处死。用10 g/L的戊巴比妥钠5 mL/kg腹腔注射麻醉动物,取出鼠胃,沿大弯剪开胃腔,生理盐水冲净,然后沿小弯侧全层切取一段长1 cm宽0.5 cm的胃窦及部分胃体组织,置于40 g/L中性甲醛溶液中固定24 h,石蜡包埋,HE染色,进行病理组织学观察。参照1994年美国休斯顿胃炎诊断分类标准及井冈山会议胃炎诊断分类标准对胃窦、胃体黏膜组织学各项指标进行评定,组织切片由专人采取盲法阅片。部分切片作免疫组化检测,并留取新鲜标本置液氮中保存,待测PGE2。

1.2.2 COX-2蛋白的免疫组织化学检测 采用SP即用

型试剂盒,一抗工作浓度1 300。切片常规脱蜡至水,在pH6.0的枸橼酸缓冲液中热修复抗原10 min,自然冷却,30 mL/L H₂O₂封闭30 min,正常山羊血清37 封闭30 min,滴加一抗4 过夜,次日滴加生物素化羊抗兔IgG,37 ,30 min,滴加SABC复合物,37 ,30 min,DAB显色。以上各步骤除血清孵育后甩干血清直接加一抗外,均以PBS洗涤3次,5 min/次。显微镜观察显色满意后自来水冲洗5 min,苏木精复染,脱水透明封片。实验中以PBS代替一抗作为阴性对照,以人结肠癌细胞COX-2为阳性对照。高倍镜下选取5个有代表性的视野(阳性细胞较多)计数,胞质出现棕黄色颗粒为COX-2阳性细胞,每个视野观察100个细胞,计算阳性细胞的平均表达率。即阳性细胞占总细胞的百分比,未被染色或阳性细胞数<5%的视野视为阴性。

1.2.3 胃黏膜组织PGE2检测 胃黏膜组织置于含有28 mmol/L吲哚美辛(防止试验过程中新生成前列腺素)的Krebs液中,匀浆、离心,取上清,PGE2测定ELISA试剂盒,根据试剂盒提供的标准步骤测定,由ELISA自动读数仪测定及计算,结果以黏膜蛋白中ng/g PGE2表示。

统计学处理 采用t检验,用SPSS统计软件分析。

2 结果

2.1 大鼠萎缩性胃炎模型的建立 灌胃至12 wk时出现胃黏膜层变薄,固有层腺体减少,固有层纤维结缔组织增生,黏膜肌层明显增生,慢性炎细胞浸润等萎缩性胃炎表现,随着热盐水灌胃时间的延长,32 wk胃黏膜萎缩程度明显加重(图1)。

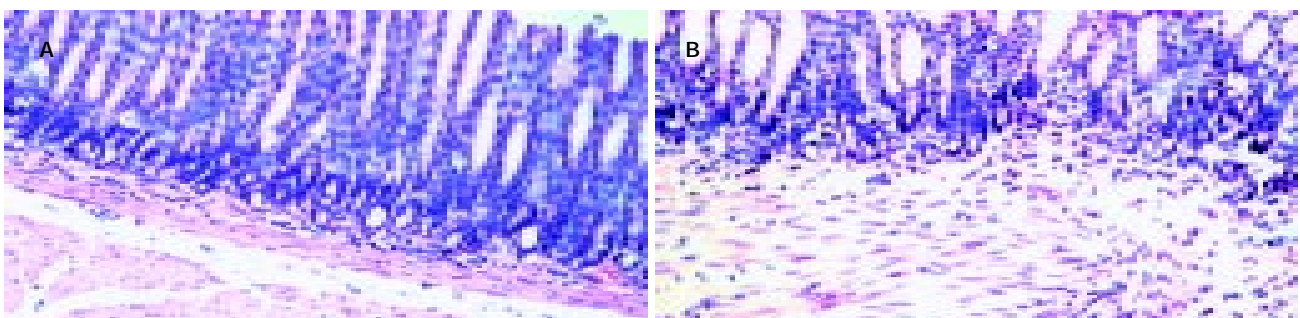


图1 萎缩性胃炎大鼠胃黏膜HE × 200。A: 正常大鼠胃黏膜; B: 实验组12 wk。

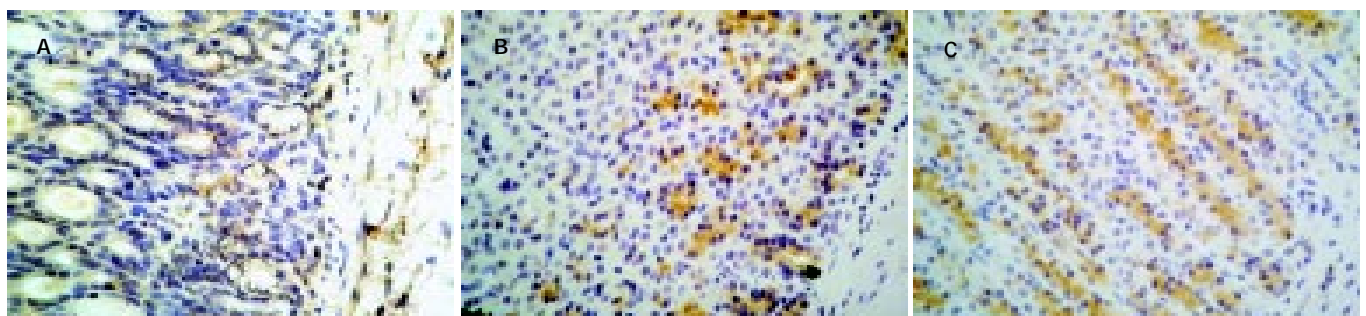


图2 大鼠胃黏膜COX-2蛋白表达SP × 400。A: 正常对照组; B: 实验组12 wk; C: 实验组32 wk。

表1 大鼠胃黏膜 COX-2 的表达和 PGE2 的水平(mean±SD)

指标	分组	4 wk	8 wk	12 wk	32 wk
COX-2	正常对照	4.2 ± 2.6	3.8 ± 2.9	4.5 ± 2.1	5.7 ± 3.7
(%)	实验	5.6 ± 2.3	8.6 ± 4.2	14.7 ± 5.7 ^a	27.6 ± 8.2 ^{bc}
PGE2	正常对照	113.5 ± 11.5	137.1 ± 20.4	125.6 ± 21.2	141.0 ± 33.2
(ng/g)	实验	140.3 ± 20.8	168.1 ± 35.2	188.4 ± 37.6 ^a	266.2 ± 47.5 ^{bc}

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs 正常对照组; ^cP < 0.05, vs 12 wk 实验组.

2.2 COX-2 免疫组织化学检测结果 COX-2 蛋白阳性反应物为棕黄色, 主要位于胞质. 正常对照组大鼠各周胃黏膜组织细胞 COX-2 蛋白不表达或仅有微量表达, 实验组大鼠在 8 wk 开始有少量表达, 12 wk 胃黏膜出现萎缩时, COX-2 表达明显增加, 主要位于固有层腺体, 胞质出现棕黄色颗粒, 弥漫性分布, 与正常组相比具有显著差异. 后随着灌胃时间的延长, COX-2 的表达持续性上升, 32 wk 达高峰(表 1, 图 2).

2.3 胃黏膜组织 PGE2 检测结果 实验组 12 wk PGE2 水平升高, 与正常对照组相比有显著差异, 32 wk 升至最高, 与 12 wk 相比差异也有显著性(表 1).

3 讨论

研究表明, 正常胃黏膜无 COX-2 表达, 而肠化生、不典型增生和腺瘤样上皮组织中 COX-2 的表达明显增高, 提示 COX-2 的过表达可能是胃癌的早期事件^[14-15]. 本结果表明, 热盐水刺激形成萎缩性胃炎过程中, 胃黏膜中 COX-2 的表达逐渐增强, 并且随萎缩程度加重, COX-2 的表达呈持续性上升, PGE2 的水平也同时升高, 提示在萎缩性胃炎这一胃癌前状态发生过程中, COX-2 呈现了过度表达. COX-2 的过表达诱发肿瘤发生的机制尚不清楚. 动物实验发现 COX-2 的表达增加了 PGE2 的合成^[16], 这与本结果一致. PGE2 可诱导细胞增生并刺激 bcl-2 蛋白表达, 后者抑制细胞凋亡, 使细胞增生和细胞凋亡失衡而促进肿瘤发生^[16-17]. 张玲霞 et al^[18] 研究发现, 在热盐水灌胃引起大鼠萎缩性胃炎过程中, 细胞增生指数和凋亡指数均明显升高, 其调控基因 Bcl-2 和 Fas 也呈现高表达. 因此, 热盐水可能通过诱导 COX-2 的高表达而改变细胞某些增生和凋亡基因的表达, 使细胞增生和细胞凋亡失衡, 从而促进胃黏膜上皮细胞的恶性转化. COX-2 的高表达还可通过抑制 NK, LAK, TCL 细胞活性, 使免疫监视功能下降, 导致肿瘤发生. 另外, COX-2 有过氧化酶活性, 可使致癌剂发生氧化反应, 从而导致致癌剂激活.

慢性萎缩性胃炎是胃癌前状态, 与胃癌的发生密切相关^[19-34]. 流行病学调查显示, 长期高盐饮食可导致萎缩性胃炎, 甚至胃癌的发生^[35]. 动物实验也证实长期过热饮食可引起大鼠胃黏膜萎缩^[36]. 最近的调查显示, 高盐和热烫饮食是上海市居民胃癌的危险因子^[37]. 本结果提示, 热咸饮食在短期内可导致大鼠萎缩性胃炎的发

生, COX-2 呈现了过度表达现象, 同时伴有 PGE2 升高. 本研究结果提示, 在萎缩性胃炎这一胃癌前状态发生发展过程中, COX-2 发挥着极其重要的作用, 这为胃癌前状态和胃癌的预防提供了新的思路, 也同时提示改变喜食热烫高盐的饮食习惯有助于预防萎缩性胃炎和胃癌的发生.

4 参考文献

- 1 姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟. 环氧合酶-2 与结直肠癌. 世界华人消化杂志 2003;11:1447-1450
- 2 Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001;107:1491-1495
- 3 Patrono C, Patrignani P, Garcia Rodrigues LA. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J Clin Invest* 2001; 108:7-13
- 4 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001;76:26-30
- 5 Oshima M, Taketo MM. COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharm Des* 2002;8:1021-1034
- 6 Han SL, Tang HJ, Hua YW, Ji SQ, Lin DX. Expression of COX-2 in stomach cancers and its relation to their biological features. *Dig Surg* 2003;20:107-114
- 7 Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tsunozaki H, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;91:1876-1881
- 8 Tsunozaki H, Yoshinaga K, Kumagai J, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 overexpression in colorectal cancer is associated with non-poly-poid growth. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:167-171
- 9 Hasegawa K, Ichikawa W, Fujita T, Ohno R, Okusa T, Yoshinaga K, Sugihara K. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in human colorectal adenomas. *Eur J Cancer* 2001;37:1469-1474
- 10 Chapple KS, Scott N, Guillou PJ, Coletta PL, Hull MA. Interstitial cell cyclooxygenase-2 expression is associated with increased angiogenesis in human sporadic colorectal adenomas. *J Pathol* 2002;198:435-441
- 11 Weaver SA, Russo MP, Wright KL, Kolios G, Jobin C, Robertson DA, Ward SG. Regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase on TNF-alpha-induced cyclooxygenase 2 expression in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;120:1117-1127
- 12 Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1101-1112
- 13 张沂, 张玲霞, 徐俊荣, 曹广周, 江梅, 张宁霞, 贾长河. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2002;10: 571-574
- 14 宋家锋, 严荣华, 陈振依, 洪瑞香. 环氧合酶-2 表达与幽门螺杆菌相关性胃十二指肠疾病的研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003; 12:556-559
- 15 陆红, 陈晓宇, 刘文忠, 彭延申, 萧树东. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜环氧合酶-2 表达的影响. 中华消化杂志 2001;21:287-289

- 16 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 17 Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs* 2002;13:127-137
- 18 张玲霞, 张沥, 徐俊荣, 贾长河, 张宁霞, 曹广周. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞凋亡及其调控基因蛋白表达影响的实验研究. *陕西医学杂志* 2003;32:210-212
- 19 Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, Kato M, Takeda H, Graham DY. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. *Helicobacter* 2001;6:294-299
- 20 El-Zimaity HM, Ota H, Graham DY, Akamatsu T, Katsuyama T. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94:1428-1436
- 21 汪波, 石灵春, 张维彬, 肖楚梅, 吴继锋, 董聿明. 胃癌及癌前病变中抑癌基因 p16 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:39-42
- 22 程时丹, 吴云林, 章永平, 乔敏敏, 郭强苏. 胃癌多耐药细胞药物积累的异常. *世界华人消化杂志* 2001;9:131-134
- 23 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:302-307
- 24 俞丽芬, 吴云林, 章永平. 鸦胆子油乳剂对人胃腺癌长春新碱耐药细胞株 MKN28/VCR 的逆转作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:376-378
- 25 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
- 26 姚希贤, 尹雷, 张杰英, 白文元, 李英敏, 孙中成. 胃癌及癌前病变 hTERT 的表达与细胞免疫功能. *世界华人消化杂志* 2001;9:508-512
- 27 孔祥东, 张思仲, 胡建坤, 肖翠英, 孙岩, 夏庆杰. 原发胃癌中 p15 基因及蛋白表达的异常. *世界华人消化杂志* 2001;9:513-516
- 28 任娟, 董蕾, 潘伯荣, 徐仓宝, 李明众. 人胃癌细胞与血管内皮细胞间的相互作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:1254-1260
- 29 罗奋, 孙建龙, 任大明, 蔡端, 沈敏. 温热对人胃癌细胞株端粒酶活性及其相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:1261-1264
- 30 冯润华, 李建芳, 刘炳亚, 朱正纲, 尹浩然. 人胃癌细胞端粒酶 RNA 组分 hTR 基因片段的克隆及其正反义真核表达载体的构建. *世界华人消化杂志* 2001;9:1409-1414
- 31 万顺梅, 孙少华, 邓明德, 葛勤利, 杨玉捷. 胃癌组织中转化生长因子和血小板源生长因子表达的意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:36-39
- 32 王消冰, 王绪, 张南征. 奥曲肽抑制人胃癌细胞株 MKN45 的生长. *世界华人消化杂志* 2002;10:40-42
- 33 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. hTERT 反义基因对胃癌细胞端粒酶及凋亡相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:149-152
- 34 郑志红, 孙秀菊, 邱广蓉, 刘言厚, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前和发展阶段中 E-cadherin 基因的突变. *世界华人消化杂志* 2002;10:153-156
- 35 Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, King A, Koh TJ, Wang TC. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1999;59:4823-4828
- 36 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 曹广周, 张宁霞, 江梅, 贾长河. 热盐水致萎缩性胃炎形成的实验. *第四军医大学学报* 2003;24:1355-1355
- 37 鲍萍萍, 高立峰, 刘大可, 陶梦华, 金凡. 上海市居民饮食与胃癌关系的病例对照研究. *中国肿瘤* 2003;12:66-70

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

• 消息 •

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

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

同种和异种混合淋巴细胞反应及分类混合淋巴细胞反应的比较

王英禹, 王云杰, 张 瑞

王英禹, 王云杰, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸腔外科 陕西省西安市 710038
张瑞, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院药剂科 陕西省西安市 710038
王英禹, 男, 1971-10-02 生, 甘肃省兰州市人, 汉族, 第四军医大学胸腔外科博士生.
项目负责人: 王英禹, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸腔外科. eddyfmmu@yahoo.com.cn
电话: 029-83536752
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-04-27

Comparison of mixed lymphocytic reactions to both xenogenic murine and allogenic human lymphocytes

Ying-Yu Wang, Yun-Jie Wang, Rui Zhang

Ying-Yu Wang, Yun-Jie Wang, Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Rui Zhang, Department of Pharmacy, Tangdu Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Ying-Yu Wang, Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. eddyfmmu@yahoo.com.cn
Received: 2004-04-04 Accepted: 2004-04-27

Abstract

AIM: To compare the mixed lymphocyte reactions (MLR) of human lymphocytes response to xenogenic murine lymphocytes and the allogenic human lymphocytes *in vitro*.

METHODS: Xeno-and allo- MLRs were set up and cellular classification study of xeno- and allo- MLRs were performed.

RESULTS: Human T cells response to xeno-cells was weaker than to allo-cells ($P < 0.05$). Cellular classification study indicated that it was mainly CD4+ T cell involved in both allo- and xeno-MLRs, the former through direct and indirect pathways and the latter through indirect pathway. In addition, CD8+ T cell was involved in the reaction as well.

CONCLUSION: Xeno-MLR is weaker than allo-MLR. Xenogenic cells can only stimulate T cells through indirect pathway. Both MLRs share similar requirements for APCs, and human CD4 T cells are the major response cells.

Wang YY, Wang YJ, Zhang R. Comparison of mixed lymphocytic reactions to both xenogenic murine and allogenic human lymphocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1612-1615

摘要

目的: 对比体外人外周血淋巴细胞对于异种小鼠细胞和同种

异体细胞混合淋巴细胞反应。

方法: 建立异种 - 同种混合淋巴细胞反应模型, 进行分类细胞反应试验。

结果: 人外周血淋巴细胞对于异种小鼠细胞的反应明显低于对于同种异体细胞的反应($P < 0.05$)。细胞分类研究显示: 在异种混合淋巴细胞反应中, 主要是CD4+ T细胞通过间接途径受小鼠抗原刺激而增生; 在同种混合淋巴细胞反应中, 主要是CD4+ T细胞通过直接途径受同种异体抗原刺激而增生。在两种混合淋巴细胞反应中, CD8+ T细胞也参与。

结论: 异种混合淋巴细胞反应弱于同种混合淋巴细胞反应, 异种细胞只通过间接途径刺激T细胞。同种和异种混合淋巴细胞反应均需要抗原提呈细胞参与, CD4+T淋巴细胞是反应的主要细胞。

王英禹, 王云杰, 张瑞. 同种和异种混合淋巴细胞反应及分类混合淋巴细胞反应的比较. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1612-1615

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1612.asp>

0 引言

移植排斥与组织相容性抗原密切相关, T细胞能直接识别同种移植物的组织相容性抗原。移植时, 供体抗原可以通过多种途径激活受体的免疫应答系统, 产生免疫应答, 激活淋巴细胞, 发生移植排斥。其中包括: CD4+ 细胞与 MHC II 抗原反应; CD8+ 细胞与 MHC I 抗原反应。细胞间的反应被两种不同但是相关的途径介导: 直接途径和间接途径。直接途径是T细胞直接作用于完整的同种异源供体细胞的 MHC 分子, 引起免疫应答的途径; 间接途径是供体的抗原通过受体的抗原提呈细胞上的 MHC 分子作用于 T 细胞, 引起免疫应答的途径。在异种移植排斥反应中, T 细胞激活途径尚不完全清楚, 本试验对此进行了深入的研究。

1 材料和方法

1.1 材料 10 个无关自愿者的血(JR 医院, 牛津, 英国)用来准备人外周血单个核细胞(PBMC)。Harlan-Olac 试验用小鼠, 6 周龄。(1)外周血单个核细胞 / 淋巴细胞(PBMC)的置备 将甘素化的新鲜去红细胞混悬液室温下加入等量 PBS 混匀, 每 10 mL 去红细胞 / PBS 混悬液中加入 Ficoll-Hypaque 液 3 mL。18⁰⁰⁰, 2 000 r/min, 离

心 30 min. 移除上层的血浆和血小板, 3 倍体积的 HBSS 冲洗细胞, 18 \times 1 300 r/min, 离心 10 min. 去除上清液. HBSS 重新混匀细胞、冲洗并离心 1 次, 去除上清液. HBSS 重新混匀细胞、冲洗并离心 1 次, 去除上清液. 混悬细胞于 RPMI-10. 用胎盘蓝计量细胞的活性. (2) 小鼠脾细胞混悬液的置备 处死小鼠, 摘取脾置于 60 \times 15-mm petri 皿中剪碎, 加入 RPMI-10 3 mL; 碾磨组织碎块至仅有结蒂组织存留; 用 6 mL 注射器和 19G 针头反复抽吸数次, 进一步离散组织; 200 μ m 尼龙网过滤组织; 加入 RPMI-10 5 mL; 18 \times 1 000 r/min, 离心 10 min, 去除上清液, 混悬细胞沉淀于 RPMI-10 20 mL, 重复离心 1 次, 混悬细胞沉淀于 RPMI-10 5 mL; 加入红细胞溶解缓冲液 5 mL; 室温下孵育 5 min; 加入 PBS 冲洗细胞, 室温下, 1 000 r/min, 离心 10 min, 去除上清液. 重复此步骤. 混悬细胞沉淀于适量 RPMI-10 备用. (3) 刺激细胞的制备: 将准备用作刺激用细胞置入 ^{60}Co 罐中 15 s, 接受约 20Gy 的放射线照射灭活.

1.2 方法 基础混合淋巴细胞反应 (MLR) 的建立: 计数人外周血淋巴细胞 (PBMC) 和小鼠的脾单细胞混悬液, 用 RPMI-10 AB 调整他们的细胞密度至 $2.5 \times 10^9/\text{L}$; 调整刺激用细胞密度至 $2.5 \times 10^9/\text{L}$; 分装反应细胞至 96 孔微滴度板: 每个反应小孔中分装 100 μ L 人外周血单核细胞 (每个实验条件准备 3 个小孔); 加入 100 μ L 照射后的刺激细胞之相应的小孔中 (人外周血单核细胞和小鼠的脾单细胞混悬液), 使用 RPMI-10AB 100 μ L 和 PMA 100 μ L 分别作为阴性和阳性对照; 放入潮湿的 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 孵箱中孵育; 分别在 2、4 和 6 d 进行 ^3H 掺入, 3、5 和 7 d 收获细胞. 在终止细胞培养前 18 h 每个培养孔中加入 1.85GBq/L ^3H 胸腺嘧啶 (总量 37MBq) 20 μ L; 使用多孔细胞收获仪吸取、溶解细胞并转移 DNA 至滤纸, 洗掉未结合的 ^3H 胸腺嘧啶; 将滤纸放入样品袋, 加入 scintillation 混合液 5 mL 并密封; 在 scintillation 计数仪中计数样品直至标准误 2%. 计数背景和不同试验条件下平均 cpm. 相同条件下不同培养孔间差异应小于 20%. 人和小鼠淋巴细胞的筛选, CD4 和 CD8 细胞的分离 使用 Miltenyi Biotec 公司 (USA) 提供的试剂盒及磁性分离仪和方法.

统计学处理 使用 SPSS 11.0 软件分析, 所用统计方法为 Kruskal-Wallis 检验. 采用 EXCEL 软件作图.

2 结果

2.1 原发异种 / 同种混合淋巴细胞反应筛选时间点 对细胞活性、各种细胞之间的反应及反应持续时间进行试验 (图 1). 醋酸豆蔻酸佛波醇 (PMA) 刺激细胞分裂增生明显, 在第 3 d 达到最高, 以后逐步下降, 说明细胞有分裂增生的能力. 异种刺激细胞 (XS) 不增生, 说明照射后小鼠脾细胞丧失了分裂增生的能力. 未加入刺激的人外周血淋巴细胞 (R) 增生很弱; 加入经照射的同种刺激细胞 (AS)、异种刺激细胞 (XS) 的人外周血淋巴细胞均分裂增生活跃, 前者刺激细胞分裂增生的能力更强, 他们

均使细胞分裂增生在 5-7 d 达到最高, 因此我们选择该时间点建立基础混合淋巴细胞反应.

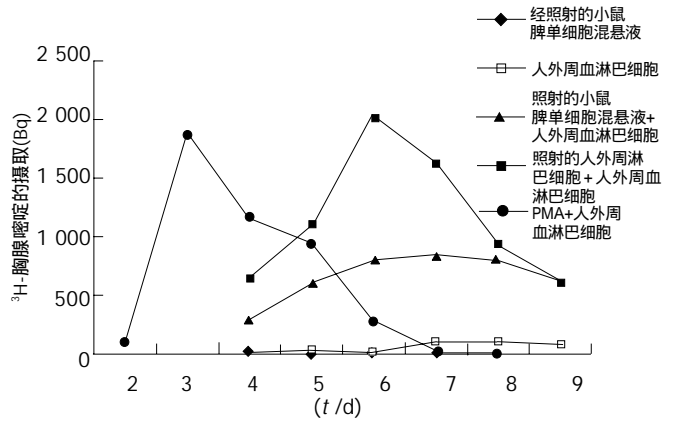


图 1 原发异种 / 同种混合淋巴细胞反应的连续时间点试验及结果.

2.2 原发异种 - 同种混合细胞反应的对比 照射的人外周血淋巴细胞 (AS) 和小鼠的脾单细胞混悬液 (XS) 作为阴性对照, PMA 刺激作为阳性对照. 人外周血淋巴细胞 (R) 作为反应细胞. 对比原发异种 - 同种混合淋巴细胞反应. 第 5 d, 未加入刺激的人外周血淋巴细胞分裂增生很低, 反应了细胞在培养液中自然分裂增生的能力, 与加入刺激物组对比有显著差异 ($P < 0.01$ 图 2), 说明这种自然的分裂增生对于对比加入同种和异种刺激物的混合淋巴细胞反应干扰很小; 同种混合淋巴细胞反应 (AS+R) 组明显高于异种混合淋巴细胞反应 (XS+R) 组, 说明经照射的人外周血淋巴细胞的刺激作用明显强于经照射的小鼠的脾单细胞混悬液, 他们之间存在显著差异 ($P < 0.05$). 第 7 d, 同种混合淋巴细胞反应 (AS+R) 组和异种混合淋巴细胞反应 (XS+R) 组反应均升高. AS+R 组明显高于 XS+R 组, 他们之间存在显著差异 ($P < 0.05$). 第 7 d 与第 5 d 的反应结果相似, 证实了原发异种 - 同种混合淋巴细胞反应模型中各个细胞间相互反应的能力. 通过这组试验说明同种混合淋巴细胞反应明显高于异种混合淋巴细胞反应.

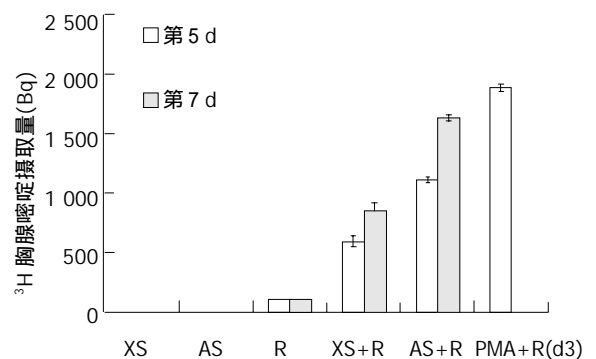


图 2 原发异种 - 同种混合淋巴细胞反应第 5, 7 d 结果.

2.3 原发异种 - 同种混合细胞反应第 5 d 比较 用不同的刺激细胞进行刺激, 以了解原发异种 - 同种混合淋巴细胞反应在不同个体之间的差异. 3 只小鼠的脾单细

胞混悬液(XS₁₋₃)分别刺激3个不同个体的外周血淋巴细胞(R₁₋₃)和3个不同个体的外周血淋巴细胞(AS₁₋₃和R₁₋₃)相互刺激之间的比较(图3A-C). 不同的小鼠脾单细胞混悬液(XS)刺激同一人血样中的淋巴细胞(R), 反应结果相似, 说明对于人淋巴细胞而言, 不同小鼠个体的刺激作用间个体差异不明显; 不同的人外周血淋巴细胞(AS)刺激同一人血样中的淋巴细胞(R), 反应结果相似, 说明对于人细胞而言, 不同人个体的刺激作用间个体差异不明显; 同种混合淋巴细胞反应(AS+R)组反应结果明显高于异种混合淋巴细胞反应(XS+R)组, 说明人外周血淋巴细胞的刺激作用强于小鼠的脾单细胞混悬液.

2.4 CD4+/CD4- 细胞作为反应细胞的混合淋巴细胞反应 分别用CD4+ 和CD4- 细胞作为反应细胞(图4). 我们发现 XS+R(CD4+)与R组细胞分裂增生相似, 无差异显著(P >0.05), 说明CD4+T 细胞不能被异种细胞直接激活, 证实在异种混合淋巴细胞反应中CD4+T 细胞不能通过直接途径激活; XS+R(CD4-)组细胞分裂增生高于R组(P <0.05), 说明异种细胞能刺激CD4- 细胞(含APC的CD8+T 细胞)分裂增生; XS不能刺激CD4+T 细胞但是可以刺激CD4- 细胞分裂增生, 因为前者不含APC而后者内有APC和CD8+ 细胞; AS+R(CD4+)组高于R组(P <0.05), 说明同种细胞可以直接刺激CD4+T 细胞分裂增生; AS+R(CD4-)组高于R组(P <0.05), 说明同种细胞能刺激CD4- 细胞(含APC的CD8+T 细胞)分裂增生; AS+R(CD4+)组远远高于AS+R(CD4-)组(P <0.05), 说

明CD4+T 细胞是同种混合淋巴细胞反应中的主要反应细胞, 对CD4+ 和CD4- 细胞, AS均可刺激分裂增生, 前者明显强于后者, AS本身含有APC, 而发生分裂增生的主要是CD4+T 细胞. 同种混合淋巴细胞反应中淋巴细胞激活存在直接和间接两种途径, 直接途径在同种混合淋巴细胞反应中发挥了重大作用.

2.5 CD8+/CD8- 细胞作为反应细胞的MLR 分别用CD8+ 和CD8- 细胞作为反应细胞(图5). 我们发现 XS+R(CD8+)组与R组细胞分裂增生相似, 无差异显著(P >0.05), 说明CD8+T 细胞不能被异种细胞直接激活, 证实在异种混合淋巴细胞反应中CD8+T 细胞不能通过直接途径激活; XS+R(CD8-)组远远高于R组(P <0.05), 说明异种细胞能刺激CD8- 细胞(含APC的CD4+ 细胞)分裂增生; XS不能刺激CD8+T 细胞但是可以刺激CD8- 细胞, 因为前者不含APC而后者内有APC及CD4+T 细胞; AS+R(CD8+)组高于R组(P <0.05), 说明同种细胞可以直接刺激CD8+T 细胞分裂增生; AS+R(CD8-)组高于R组, 说明同种细胞能刺激CD8- 细胞(含APC的CD4+ 细胞)分裂增生; AS+R(CD8-)组远远高于AS+R(CD8+)组(P <0.05), 说明CD4+T 细胞是同种混合淋巴细胞反应中的主要反应细胞, CD8+T 细胞为次要反应细胞, 对CD8+ 和CD8- 细胞, AS均可刺激分裂增生, 后者明显强于前者, AS本身含有APC, 而发生分裂增生的主要是CD4+T 细胞. 同种混合淋巴细胞反应中淋巴细胞激活存在直接和间接两种途径, 直接途径在同种MLR中发挥了重大作用.

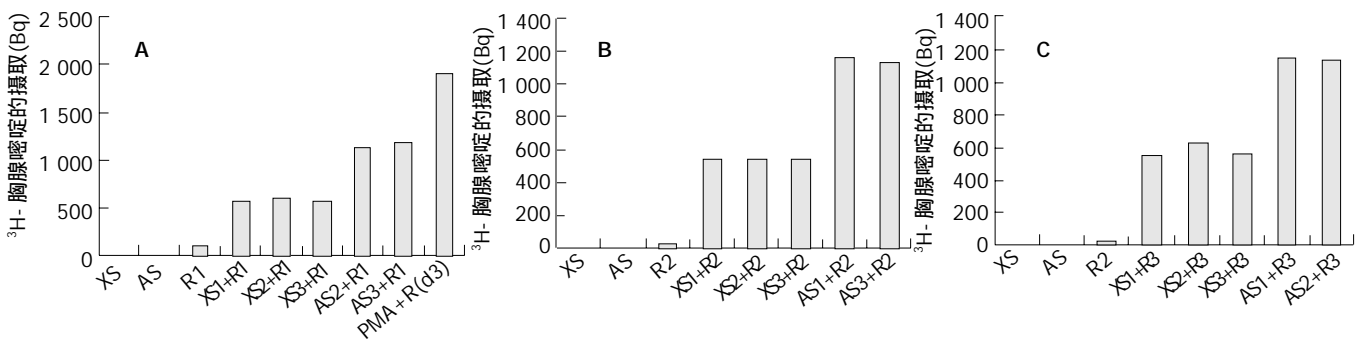


图3 A: 血样(人)1 原发异种 - 同种混合淋巴细胞反应第5 d 的比较; B: 血样(人)2 原发异种 - 同种混合淋巴细胞反应第5 d 的比较; C: 血样(人)3 原发异种 - 同种混合淋巴细胞反应第5 d 的比较.

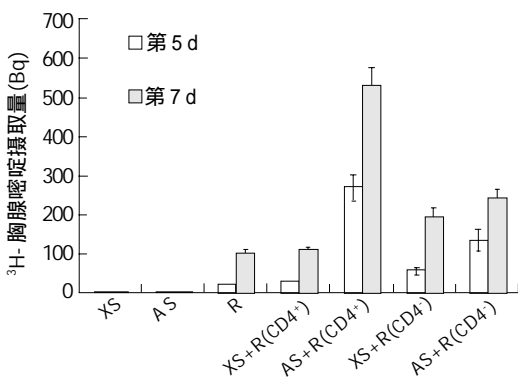


图4 人CD4+/CD4- 淋巴细胞作为反应细胞的异种 - 同种混合淋巴细胞反应第5, 7 d 的比较.

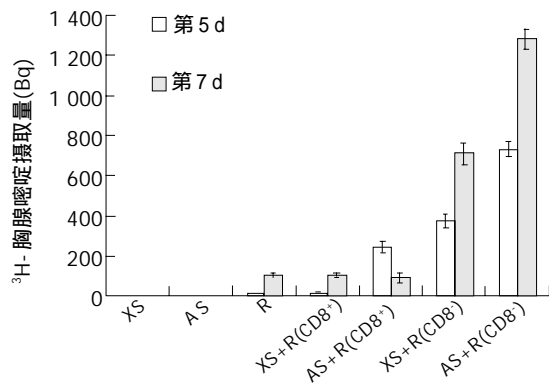


图5 用人CD8+/CD8- 细胞作为反应细胞的异种 - 同种混合淋巴细胞反应第5, 7 d 比较.

3 讨论

我们检测了体外人外周血淋巴细胞及其中不同亚群细胞在同种和异种细胞刺激下分裂增生的情况. 目的在于了解移植排斥反应中免疫细胞的反应, 对比免疫细胞在同种和异种细胞刺激下分裂增生的异同与不同亚群细胞反应的异同, 借以了解人细胞免疫系统在移植排斥中识别外来抗原进而排斥抗原的途径. 了解这一途径有助于在进行同种/异种移植时, 通过干扰这一途径减少移植排斥反应. 我们检测了人外周血淋巴细胞对异种刺激源(小鼠)和同种异体刺激源体外混合淋巴细胞反应的情况. 发现同种/异种混合淋巴细胞反应均在第5-7 d达到高峰; 同种混合淋巴细胞反应反应明显高于异种混合淋巴细胞反应; CD4+/CD4- 细胞分别作为反应细胞, 结果显示: 异种细胞不能刺激CD4+ T细胞但是可以刺激CD4- 细胞, 对CD4+/CD4- 细胞, 同种异体细胞均可刺激分裂增生, CD4+ T细胞分裂增生明显强于CD4- 细胞; 分别用CD8+/CD8- 细胞作为反应细胞, 结果显示: 异种细胞不能刺激CD8+ T细胞但是可以刺激CD8- 细胞, 对CD8+/CD8- 细胞, 同种异体细胞均可刺激分裂增生, CD8- 细胞分裂增生明显强于CD8+ T细胞.

鼠-人之间的异种混合淋巴细胞反应是T细胞依赖型的, 尤其是CD4反应细胞^[1]. 我们的实验证实了这一点, 同时发现CD8细胞也在其中发挥了作用. 对于识别小鼠反应细胞的那种目标抗原, 大多数报道为MHCII, 少数为MHCI, 不论识别那种抗原, 均说明T细胞在鼠-人之间的异种MLR中的重要性^[2]. 也有为数不多的试验说明了, 在鼠-人之间的异种MLR中抗原提呈细胞的依赖性^[3]. 我们发现, 人主要是CD4+ T细胞通过识别经过APC的提呈鼠抗原引发免疫应答, CD8T细胞起次要作用. 还有试验用小鼠细胞作为反应细胞, 发现用MHCII特异性抗体阻断时, 鼠-人之间的异种MLR受到抑制^[4]. 总之, 在鼠-人之间的异种MLR中CD4+T细胞、APC和MHCII为反应的主要途径, CD8+细胞、APC和MHC I为反应的次要途径.

过去的体外混合淋巴细胞反应实验结果差异很大. 以不同的反应细胞, 其中包括: 人、绵羊、山羊豚鼠、鸭、鹅、大鼠、小鼠等^[5-9], 试验结果显示异种混合淋巴细胞基础反应缺失或很低. 与之相反, 也有许多研究显示: 异种混合淋巴细胞反应与同种混合淋巴细胞反应相似或更高. 我们的试验结果表明: 以人外周血淋巴细胞作为反应细胞, 异种混合淋巴细胞反应明显低于同种混合淋巴细胞反应. 这种试验结果不一致与许多因素有关. 在豚鼠-小鼠之间的异种混合淋巴细胞反应中, 以豚鼠作为反应细胞, 辅助性T细胞也不能直接被小鼠MHC激活, 在反应时加入豚鼠的有丝分裂刺激血清时, 这种反应被激活, 而加入小鼠的有丝分裂刺激血清无效, 说明小鼠的淋巴因子不能对豚鼠的Th/Tc的激活产生影响. 另外, 鼠-人之间的异种混合淋巴细胞反应中, 以人为反应细胞, 加入异体人的IL-1这种反应被激活. 这些报

道均说明了淋巴因子在跨种反应中的重要性, 对CD4分子的研究显示人CD4分子与小鼠的MHC II分子之间有完全作用或削弱了的作用. 结合其他在异种混合淋巴细胞反应中Tc细胞反应缺失的研究^[10-11], 我们倾向于认为对于T细胞不能识别异种MHC这一缺陷, 不仅仅是淋巴因子产生了影响. 认为较高的异种MLR反应是由于识别异种抗原的T细胞水平较高, T细胞通过自身的MHC识别异种抗原所致.

在移植排斥反应中, 辅助性T细胞扮演了重要的角色. 通过我们的试验可以得出这样的结论: 异种排斥体外引起的细胞反应明显低于同种排斥反应; 同种移植的细胞排斥反应有直接和间接两种途径, 而异种移植的细胞排斥反应只有间接途径. 在两种排斥反应中, CD4+和CD8+ T细胞亚群均发挥作用, CD4+ T细胞作用更为明显. 有试验表明去除CD4+细胞有助于延长异种移植物的存活时间. 但是对于同种异体移植植物无效. 本试验可以部分解释其原因. 通过异种和同种MLR的对比, 我们看到了移植的新希望: 当有效的抑制了体液排斥反应后, 异种移植也许比同种异体移植排斥的免疫抑制更易于控制.

4 参考文献

- 1 Matsumoto M, Katoh Y, Nakamura Y, Shimakura Y, Hagihara M, Yabe H, Yabe M, Inokuchi S, Kato S, Shimamura K. Injection of CD4(+) and CD8(+) cells with donor or host accessory cells induces acute graft-vs-host disease in human skin in immunodeficient mice. *Exp Hematol* 2001;29:720-727
- 2 Nguyen XD, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Kluter H. Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. *J Immunol Methods* 2003;275:57-68
- 3 Iida Y, Hirose H, Hirota T, Kanetake K, Umeda Y, Nitta T, Matsuno Y, Yoshikawa S, Takagi H, Mori Y, Iwata H. T-cell receptor vbeta usage of xeno-MHC-restricted CD4(+) T cells in concordant xenoantigen recognition. *Transplant Proc* 2000;32:295-298
- 4 Triponez F, Oberholzer J, Morel P, Toso C, Yu D, Cretin N, Buhler L, Majno P, Mentha G, Lou J. Xenogeneic islet re-transplantation in mice triggers an accelerated, species-specific rejection. *Immunology* 2000;101:548-554
- 5 Persson MO, Persson NH, Ransam J, Hermeren G. Xenotransplantation public perceptions: rather cells than organs. *Xenotransplantation* 2003;10:72-79
- 6 Hadidi S, Chen Z, Phillips J, Yu K, Gorczynski RM. Antisense deoxyoligonucleotides or antibodies to murine MD-1 inhibit rejection of allogeneic and xenogeneic skin grafts in C3H mice. *Transplantation* 2002;73:1771-1779
- 7 McInnes EF, Jarrett RF, Langford G, Atkinson C, Horsley J, Goddard MJ, Cozzi E, Schuurman HJ. Posttransplant lymphoproliferative disorder associated with primate gamma-herpesvirus in cynomolgus monkeys used in pig-to-primate renal xenotransplantation and primate renal allotransplantation. *Transplantation* 2002;73:44-52
- 8 Hunkeler D. Allo transplants xeno: as bioartificial organs move to the clinic. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 2001;944:1-6
- 9 Deol HS, Tuch BE. Effect of interleukin-10 on human anti-porcine xenogeneic cellular response in vitro. *Transplantation* 2000;69:112-119
- 10 Shimizu A, Colvin RB, Yamanaka N. Rejection of peritubular capillaries in renal allo- and xeno-graft. *Clin Transplant* 2000;14(Suppl 3):6-14
- 11 Wu G, Korsgren O, van-Rooijen N, Tibell A. Suppression of T cells results in long-term survival of mouse heart xenografts in C6-deficient rats. *Xenotransplantation* 2001;8:303-309

门脉高压症脾血管病变的研究

李涛, 李海洋, 张彤, 倪吉元, 杨镇

李涛, 李海洋, 张彤, 倪吉元, 杨镇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030

李涛, 男, 1974-02-11 生, 湖北省黄冈市人, 汉族, 2003 年华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科博士生, 主治医师, 主要从事门脉高压性血管病变基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. A30170920

项目负责人: 杨镇, 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普外科. litaoforgood@tom.com

电话: 027-83663502 传真: 027-83622624

收稿日期: 2004-04-19 接受日期: 2004-05-09

Splenic angiopathy in portal hypertension

Tao Li, Hai-Yang Li, Tong Zhang, Ji-Yuan Ni, Zhen Yang

Tao Li, Hai-Yang Li, Tong Zhang, Ji-Yuan Ni, Zhen Yang, Department of Hepatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. A30170920

Correspondence to: Zhen Yang, Department of Hepatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 13 Hangkong Road, Wuhan 430030, China. litaoforgood@tom.com

Received: 2004-04-19 Accepted: 2004-05-09

Abstract

AIM: To investigate the relationship among portal hypertension, splanchnic hyperdynamic disturbances and splanchnic angiopathy by observing splenic arterial and venous pathological changes, to discuss the relationship between the abnormal local endothelium-derived vasoactive substances in portal veins and the activation of the pathway of mechanical force signal transduction in vascular endothelial cells by investigating the expression of eNOS ET-1 PKC NF- κ B in vascular endothelial cells of portal hypertension, and to explore the role of extracellular matrix in the pathogenesis of portal hypertensive angiopathy by detecting the expression of type I and type II procollagen mRNA in splenic vein of portal hypertensive patients.

METHODS: Splenic arteries, veins from portal hypertensive patients ($n=20$) and normal people ($n=10$) were removed and observed under optical and electron microscopes. Immunohistochemistry and double labeling immunofluorescence combined with laser scanning confocal microscope were used to investigate the expression of eNOS ET-1 NF- κ B and PKC protein in endothelial cells of splenic veins from portal hypertensive patients ($n=20$) and portal veins from Wistar rats ($n=15$). Total RNA was extracted and type I and type II procollagen mRNAs in splenic vein of portal hypertensive patients ($n=20$) were examined by using the method of reverse transcriptional polymerase chain reaction with semiquantitative method.

RESULTS: The endothelium of splenic arteries was damaged and the internal elastic membrane and medial elastic

fibers of the splenic artery wall were broken and degenerated. The endothelium of splenic veins was remarkably thickened and endothelial cells integrated with the formation of mural thrombus. The tunica media thickened significantly because of hypertrophy of smooth muscle. Fiber and connective tissues increased in amount. Under the electron microscope, atrophy, apoptosis and phenotypic changes were seen in smooth muscle cells of splenic arteries. There were some red blood cells and platelets congregation around the damaged endothelium. Synthesis type of smooth muscle cells accounted for a large part of the total cells in splenic veins. There were plentiful rough endoplasmic reticulum and Golgi complex within the cytoplasm of smooth muscle cells. The endothelium of splenic veins was damaged, indicating that a lot of collagen fibers and some blood components accumulating around the damaged endothelium. The positive signal of PKC was observed in cytoplasm and cell membrane. The PKC expression in endothelial cells in the splenic/portal vein of portal hypertensive patients/rats showed positive or strong positive signal, and positive signal were also observed in some smooth muscle cells in these specimens. But the PKC expression in endothelial cells in the control groups was negative or mild positive. The result of eNOS, ET-1 and NF- κ B expression examined by double labeling immunofluorescence combined with laser scanning confocal microscope showed that the fluorescence were mostly localized in the endothelium of vessel. The intensity of fluorescence in the portal hypertensive patients/rats were significantly higher than that in control group. Human I procollagen mRNA expression of portal hypertensive patients in splenic vein showed a insignificant pattern with control group ($P>0.05$), however, human III procollagen mRNA expression in portal hypertensive patients were much higher than that of control group ($P<0.01$).

CONCLUSION: In this study, the mechanical signal pathway of endothelial cell is activated in portal hypertension and the upregulation of ET-1 and eNOS are related with the activation of this pathway. Type III procollagen and collagen may be one of the major extracellular matrix which deposits and results in neointimal formation and vascular remodeling in the pathogenesis of portal hypertensive vasopathy. Our research also shows that pathological changes of splenic arteries and veins are accompanied with portal hypertension. There may be an interactive relationship among portal hypertension, splanchnic hyperdynamic disturbances and splanchnic angiopathy.

Li T, Li HY, Zhang T, Ni JY, Yang Z. Splenic angiopathy in portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1616-1622

摘要

目的: 通过观察门脉高压症患者脾动脉和脾静脉的病理学改变和门静脉高压时其血管内皮细胞 eNOS, ET-1, PKC, NF- κ B 的表达以及 I, III 型前胶原 mRNA 在门脉高压症

时脾静脉壁的表达, 从而探讨门静脉局部内皮源性血管活性物质异常与内皮细胞应力信号转导通路激活的关系和细胞外基质在门脉高压性血管病变发生中的作用以及门脉高压症、内脏高动力循环和门脉高压性内脏血管病变三者之间的相互关系。

方法: 采用光镜和电镜方法观察20例门脉高压症患者和10例正常对照组的脾动脉和脾静脉的形态学改变; 用免疫组化和免疫荧光激光扫描共聚焦显微镜技术检测20例门脉高压症患者脾静脉和15只门脉高压大鼠模型门静脉内皮细胞eNOS, ET-1, PKC, NF- κ B的表达, 探讨门脉高压时其血管内皮细胞eNOS, ET-1表达改变与信息分子PKC, NF- κ B的关系; 用逆转录聚合酶链反应检测 α 1(I)型前胶原mRNA在20例门脉高压症患者脾静脉壁的表达。

结果: 光镜下可见脾动脉内膜破损, 内弹性膜和弹力纤维断裂和变性; 脾静脉内膜局灶性增厚, 内皮细胞不完整, 附壁血栓形成, 中膜平滑肌显著增厚, 纤维结缔组织明显增多。电镜下可见脾动脉平滑肌细胞变性、坏死, 表型从收缩型向合成型转化, 红细胞、血小板聚集在破损内皮周围; 脾静脉血管平滑肌细胞以合成型为主, 其胞质中含有丰富的粗面内质网和高尔基体, 整个管壁沉积有大量胶原纤维, 并排列紊乱, 内膜损伤, 血液有形成分聚集, 内皮表面形态不规则, 凹凸不平。PKC的阳性表达见于细胞的胞质、胞膜。门脉高压患者脾静脉和实验组大鼠模型门静脉内皮细胞PKC表达呈阳性或强阳性, 其血管平滑肌细胞也可见阳性信号。对照组则呈阴性或弱阳性表达。eNOS, ET-1与NF- κ B双重免疫荧光标记的激光扫描共聚焦显微镜检测显示荧光定位均主要在血管内皮, 三者门脉高压症患者脾静脉和实验组大鼠模型门静脉内皮的荧光信号强度均显著高于对照组。门脉高压症患者脾静脉壁 α 1(I)型前胶原mRNA表达强度与非门脉高压症患者无显著性差异($P > 0.05$); 门脉高压症患者脾静脉壁 α 1(I)型前胶原mRNA表达强度明显高于非门脉高压症患者($P < 0.01$)。

结论: 门脉高压时其血管内皮细胞ET-1和eNOS表达上调与该通路激活有关。 α 1(I)型前胶原及胶原可能是门脉高压症时导致血管构型改建的重要细胞外基质。门脉高压症时合并有脾动脉和脾静脉病变, 门脉高压症和内脏高动力循环以及内脏血管病变之间互为因果关系。

李涛, 李海洋, 张彤, 倪吉元, 杨镇. 门脉高压症脾血管病变的研究. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1616-1622

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1616.asp>

0 引言

随着门静脉压力的升高, 内脏血管可发生明显的病理改变, 如广泛的门体交通支形成和内脏大动脉、静脉的构型改建等, 称为门静脉高压性血管病变, 他既是内脏血管对高动力循环状态的适应与代偿, 又可加剧门静脉高血压, 同时也是曲张静脉破裂出血的直接原

因之一^[1-2]。我们采用光镜和电镜的方法对门脉高压症患者的内脏血管进行观察, 以探讨门脉高压症和内脏高动力循环以及内脏血管病变之间的相互关系; 采用免疫组化和免疫荧光激光扫描共聚焦显微镜技术检测门脉高压症患者脾静脉和门静脉高压大鼠模型门静脉内皮细胞eNOS, ET-1, PKC, NF- κ B的表达, 探讨门脉高压时其血管内皮细胞eNOS, ET-1表达改变与信息分子PKC, NF- κ B的关系; 用逆转录聚合酶链反应检测 α 1(I)型前胶原mRNA在门脉高压症患者脾静脉壁的表达, 探讨其在门脉高压性血管病变发生中的作用及意义如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-06/2002-10在同济医院肝脏外科中心和蔡甸区血防所门脉高压症患者20例, 男15例, 女5例, 平均年龄41岁。肝功能ChildA级14例, B级6例。内镜检查均有中度或重度食管胃底静脉曲张, 并脾功能亢进和脾肿大。病理证实血吸虫肝纤维化12例, 肝炎后肝硬化8例。有1次或多次上消化道大出血病史8例。行单纯脾切除术12例, 行脾切除加贲门周围血管离断术8例。对照组为10例无肝硬化的外伤性脾破裂患者, 男6例, 女4例, 平均年龄38岁, 均行急诊脾切除术。术中均取脾门附近的一段脾动脉和脾静脉。雄性Wistar大鼠, 质量180-220g, 构自本校实验动物中心。共25只, 随机分为门脉高压组(实验组, 15只)和对照组, 10只。参照Benoit et al (Am J Physiol 1984;247:G485)介绍的方法, 采用门静脉部分结扎制作大鼠门脉高压模型, 术后2wk处死尚存活的动物(实验组12只, 对照组10只), 可见实验组大鼠门静脉系统血管较对照组明显增多、增粗, 取门静脉主干约1cm。eNOS, ET-1, 多克隆兔抗及NF- κ B单克隆鼠抗、荧光素FITC、Cy3购自武汉博士德生物工程有限公司, PKC检测试剂盒购于北京中山公司, 共聚焦激光扫描显微镜为德国Leica TCS-SP。PCR仪: 美国PTC-200型, MJ Research Inc公司生产; UVP凝胶成像分析系统: 英国UVP公司生产; M-MLV逆转录酶, Oligo(dT)15 Primer, DNTP, TaqNA聚合酶, 美国Promega公司生产; PCR Marker: 大连宝生物工程公司生产。

1.2 方法

1.2.1 光镜和电镜观察 血管标本用40g/L中性缓冲甲醛固定后常规石蜡包埋连续切片(5 μ m厚)HE染色, 光学显微镜(Olympus)下观察。将新鲜血管标本切成1mm³1min内置于25mg/L戊二醛作前固定2h, pH7.4磷酸缓冲液冲洗, 再以10g/L锇酸在4 $^{\circ}$ C作后固定2h, 然后用递增浓度的酒精和丙酮脱水, 环氧树脂Epon812包埋, 切成超薄切片, 铅铀(醋酸-铀-柠檬酸铅)双染, OPTON EM 10C型透射电镜(德国产)观察。另酒精脱水后, 临界点干燥, 真空喷镀, 置于日立S-520型扫描电

镜观察并拍照。

1.2.2 免疫组化染色 (1)切片常规脱蜡至水,蒸馏水新鲜配制 30 mL/L H_2O_2 , 室温 10 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗3次,滴加正常山羊血清封闭液,室温 30 min,减少非特异性背景染色。甩去多余液体,不洗。滴加一抗(1:100),4 过夜,0.1 mol/L PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加生物素化二抗,37 30 min,0.1 mol/L PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加试剂 SABC,37 30 min,0.1 mol/L PBS 洗 5 min \times 4 次。DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒。取蒸馏水 1 mL,加试剂盒中 A, B, C 试剂各一滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间 3-10 min,蒸馏水洗。苏木素轻度复染。脱水,透明,封片。显微镜下观察。以 PBS 替代一抗作为阴性对照,以已知阳性片作为阳性对照。PKC 阳性呈棕黄色,定位于细胞质中。光镜下选取内皮细胞区域输入 HPIAS-1000 医学彩色全自动图像分析系统分析,结果用平均吸光度表示。(2)另滴加一抗 NF- κ B(1:100) + eNOS / ET-1(1:100),4 过夜,0.1 mol/L PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加生物素化鼠 IgG + FITC(1:50),37 25 min,0.1 mol/L PBS 洗 5 min \times 3 次。滴加生物素化兔 IgG + Cy3(1:50),37 25 min,0.1 mol/L PBS 洗 5 min \times 4 次。水溶性封片剂封片,共聚焦显微镜下观察。我们用 488 nm 波长的蓝色激光激发 FITC,在 510-530 nm 下接收,此时 FITC 发出绿色荧光;用 568 nm 波长的绿色激光激发 Cy3,在 600-650 nm 下接收,此时 Cy3 发出红色荧光。观察时先在光镜下找到待检区域,然后分别激发 FITC 和 Cy3,检测内皮细胞区域的荧光分布和强度,其中绿色荧光的分布和强度反映 NF- κ B 的定位和表达强度,红色荧光则反映 eNOS / ET-1 的表达情况,结果以单位面积的平均荧光强度表示。

1.2.3 α_1 型前胶原 mRNA 的表达 (1) RT-PCR 引物采用 Primer Primer5.0 版本设计,人(α_1)I 型前胶原(Genbank Z-74615):上游引物 5' -ACCGCAAACCTTTC TACTTC-3'。下游引物 5' -GGT5GTCTGTCTCCCCTC ACTC-3'。产物长度 465 bp。人(α_1)III 型前胶原(Genbank X-14420)上游引物 5' -TGAAGGGCAGGGA ACAAC-3'。下游引物 5' -AAGGCGAGTAGGAGCAG T-3'。产物长度 384 bp。人 GAPDH (Genbank M-33197)作为看家基因内参照。上游引物 5' -GGATTTGGTCGTA TTGGG-3'。下游引物 5' -GGAAGAGGTGATGGGAT T-3'。产物长度 384 bp。脾静脉组织总 RNA 提取采用 Trizol 一步法提取:从 -80 冰箱中取出组织,解冻;切取约 100 mg 组织置平皿中剪碎;将组织转入匀浆器中,加入 Trizol 试剂 1 mL,研磨匀浆;将匀浆的组织转入 1.5 mL EP 管,超声粉碎 5 s \times 4 次;加入氯仿 0.2 mL,剧烈振荡 15 s,静置 5 min;12 000 g 2-8 离心 15 min;取上层水相,约 0.6 mL,加入异丙醇 0.5 mL,静置 10 min;12 000 g 2-8 离心 5 min,弃上清,加入 DEPC 水处理的 75% 乙醇 1 mL;7 500 g 2-8 离心 5 min,弃

乙醇,室温放置 5-10 min 至即将干燥;加入 DEPC 处理水 50 mL,溶解 RNA,60 温育 10 min。RNA 定量,以上操作均在冰上进行。每份样品取总 RNA 5 mg,加入 Oligo(dT) 15 μ L(1 μ g),补足 DEPC 水至 27 μ L,70 温育 5 min 变性。变性后加入 5 \times Buffer 8 μ L,4 \times dNTP 2 μ L,RNA 酶抑制剂 1 μ L,MLLV 2 μ L(400 U)。总体积 40 μ L 进行 42 1 h 逆转录反应,再经过 95 5 min 变性。PCR 反应体系:10 \times Buffer 5 μ L,25 mM $MgCl_2$ 3 μ L,4 \times dNTP 1 μ L(10 Pmol/mL 原液),上游引物 1 μ L(10 Pmol/mL 原液)下游引物 1 μ L(10 Pmol/mL 原液),cDNA 5 μ L,Taq 酶 1 μ L(3u/ μ L),DEPC 处理水 33 μ L,总体积 50 μ L,反应条件(α_1)I 型前胶原:退火温度 55 ,30 循环;(α_1)III 型前胶原:退火温度 52 ,30 循环;GAPDH:退火温度 51 ,30 循环。取 PCR 扩增产物 10 mL 加样于 15 g/L 琼脂糖凝胶,电泳缓冲液为新鲜配制的 TAE 液,电压为 5 V/cm,紫外灯下观察结果。每一份标本重复实验 3 次。采用英国 UVP 凝胶成像分析系统对 PCR 产物电泳条带进行密度分析,目的基因表达强度 = 目的基因 RT-PCR 产物吸光度 \div GAPDH RT-PCR 产物吸光度。

统计学处理 所有数据均以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,采用 SPSS 11.0 统计分析软件,经方差齐性检验后,用单因素方差分析(ANOVA)和 t 检验进行分析, $^*P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学结果 与非肝硬化患者相比,肝硬化患者脾脏明显增大,脾动脉壁和脾静脉壁明显增厚,管径明显增加,弹性减弱。光镜下正常脾动脉壁内膜光滑,有完整的内皮细胞,内膜下无平滑肌细胞。中膜由多层平滑肌纤维组成,其间夹杂有胶原纤维和弹性纤维。肝硬化患者脾动脉的内膜明显增厚,内皮细胞不完整,内弹力膜断裂,中膜平滑肌紊乱(图 1A, B)。正常脾静脉内膜完整,内皮细胞无破坏,肝硬化患者脾静脉内膜局灶性增厚,内皮细胞不完整,内膜损伤,附壁血栓形成(图 1C, D)。透射电镜下正常脾动脉平滑肌细胞呈梭形,细胞核呈长圆形。胞质中有肌丝、线粒体、内质网、高尔基复合体等细胞器和糖原颗粒。肝硬化患者脾动脉内皮损伤,内弹性膜断裂,弹性纤维亦有断裂。中膜平滑肌细胞数量增多,并迁移至内膜下,部分萎缩、变性,局部胞质坏死形成空泡。线粒体数目增多,嵴消失,形成空泡。整个管壁内胶原纤维明显增多并排列紊乱。部分肌细胞胞质内出现较多粗面内质网、核糖体及高尔基体,而肌丝减少,表明平滑肌细胞由收缩型向合成型转变(图 2A, B)。正常脾静脉内膜光滑,内皮细胞无破坏,肝硬化患者脾静脉壁内膜损伤,血管平滑肌细胞以合成型为主,其胞质中含有丰富的粗面内质网和高尔基体,整个管壁沉积有大量胶原纤维,并排列紊乱(图 2C, D)。扫描电镜下正常脾静脉内膜光滑,有完整的内皮细胞(图 3A),肝硬化患者脾静脉内膜损伤,内皮细胞不完

整, 血液有形成分聚集, 内皮表面形态不规则, 凹凸不平(图3B, C). 正常脾动脉内膜完整, 内皮细胞无破坏(图4A), 肝硬化患者脾动脉内膜损伤, 红细胞、血小板聚集在损伤部位周围(图4B, C).

2.2 免疫组化染色 PKC 的阳性表达见于细胞的胞质、胞膜. 门静脉高压患者脾静脉和实验组大鼠模型门静脉内皮细胞PKC表达呈阳性或强阳性(图5A, B), 其血管平滑肌细胞也可见阳性信号. 对照组则呈阴性或弱阳性表达(图5C, D). eNOS、ET-1 与 NF- κ B 的荧光定位均主要在血管内皮, 三者门静脉高压患者脾静脉和实验组大鼠模型门静脉内皮的荧光信号强度均显著高于对照组(图6A-C; 7A-C; 表1).

2.3 α 1(I)型前胶原 mRNA 的表达 门脉高压症患者脾静脉壁 α 1(I)型前胶原 mRNA 表达强度为 0.3868 ± 0.03582 ,

非门脉高压症患者为 0.3642 ± 0.03318 , 二组间差异无显著性($P > 0.05$). (图6B). 门脉高压症患者脾静脉壁型前胶原 mRNA 表达强度为 1.1855 ± 0.2140 , 非门脉高压症患者为 0.1095 ± 0.1558 , 门脉高压症时脾静脉壁型前胶原表达明显增高($P < 0.01$ 图8).

表1 门脉高压脾静脉内皮细胞表达 eNOS, ET-1, NF- κ B 的激光扫描共聚焦显微镜检测(荧光 A 值, mean \pm SD)

分组	n	ENOS	ET-1	NF- κ B
患者门脉高压组	18	95.6 \pm 28.3	107.4 \pm 30.1	90.1 \pm 31
对照组	10	57.9 \pm 27.4	56.4 \pm 18.9	48.4 \pm 19.3
大鼠门脉高压组	12	88.7 \pm 28.5	91.0 \pm 32.5	90.3 \pm 32.9
对照组	10	50.9 \pm 16.5	51.1 \pm 19.0	48.1 \pm 19.1

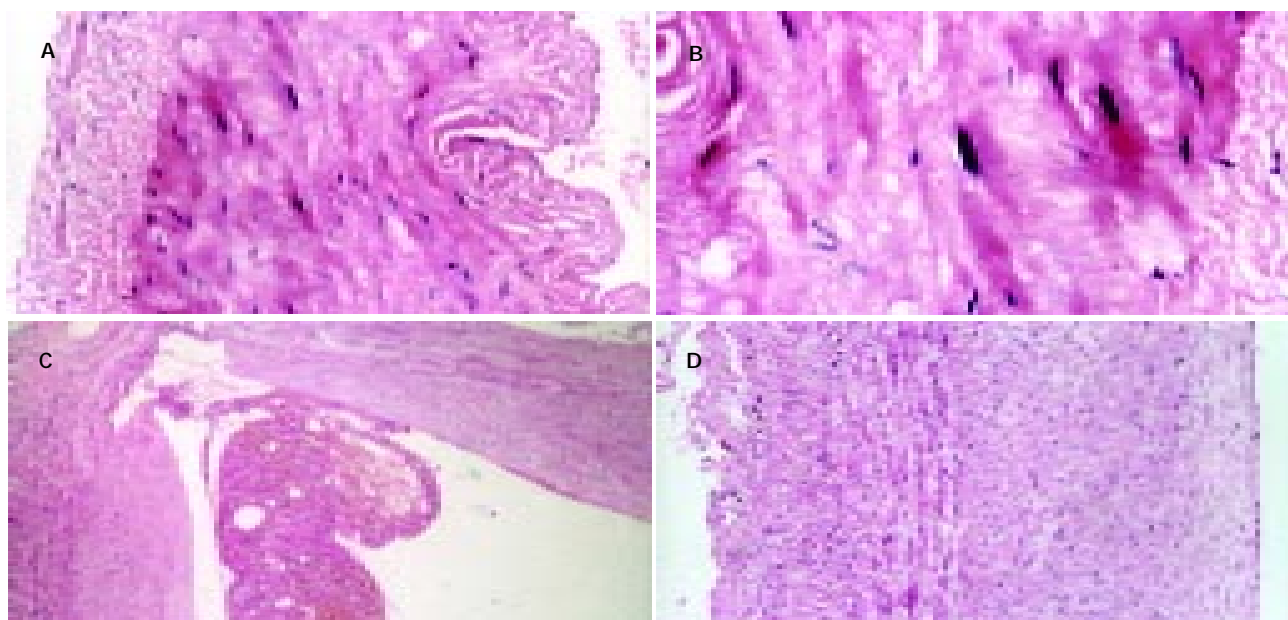


图1 门脉高压患者脾动静脉变化(HE). A: 脾动脉内膜增厚, 弹力膜断裂, 中膜平滑肌明显增厚, 排列紊乱($\times 200$); B: 脾动脉中膜平滑肌明显增厚, 排列紊乱($\times 400$); C: 脾静脉内膜损伤局灶增厚及附壁血栓($\times 40$); D: 脾静脉内膜明显增生($\times 200$).

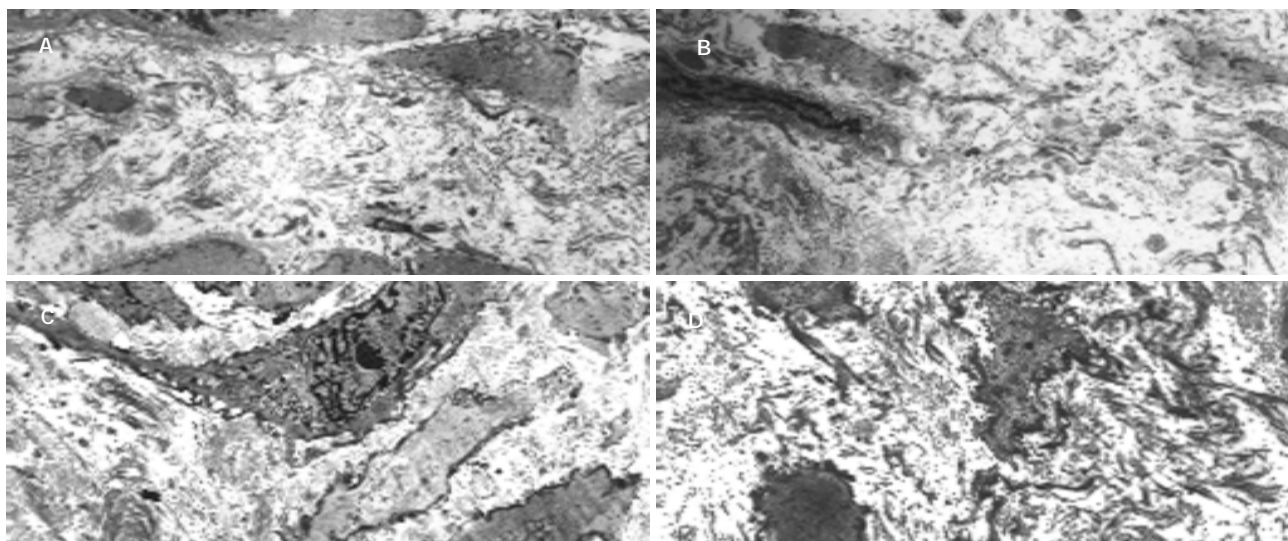


图2 门脉高压患者脾动静脉超微结构(TEM). A: 脾动脉内皮脱落, 由增生的平滑肌和纤维结缔组织代替, 胶原纤维明显增多($\times 6300$); B: 脾动脉内弹力膜断裂($\times 5000$); C: 脾静脉平滑肌由收缩型向合成型转化, 粗面内质网增多($\times 6300$); D: 脾静脉粗面内质网增多、密体、密斑减少, 平滑肌细胞向合成型转化($\times 1000$).

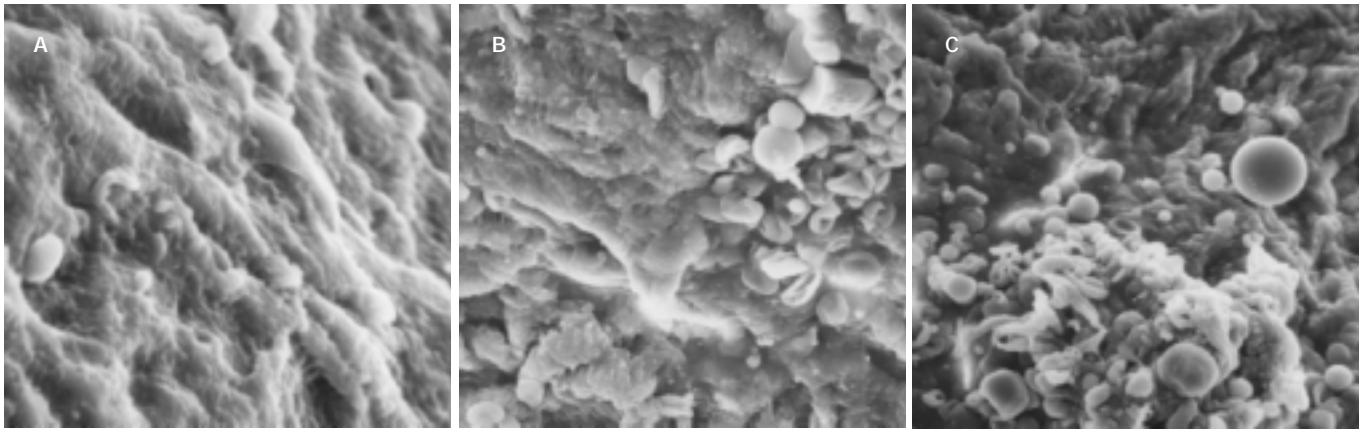


图3 脾静脉扫描电镜观察. A: 正常内膜完整($\times 2\,500$); B: 内皮损伤, 红细胞聚集内皮表面形态不规则, 凹凸不平($\times 1\,500$); C: 脾静脉内膜损伤, 形成血栓, 红、白细胞及血小板聚集成团($\times 1\,000$).

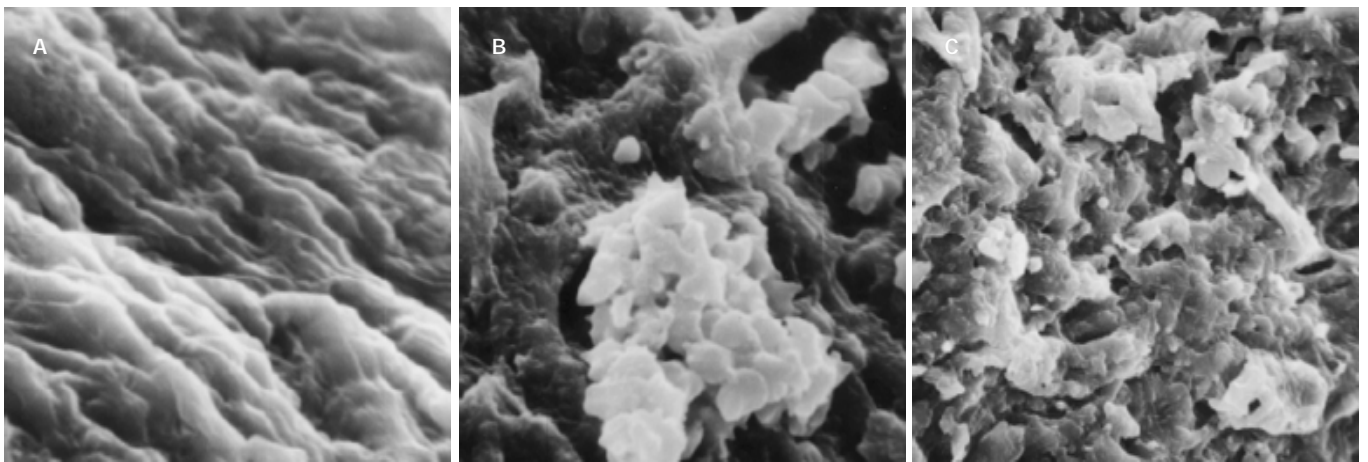


图4 脾动脉扫描电镜观察. A: 正常内膜光滑($\times 4\,000$); B: 内膜损伤, 血小板聚集在损伤内膜周围($\times 3\,000$); C: 内膜损伤, 血液有形成分聚集在损伤内膜周围($\times 2\,000$).

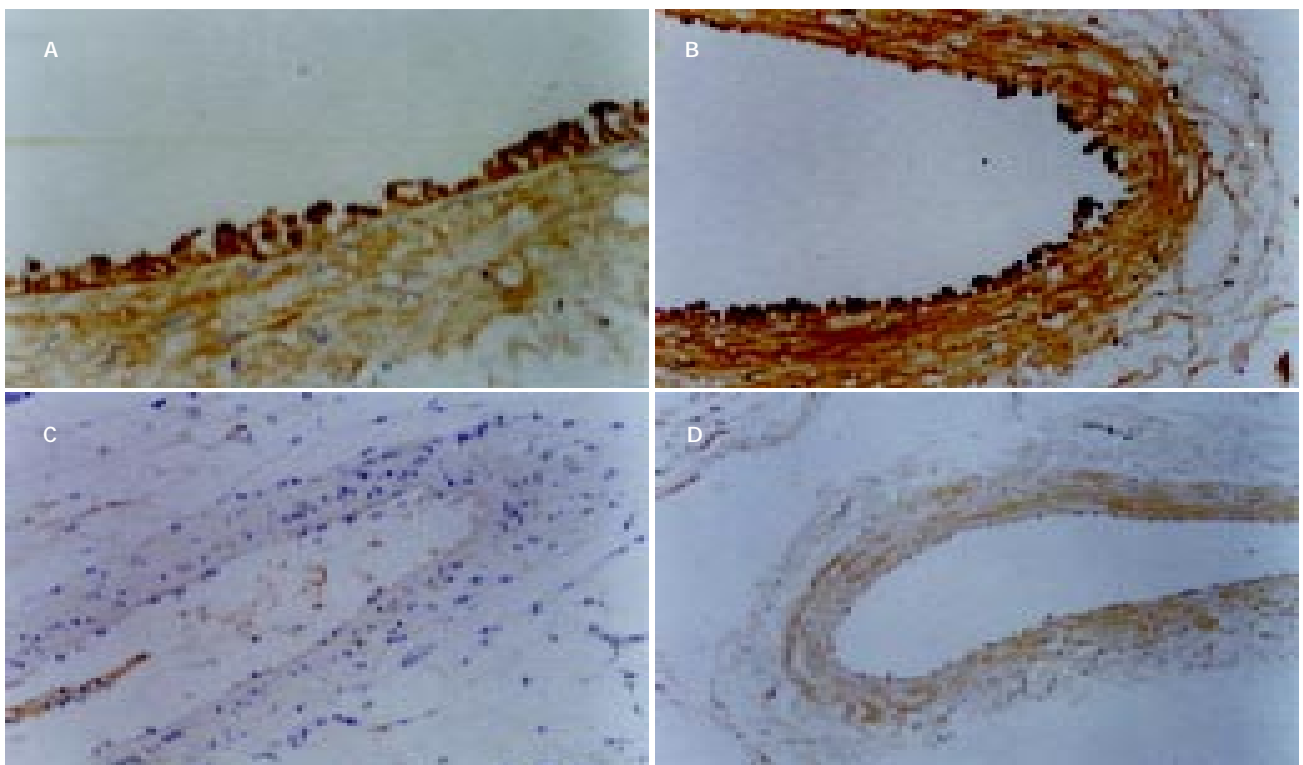


图5 脾静脉 PKC 表达的免疫组化染色. A: 门脉高压患者($\times 400$); B: 门脉高压大鼠($\times 400$); C: 外伤性脾破裂患者($\times 200$); D: 假手术大鼠($\times 200$).

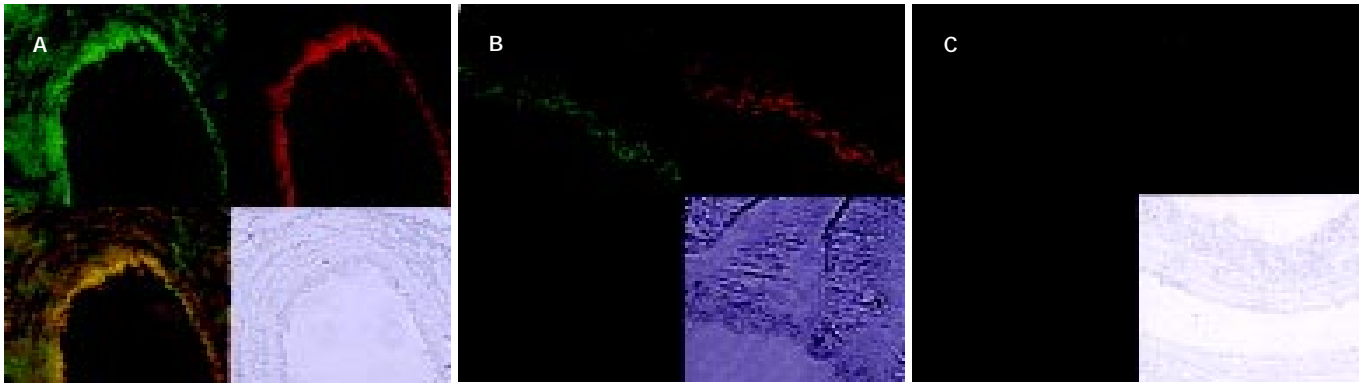


图6 大鼠门静脉 ET-1, NF-κB 双重免疫荧光标记的激光扫描共聚焦显微镜成像图. A 门脉高压 (× 200); B: 门脉高压 (× 400); C: 假手术组 (× 200).

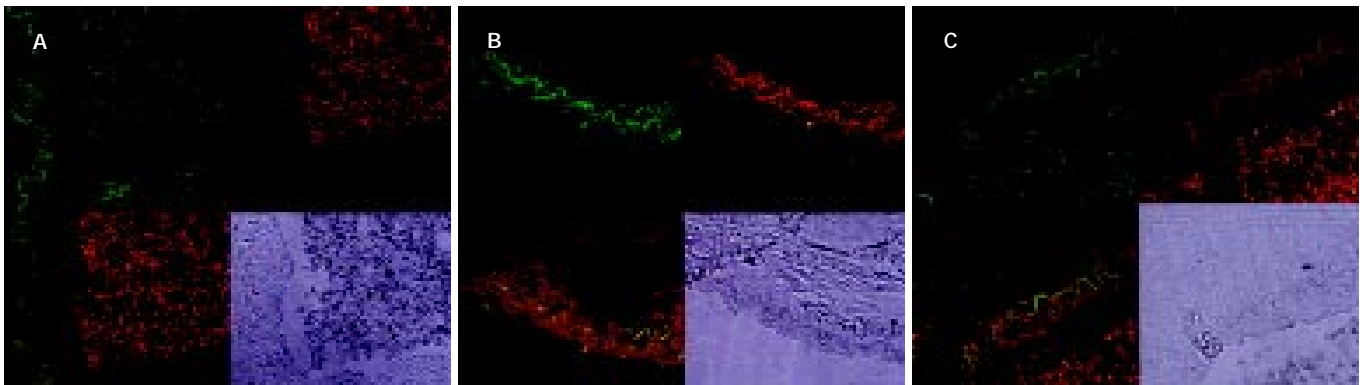


图7 患者脾静脉 eNOS, NF-κB 双重免疫荧光标记的激光扫描共聚焦显微镜成像图. A 门脉高压 (× 400); B 门脉高压 (× 400); C 外伤性脾破裂 (× 400).

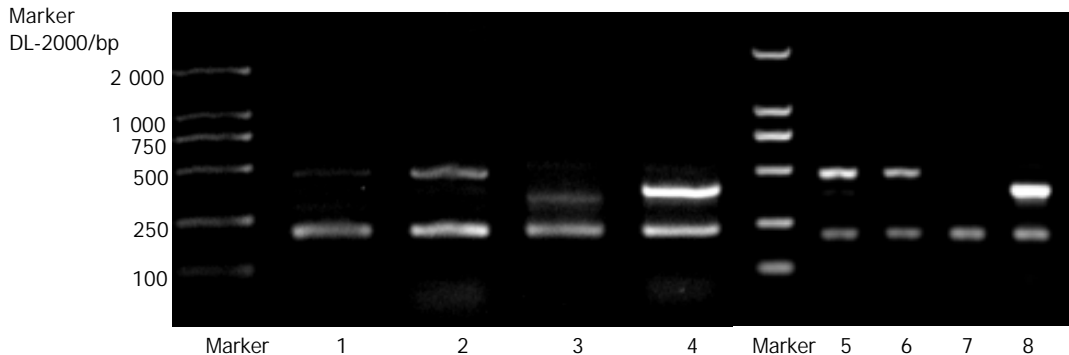


图8 门脉高压症脾静脉壁 I, III 型前胶原 mRNA 的表达. 205 bp 处条带为内参照 GAPDH, 465 bp 处条带为 (α1) I 型前胶原 mRNA, 384 bp 处条带为 (α11) III 型前胶原 mRNA. 1, 3 为非 PHT 对照标本(1), 5, 7 为非 PHT 对照标本(2); 2, 4 为 PHT 标本(1), 6, 8 为 PHT 标本(2).

3 讨论

门脉高压症脾静脉内膜损伤较重, 这是由于门脉压力和血流量增高的结果. TCM 表明, 平滑肌细胞的表型发生转变, 因为在损伤因子如细胞因子^[3-4]、生长因子^[5]、剪切力^[6-7]、氧应激^[8]增加等作用下, VSMC 可由正常的收缩型转变为合成型^[9-10], 合成型 VSMC 的收缩蛋白表达受抑制, 而产生大量细胞外基质(ECM), 并向内膜下迁移. 光镜下可见中膜平滑肌增厚, 这是血管对压力增高的一种适应性代偿反应, 脾动脉中膜平滑肌细胞变性、萎缩, 表型从收缩型向合成型转变, 是因为压力和流量负荷增加压迫管壁滋养血管而引起供血不足, 造成血管壁缺血性损伤所致. 扫描电镜下可见

脾动脉内膜的损伤, 但其损伤程度较静脉轻, 这主要是由于门静脉系统直接最先受累的缘故. 另外, 光镜下可见脾动脉的内弹力膜断裂, 这是由于门脉高压症时内脏处于高动力循环状态, 血流量及流速增加, 对血管壁的侧压力及切应力增大, 血管长期处于充血扩张状态, 这种机械、物理刺激引起内皮细胞脱落, 弹力膜断裂. 内弹力膜断裂使血管壁缓冲血流冲击能力下降, 当血流量增大时, 无法通过弹力膜的作用收缩血管, 调节血流量, 有利于高动力循环的发展.

eNOS, ET-1 阳性信号主要位于血管内皮细胞, 而 PKC 和 NF-κB 除在内皮细胞上表达外, 在血管平滑肌细胞也有一定程度的表达. 门静脉高压症患者和大鼠模型其脾/门静脉血管内皮细胞 ET-1 表达显著高于对照

组,提示门静脉系统血管内皮细胞 ET-1 的合成增多是导致门静脉高压局部 ET-1 浓度增高的的重要因素. ET-1 通过与其特异性受体结合发挥强大的缩血管作用,使门静脉回流阻力增加而进一步增高门静脉压力. 对门静脉高压时 ET-1 合成增多的原因国内外已有研究. 我们认为,除了内毒素和各种细胞因子的作用外,这种血流动力学的改变可能是刺激内皮细胞 ET-1 合成增多的的重要因素之一. 我们以内皮细胞为对象,探讨其 eNOS 的表达变化与门静脉高压的关系. 结果表明,门静脉高压患者和大鼠其脾/门静脉内皮细胞 eNOS 表达均显著高于对照组,提示门静脉高压时局部 NO 的增高与其内皮细胞 eNOS mRNA 表达的上调有密切关系. PKC 是重要的细胞内信号传导分子, NF- κ B 是内皮细胞上可被机械力激活的主要转录因子之一,参与许多基因的表达调控,本结果表明,在门脉高压患者和大鼠,其脾/门静脉内皮细胞 PKC、NF- κ B 的表达显著高于对照组,因此我们认为在门静脉高压时,门静脉血流动力学的改变可激活局部内皮细胞的 PKC、NF- κ B 信号传导通路.

胶原纤维是一种重要的血管细胞外基质蛋白,可保持血管壁的韧性与强度. 本结果表明,门脉高压症时脾静脉壁 I 型前胶原 mRNA 表达较非门脉高压症患者增高约 5-6 倍 ($P < 0.01$),而 III 型前胶原 mRNA 表达与非门脉高压症患者相比差异无显著性 ($P > 0.05$),我们认为 I 型前胶原 mRNA 在门脉高压症脾静脉壁的高表达,可能是促进血管构型改建的一个重要因素. 关于 I, III 型前胶原基因表达调控过程,目前并不十分清楚. 已发现有多种因子可促进 VSMC 上调 I, III 型前胶原 mRNA 的表达,如 FGF^[11], Ang-II^[12] 等,综上所述,门静脉血中 ET-1 和 NO 的增高是由于门静脉系统内皮细胞合成增多所致,内皮细胞合成 NO 的增多与其 eNOS 表达上调有关. 门静脉高压时其血管内皮细胞的机械应力信号通路被激活,内皮细胞 ET-1 和 eNOS 表达上调与该通路激活有关. I 型前胶原及胶原可能是门静脉高压症时导致血管构型改建的重要细胞外基质,门脉高压症时合并有脾动脉和脾静脉病变,肝硬化等导致的肝内血流受阻是门脉高压症形成的始动因素,一方面,门脉高压症可促进内脏高动力循环和内脏血管病变的形成和发展. 另一方面,内脏血管病变又可促进门脉高压症

和内脏高动力循环的形成与发展. 这三个因素在肝硬化门脉高压症的发病机制中具有相互作用的关系,并共同参与形成曲张静脉破裂出血.

4 参考文献

- 1 Yang Z, Ren D, Li D, Qiu F. Portal hypertensive vasculopathy of splenic artery. *Zhonghua Waike Zazhi* 1999;37:412-414
- 2 Yang Z, Zhang L, Li D, Qiu F. Pathological morphology alteration of the splanchnic vascular wall in portal hypertensive patients. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:559-562
- 3 Jiang B, Xu S, Brecher P, Cohen RA. Growth factors enhance interleukin-1 beta-induced persistent activation of nuclear factor-kappa B in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1811-1816
- 4 King KE, Iyemere VP, Weissberg PL, Shanahan CM. Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem* 2003;278:11661-11669
- 5 Wu J, Cunnick JM. Trans-regulation of epidermal growth factor receptor by lysophosphatidic acid and G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582:100-106
- 6 Hosokawa H, Aiuchi S, Kambe T, Hagiwara Y, Kubo T. Mechanical stretch-induced mitogen-activated protein kinase activation is mediated via angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1588-1592
- 7 Standley PR, Cammarata A, Nolan BP, Purgason CT, Stanley MA, Camaratta A. Cyclic stretch induces vascular smooth muscle cell alignment via NO signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1907-1914
- 8 Komai N, Morishita R, Yamada S, Oishi M, Iguchi S, Aoki M, Sasaki M, Sakurabayashi I, Higaki J, Ogihara T. Mitogenic activity of oxidized lipoprotein on human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2002;40:310-314
- 9 Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 2002;91:1421-1430
- 10 Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, Nishida W, Yoshida K, Ohkawa Y, Kitabatake A, Aoki J, Arai H, Sobue K. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res* 2001;89:251-258
- 11 Pickering JG, Ford CM, Tand B, Chow LH. Coordinated effects of fibroblast growth factor-2 on expression of fibrillar collagens, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human vascular smooth muscle cells. Evidence for repressed collagen production and activated degradative capacity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:475-482
- 12 Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Schiffrin EL. P38 Map Kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension* 2001;37(2 Pt 2):574-580

经蓝碟手辅助腹腔镜治疗腹部外科疑难疾病

方驰华, 张伟, 马俊勋

方驰华, 张伟, 马俊勋, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282
方驰华, 男, 1958-06-20 生, 湖北人, 汉族, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事肝脏肿瘤外科、腹腔镜外、数字化虚拟肝脏及肝脏干细胞研究。
项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科. fch58520@sina.com
电话: 020-84360607
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-12-06

Surgical treatment of complex abdominal diseases by hand-assisted laparoscope through lap disc device

Chi-Hua Fang, Wei Zhang, Jun-Xun Ma

Chi-Hua Fang, Wei Zhang, Jun-Xun Ma, Department of hepatobiliary surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510282.
Correspondence to: Chi-Hua Fang, 510282, Department of hepatobiliary surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou. fch58520@sina.com
Received: 2003-10-10 Accepted: 2003-12-06

Abstract

AIM: To explore the clinical feasibility and superiority of hand-assisted laparoscopic surgery (HALS) technique through lap disc hand-assisted device and to extend the application range of HALS.

METHODS: Appropriate pneumoperitoneum was sustained and the trocars and lap disc device were placed according to the position of lesion and operative demand, then the operation of dissection, separation and cut with ultrasonically activated shears (UAS) were completed directing under the assisted-hand. One case of pancreatic cyst, one case of primary multiple cancers of colon, one case of retroperitoneal tumor, one case of large hepatic abscess and one case of β -mediterranean anemia were successfully treated with this procedure.

RESULTS: The effects of lap disc hand-assisted device were excellent and the operations were completed successfully. The patients recovered quickly with small trauma and there were no complications after the operations.

CONCLUSION: The lap disc hand-assisted device can fairly meet the demands of minimally invasive operation. It is more convenient in the operation with the lap disc hand-assisted device, which gets back the surgeons' tactile sensation. The technique of HALS can complete almost all kinds of abdomen surgical operation and will have promising prospects.

Fang CH, Zhang W, Ma JX. Surgical treatment of complex abdominal diseases by hand-assisted laparoscope through lap disc device. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1623-1625

摘要

目的: 探讨经蓝碟手辅助腹腔镜下外科技术在腹部外科疾病诊断、手术切除上的可行性和优越性, 扩大经蓝碟手辅助腹腔镜下外科技术的适用范围。

方法: 建立二氧化碳气腹、根据病变的部位和手术的要求, 放置 Trocar 和蓝碟装置。在左手的引导下, 用超声刀进行解剖、分离、切割等技术, 分别对胰腺囊肿, 腹膜后肿瘤, 多发性结肠原发癌, 巨大肝脓肿和 β -地中海贫血巨脾各 1 例进行治疗。

结果: 手术均顺利完成, 术中出血少, 创伤小, 术后近期效果良好。

结论: 蓝碟手助器的良好性能特点能很好满足该手术的需要。由于恢复了术者手的触觉感, 在手术操作上更为方便, 经蓝碟手辅助腹腔镜下可完成目前开腹手术时各种腹部外科疾病的手术治疗。

方驰华, 张伟, 马俊勋. 经蓝碟手辅助腹腔镜治疗腹部外科疑难疾病. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1623-1625
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1623.asp>

0 引言

手辅助腹腔镜技术(hand-assisted laparoscopic surgery, HALS)恢复了术者的触觉并加强了手眼的协调性, 是一种将开放手术的简便和微创手术的临床益处相结合的技术^[1]。在应用 HALS 技术过程中, 为使术者的辅助手能够伸入腹腔, 同时维持气腹状态, 传统的手助器采用胶水黏着或者充气固定于皮肤的组合结构设计, 不仅使用繁琐费时, 而且术者的手也被限制在手助器内, 不能方便进出^[2]。随着新一代手助器蓝碟(Lap disc)的出现, 很好地克服了上述缺陷。我们采用经蓝碟手辅助下腹腔镜成功的对 5 例腹部外科疑难疾病进行手术切除, 获得满意疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺囊肿 1 例, 女, 75 岁, 因全身皮肤黄染伴中上腹部放射性疼痛 10 d 入院, CT 报告: 肝内外胆管扩张, 胰头部巨大囊肿并压迫胆总管下端。多发性结肠原发癌 1 例, 女, 52 岁, 因下腹部间歇性隐痛伴体重减轻 3 mo 入院。术前经纤维结肠镜及病理检查确诊为乙状结肠高分化腺癌, 结肠肝曲低分化腺癌。腹膜后肿瘤 1 例, 女, 32 岁, CT、MRI 提示: 腹膜后

肿瘤,大小约5 cm × 4 cm(图1)。巨大肝脓肿1例,男,73岁,表现为肝区持续性胀痛或隐痛,伴寒战、发热、乏力、纳差、恶心、呕吐、白细胞及中性粒细胞升高等全身脓毒征象,B超发现肝脏第VII、VIII段巨大多房性肝脓肿,β-地中海贫血并巨脾1例,男,20岁,体检发现脾脏巨大,B超检查:脾脏下级平脐,厚度10 cm。蓝碟手助器,超声刀系统和腹腔镜系统。

1.2 方法 在气管内插管全麻下采用经蓝碟手辅助腹腔镜外科技完成手术。手术操作要点:以左手既能控制手术区域又不妨碍手术操作为原则,根据病变部位、术者左手掌大小及蓝碟直径确定安放蓝碟手助器切口的大小和部位。蓝碟手助器直径为12 cm(图2),在此区域内避免放置 Trocar,以免损坏手助器的底圈,造成术中漏气。对于胰腺囊肿患者,取右中下腹部经腹直肌切口,置入蓝碟手助器,镜下手辅助穿刺抽出淡黄色液体(图3),明确囊肿部位,纵行切开囊肿,缝合胰腺囊肿壁,常规行囊肿空肠Roux-en-Y吻合。在腹膜后肿瘤切除术中,取左下腹直肌旁切口置入蓝碟手助器,腹腔镜下见肿瘤位于腹膜后,左髂总动脉分叉处,表面光滑,基底固定,无搏动感,大小约5 cm × 4 cm,表面布满血管(图4)。超声刀切开肿瘤表面腹膜,辅助手协助钝性分离,牵引瘤体,超声刀紧贴肿瘤底部逐次分离。于肿瘤的右上方分离来自髂动脉供应肿瘤的血管,放置钛夹,完整切除

肿瘤。多发性结肠原发癌根治手术中取左下腹直肌切口,置入蓝碟手助器。在手辅助下按照结肠肝曲癌根治常规游离右半结肠、乙状结肠和降结肠下段。解除气腹,保护切口,将游离的结肠肝曲至小切口拖出,切除病变肠段,行回结肠端端吻合。同样方法切除左侧病变肠段,行乙状结肠和降结肠端端吻合,送检标本两端切缘未见癌细胞,系膜未见转移淋巴结。在巨脾切除术中,取右上腹经腹直肌切口为辅助切口,辅助手协助显露脾门周围解剖,切断脾门血管,顺利切除脾脏。巨大脾脏套入消毒好的塑料袋中,剪碎后分批取出。巨大脓肿经术前B超和术中穿刺确定脓肿位于肝脏VII、VIII段,取脐旁经腹直肌切口,放置蓝碟手助器,充分游离右半肝后,镜下穿刺抽脓,未见有胆汁样液体,超声刀切开小口脓腔,吸净脓液。用分离钳及手指轻轻打开分隔,扩大引流。再反复冲洗脓腔,吸净腹腔内液体,分别于脓腔内,肝下间隙置一根双套管,术后持续负压吸引。

2 结果

在辅助手的配合下顺利进行探查、分离、切开、缝合、引流,并通过辅助切口取出巨大的标本,手术顺利完成,术中出血少,创伤小,无手术并发症,术后恢复迅速顺利。

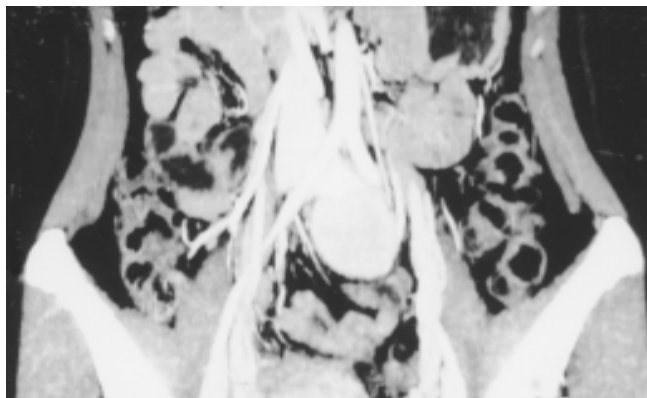


图1 CT、MRI提示:肿瘤位于腹膜后,大小约5 cm × 4 cm。



图2 测量蓝碟手助器大小。



图3 在手辅助下胰腺囊肿穿刺明确诊断。



图4 将巨脾剪碎后分次取出。

3 讨论

手辅助腹腔镜外科技术(HALS)的最大特点是恢复了对于外科医生的触觉感和手术操作的手眼协调性, 辅助切口也使得较大的标本更容易取出^[3]. 蓝碟手助器容易放置, 密闭性能好, 不仅在手进出腹腔过程中保持气腹, 还能够很好的保护切口边缘. 本组 1 例结肠癌经腹腔镜确诊为乙状结肠下段高分化腺癌、结肠肝曲低分化癌, 患者采用 HALS 技术, 不仅可以很好的显露病变区域, 确定癌肿大小, 保护重要组织器官, 还可以在镜下为手术操作提供引导, 保证手术的安全性. 充分游离的病变肠管可以在手术的后期经辅助切口提出, 在直视下进行手工吻合, 既安全便捷又可以减少因采用腔镜下吻合器械(如 Endo-GIA 等)患者的经济负担. 体现了 HALS 技术良好的临床应用效果. 由于手的保护和引

导, 使得一些在完全腹腔镜下较为困难的操作变得安全简便, 这在腹膜后肿瘤的显露、游离及脾门大血管的解剖中表现尤为突出. 位于 VII, VIII 段的巨大肝脓肿, 由于显露困难, 在完全腹腔镜下进行较为困难, 往往需要中转开腹, 但是借助 HALS 技术则可以顺利完成肝脏游离、脓肿开窗引流、保护腹腔其他脏器等一系列操作. 在胰腺囊肿患者的手术中, 先应用 HALS 技术进行探查和准确穿刺, 明确诊断.

4 参考文献

- 1 Targarona EM, Gracia E, Rodriguez M, Cerdan G, Balague C, Garriga J, Trias M. Hand-assisted laparoscopic surgery. *Arch Surg* 2003;138:133-141
- 2 Stifelman M, Nieder AM. Prospective comparison of hand-assisted laparoscopic devices. *Urology* 2002;59:668-672
- 3 Meijer DW, Bannenberg JJ, Jakimowicz JJ. Hand-assisted laparoscopic surgery: an overview. *Surg Endosc* 2000;14:891-895

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

• 消息 •

WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于 2003-04-15 开通. WJG 包括: 1995-2004 年 1-12 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2004 年第 1-5 期及特刊.

1 本系统的功能

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

2 网址

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

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

3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护.

世界华人消化杂志 2004 年 5 月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

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

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

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

论文目次

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

4 全文

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

5 投稿查询

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

心理社会因素对肠易激综合征患者生活质量的影响

王伟岸, 何剑琴, 胡品津, 曾志荣, 陈 为

王伟岸, 何剑琴, 胡品津, 曾志荣, 陈为, 中山大学附属第一医院消化科
广东省广州市 510080
王伟岸, 男, 1966-03-17 生, 河南省太康县人, 汉族, 2000 年中国协和医科
大学医学博士, 主要从事功能性胃肠病临床和基础研究。
项目负责人: 胡品津, 510080, 广东省广州市中山二路 58 号, 中山大学附属
第一医院消化科。 pjhmd@vip.163.com
电话: 020-87755766-8172
收稿日期: 2004-01-02 接受日期: 2004-03-04

Impact of psychosocial parameters on quality of life in patients with irritable bowel syndrome

Wei-An Wang, Jian-Qin He, Pin-Jin Hu, Zhi-Yong Zeng, Wei Chen

Wei-An Wang, Jian-Qin He, Pin-Jin Hu, Zhi-Yong Zeng, Wei Chen,
Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen
University, Guangzhou 510058, Guangdong Province, China
Correspondence to: Pin-Jin Hu, Department of Gastroenterology, The
First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510058,
Guangdong Province, China. pjhmd@vip.163.com
Received: 2004-01-02 Accepted: 2004-03-04

Abstract

AIM: To investigate the impact of psychosocial parameters on the quality of life (QOL) in healthcare seeking patients with irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: QOL and psychosocial parameters in consecutive 41 patients with IBS irritable bowel syndrome (IBS) according to Rome II criteria were measured by questionnaires including IBS-QOL, Pittsburgh sleep quality index (PSQI) and symptom checklist-90 (SCL-90), coping style, social supports, respectively. In the meantime, 37 normal subjects were served as a control group. The relationship between IBS-QOL and psychosocial parameters was investigated by regression analysis.

RESULTS: Compared with normal subjects, all subscales scores of QOL were lower ($P < 0.05$, respectively), especially in dysphoria, interference with activity, health worry, social reaction, and overall score ($P = 0.000$, respectively). In addition, IBS patients had more psychiatric symptoms (40.24 ± 4.5 , $t = 2.63$, $P = 0.047$), and higher scores of depression (0.64 ± 0.24 , $t = 2.53$, $P = 0.020$) and anxiety (0.67 ± 0.30 , $t = 2.16$, $P = 0.016$). The score of negative coping (40.79 ± 8.01 , $P < 0.05$), fancying (4.95 ± 2.1 , $P = 0.001$) and withdrawal (4.81 ± 2.1 , $P = 0.004$), as well as subjective supporting (23.92 ± 4.2 , $P = 0.046$) in IBS was higher than that in normal subjects. Among IBS patients, the quality of sleep and daily functions significantly decreased, PSQI and sleep disturbances as well as soporific using was markedly increased. Multiple regression analysis showed poorer quality of life in IBS was related with sleep quality ($\beta = 0.281$), negative life event ($\beta = -0.363$) and anxiety ($\beta = -0.175$).

CONCLUSION: QOL in healthcare seeking patients with IBS is impaired significantly, which is negatively associated with the abnormalities of many of psychosocial parameters.

Wang WA, He JQ, Hu JP, Zeng ZY, Chen W. Impact of psychosocial parameters on quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1626-1630

摘要

目的: 探讨影响就诊肠易激综合征(IBS)患者生活质量的心理社会因素。

方法: 采用肠易激综合征生活质量量表、心理学症状自评量表(SCL-90)、生活事件量表、特质应对方式问卷、应付方式问卷、社会支持评定量表及匹兹堡睡眠质量指数对符合罗马II标准连续在消化专科门诊的41例IBS患者进行测评,并与同期诊断的匹配的37名健康自愿者对照。通过多元逐步回归分析探讨心理行为因素对患者生活质量的影响。

结果: 与正常组相比,IBS组生活质量的8个因子和总分均显著降低($P < 0.05$),其中即烦躁不安、冲突行为、社会反应、健康忧虑降低最为明显($P = 0.000$)。此外,IBS患者精神症状明显(40.2 ± 4.5 , $t = 2.63$, $P = 0.047$),焦虑(0.67 ± 0.30 , $t = 2.16$, $P = 0.016$)和抑郁(0.64 ± 0.24 , $t = 2.53$, $P = 0.020$)积分也显著增高。IBS患者的消极应对(40.8 ± 8.0 , $P < 0.05$),幻想(4.95 ± 2.1 , $P = 0.001$)和退避(4.81 ± 2.1 , $P = 0.004$)以及主观支持(23.9 ± 4.2 , $P = 0.046$)积分均明显高于正常人。同时IBS患者的睡眠质量、日间功能显著降低,PSQI、睡眠障碍积分和安眠药应用显著增加。多元回归分析显示IBS患者的生活质量降低与睡眠质量($\beta = 0.281$)和负性生活事件($\beta = -0.363$)及焦虑状态($\beta = -0.175$)关系更为密切。

结论: IBS患者生活质量降低与多种心理社会参数异常呈明显的负相关。

王伟岸, 何剑琴, 胡品津, 曾志荣, 陈为. 心理社会因素对肠易激综合征患者生活质量的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1626-1630
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1626.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是常见的功能性肠病(functional bowel disease, FBD)^[1]。由于缺乏客观评价疾病活动状态的生物学标志,健康相关生活质量(health related quality of life, HRQOL)已成为这类

疾病患者临床终效研究的重要评价指标^[2-9]. 因此, 了解影响 IBS 患者 HRQOL 的社会文化背景、心理社会因素以及躯体症状特征有助于制订针对性的治疗策略^[5, 10-12]. 不少学者采用普适性 HRQOL 测评工具^[13-17], 所得结果差异很大. 近年来国际上越来越重视疾病专用生活质量 (quality of life, QOL) 工具在 IBS 临床研究中的应用^[2-5, 18-22], 其中 Drossman et al (Am J Gastroenterol 2000;95:999-1007) 编制的 IBS 专用生活质量量表 (IBS-QOL) 是该类量表中的典范, 已在多个国家应用, 我们已获授权对该量表进行汉化和校正, 发现该量表同样适合国人应用^[19-20]. 尽管心理行为因素在 IBS 发病中具有重要作用已成共识, 但心理行为因素对 IBS 者 HRQOL 的影响还鲜见系统研究. 因此, 我们采用 Drossman et al. 编制的 IBS-QOL, 评价影响就诊 IBS 患者 HRQOL 的心理行为因素.

1 材料和方法

1.1 材料 根据 IBS 罗马 标准^[1], 2002-02/2002-03 在中山大学附属一院消化内科连续就诊的 IBS 患者 41 例, 男 19 例, 女 22 例, 年龄 12-71 (37.1 ± 14.5 岁), 其中腹泻型 19 例, 便秘型 10 例, 腹泻便秘交替型 12 例; 性别、年龄、教育年限、婚姻状况 (已: 否)、患者自评的家庭经济状况 (小康: 非小康) 匹配的对照组来自同地区的健康自愿者 37 名 (男 17 名, 女 20 名, 年龄 38.1 ± 14.7 岁). 所有调查对象均经血常规、血沉、血生化、粪常规、腹部 B 超、钡剂和 / 或肠镜等检查, 排除器质性疾病, 且无明显的神经精神病史及药物酒精滥用史.

1.2 方法 量表包括评价精神症状的临床症状自评量表 (SCL-90)、评价应对策略的特质应对方式问卷和应付方式问卷、社会支持评定量表、汉化的匹兹堡睡眠质量指数 (PSQI), 量表及记分方法按相应文献 (均引自中国心理卫生杂志社. 心理卫生评定量表手册 增订版. 北京, 1999); QOL 评价采用汉化后的 IBS-QOL^[20-22]. PSQI 量表由 23 个条目构成, 分为 7 个域, 包括睡眠质量 (S1)、入睡时间 (S2)、睡眠时间 (S3)、睡眠效率 (S4)、睡眠障碍 (S5)、安眠药物 (S6) 和日间功能 (S7), 每个成份按 0, 1, 2, 3 计分, 各域分相加为 PSQI 总分, 总分越高示睡眠质量越差. 调查对象根据指导语单独完成, 个别文化程度低的患者在经过专门训练的医生指导下完成. 各个量表的 IBS-QOL 包括 34 个条目, 分为 8 个方面, 即烦躁不安 (Q1)、冲突行为 (Q2)、身体角色 (Q3)、健康忧虑 (Q4)、饮食限制 (Q5)、社会反应 (Q6)、异性概念 (Q7) 和家庭关系 (Q8). 每一方面得分通过转换使其值在 0-100 范围内, 得分越高生活质量越好.

统计学处理 采用 SPSS 8.0 进行统计分析, 量表各指标用 mean ± SD 表示; 两样本均数比较用 t 检验, 多样本均数比较用 ANOVA 检验, 多样本比率比较用 χ^2 检验. 并采用逻辑回归分析评价心理社会因素对 IBS-QOL 的影响, P < 0.05 作显著性差异的检验标准.

2 结果

2.1 IBS 患者心理社会因素和 IBS-QOL 的测评 与正常人相比, IBS-QOL 测评结果差异非常显著 (见表 1). 与正常人相比, IBS 患者精神症状总积分 (T) (40.2 ± 4.5, t = 2.63, P = 0.047)、阳性项目数 (P) (0.65 ± 0.31, t = 1.98, P = 0.001)、痛苦水平 (S) (1.44 ± 0.57, t = 1.98, P = 0.001)、抑郁 (0.64 ± 0.24, t = 2.53, P = 0.020) 和焦虑 (0.67 ± 0.30, t = 2.16, P = 0.016) 评分明显增高. IBS 患者消极应对 (PC) 积分 (40.8 ± 8.0) 明显高于正常人 (35.5 ± 7.6, P < 0.05), 而积极应对 (AC) 积分 IBS 患者 (24.9 ± 7.6) 和正常人 (27.2 ± 7.8) 无明显差异 (P > 0.05). 进一步对调查对象进行应付的具体方法测评, 结果显示 IBS 患者的应付方式不同于正常人, IBS 患者的幻想 (4.95 ± 2.1 vs 3.49 ± 1.9, t = 3.86, P = 0.001) 和退避 (4.81 ± 2.1 vs 3.37 ± 2.1, t = 3.94, P = 0.004) 积分显著增高. 社会支持度测评显示, IBS 患者的主观支持度积分 (22.1 ± 3.5) 明显低于正常人 (23.9 ± 4.2, t = 1.14, P = 0.046). 与正常组相比, IBS 组睡眠质量 (1.46 ± 0.69, P = 0.000)、睡眠障碍 (1.41 ± 0.52, P = 0.015)、安眠药物 (0.75 ± 0.42, P = 0.035)、日间功能 (1.23 ± 0.90, P = 0.007) 和 PSQI (7.97 ± 3.54, P = 0.000) 积分均明显增高.

表 1 IBS 患者和正常对照 QOL 的比较

IBS-QOL	正常组	IBS 组	P 值
Q1	96.6 ± 6.0	79.8 ± 18.8	0.000
Q2	96.2 ± 7.1	79.0 ± 22.8	0.000
Q3	97.8 ± 7.1	87.4 ± 18.7	0.004
Q4	97.8 ± 5.1	83.1 ± 21.7	0.000
Q5	97.3 ± 5.2	89.0 ± 16.1	0.012
Q6	96.8 ± 6.2	83.4 ± 17.4	0.000
Q7	97.6 ± 7.7	82.0 ± 25.6	0.001
Q8	97.1 ± 6.0	84.8 ± 21.2	0.001
总分	97.0 ± 5.0	82.6 ± 18.4	0.000

2.2 心理社会因素对 IBS-QOL 的影响 回归分析发现 SCL-90 的躯体化 (ST)、强迫症状 (OC)、人际敏感 (PS)、抑郁 (D)、焦虑 (A)、敌对 (R)、恐怖 (P)、偏执 (L) 和精神病性 (PD) 诸因子均与 IBS-QOL 呈明显负相关 (表 2). 应付方式中合理化应对方式与 IBS-QOL 总分呈负相关 (表 3). 负性事件刺激量和总刺激量与生活质量的多项指标负相关 (表 4). 睡眠质量与多项 IBS-QOL 指标负相关各项及总分均呈显著负相关 (表 5). 以 IBS-QOL 总分作为应变量, 分别以 SCL-90、生活事件、特质应对方式、应付方式、社会支持和睡眠质量各观察指标作为自变量, 作多元逐步回归分析, 结果进入方程的自变量 (及其 β 值) 分别是负性事件刺激量 (-0.363)、焦虑 (-0.175) 和睡眠质量 (0.281), 方程复相关系数 r = 0.409, F = 10.832.

表2 IBS-QOL与SCL-90相关分析

IBS-QOL	T	P	S	ST	OC	PS	D	A	R	P	L	PD
Q1	-0.553 ^b	-0.554 ^b	-0.280 ^b	-0.530 ^b	-0.475 ^b	-0.414 ^b	-0.533 ^b	-0.452 ^b	-0.406 ^b	-0.422 ^b	-0.319 ^b	-0.394 ^b
Q2	-0.607 ^b	-0.607 ^b	-0.375 ^b	-0.600 ^b	-0.537 ^b	-0.470 ^b	-0.577 ^b	-0.461 ^b	-0.406 ^b	-0.440 ^b	-0.330 ^b	-0.418 ^b
Q3	-0.577 ^b	-0.577 ^b	-0.343 ^b	-0.482 ^b	-0.467 ^b	-0.490 ^b	-0.602 ^b	-0.432 ^b	-0.400 ^b	-0.453 ^b	-0.355 ^b	-0.474 ^b
Q4	-0.595 ^b	-0.595 ^b	-0.354 ^b	-0.463 ^b	-0.505 ^b	-0.506 ^b	-0.587 ^b	-0.486 ^b	-0.462 ^b	-0.483 ^b	-0.338 ^b	-0.508 ^b
Q5	-0.603 ^b	-0.603 ^b	-0.386 ^b	-0.571 ^b	-0.523 ^b	-0.504 ^b	-0.607 ^b	-0.433 ^b	-0.321 ^b	-0.482 ^b	-0.344 ^b	-0.455 ^b
Q6	-0.557 ^b	-0.558 ^b	-0.356 ^b	-0.549 ^b	-0.488 ^b	-0.435 ^b	-0.538 ^b	-0.454 ^b	-0.369 ^b	-0.376 ^b	-0.279 ^b	-0.419 ^b
Q7	-0.545 ^b	-0.546 ^b	-0.407 ^b	-0.585 ^b	-0.470 ^b	-0.401 ^b	-0.525 ^b	-0.388 ^b	-0.311 ^b	-0.354 ^b	-0.276 ^b	-0.378 ^b
Q8	-0.618 ^b	-0.618 ^b	-0.342 ^b	-0.604 ^b	-0.549 ^b	-0.546 ^b	-0.586 ^b	-0.507 ^b	-0.339 ^b	-0.502 ^b	-0.413 ^b	-0.463 ^b
总分	-0.635 ^b	-0.636 ^b	-0.379 ^b	-0.601 ^b	-0.549 ^b	-0.506 ^b	-0.619 ^b	-0.496 ^b	-0.424 ^b	-0.477 ^b	-0.360 ^b	-0.471 ^b

^aP < 0.05, ^bP < 0.01.

表3 特质应对方式、应付方式与IBS-QOL

IBS-QOL	PC	AC	解决问题	自责	求助	幻想	退避	合理化
Q1	-0.160	0.128	0.008	-0.079	-0.006	-0.013	0.019	-0.218 ^a
Q2	-0.106	0.052	-0.055	0.011	0.021	0.040	0.040	-0.187 ^a
Q3	-0.154	0.027	-0.040	-0.111	-0.002	0.008	-0.065	-0.270 ^b
Q4	-0.172	0.118	0.050	-0.057	-0.017	-0.006	0.063	-0.157
Q5	-0.058	0.030	-0.089	-0.043	0.050	-0.017	-0.095	-0.253 ^b
Q6	-0.109	0.074	-0.058	-0.052	-0.002	-0.016	-0.040	-0.132
Q7	-0.044	0.044	-0.146	-0.011	-0.110	-0.037	0.017	-0.171
Q8	-0.128	0.095	-0.010	-0.059	0.074	-0.037	0.035	-0.172
总分	-0.135	0.084	-0.038	-0.053	0.004	-0.003	0.005	-0.215 ^a

^aP < 0.05, ^bP < 0.01.

表4 IBS-QOL与生活事件、社会支持相关分析

IBS-QOL	正性事件	负性事件	总刺激量	总支持分	客观分	主观分	利用度
Q1	0.147	-0.287 ^b	-0.293 ^b	-0.082	-0.165	-0.020	0.008
Q2	0.237 ^a	-0.338 ^b	-0.360 ^b	-0.129	-0.187 ^a	-0.043	-0.078
Q3	0.269 ^b	-0.461 ^b	-0.478 ^b	-0.148	-0.228 ^a	-0.043	-0.083
Q4	0.149	-0.457 ^b	-0.444 ^b	-0.093	-0.158	-0.016	-0.051
Q5	0.208 ^a	-0.331 ^b	-0.347 ^b	-0.095	-0.158	-0.039	-0.010
Q6	0.159	-0.183	-0.203 ^a	-0.078	-0.173	0.013	-0.034
Q7	0.127	-0.231 ^a	-0.237 ^a	-0.116	-0.180	-0.042	-0.044
Q8	0.179	-0.349 ^b	-0.356 ^b	-0.019	-0.091	0.018	0.040
总分	0.206 ^a	-0.357 ^b	-0.370 ^b	-0.108	-0.187 ^a	-0.026	-0.037

^aP < 0.05, ^bP < 0.01.

表5 IBS-QOL与睡眠质量相关分析

IBS-QOL	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	PSQI
Q1	-0.253 ^a	-0.076	-0.097	-0.055	-0.143	-0.071	-0.135	-0.212 ^a
Q2	-0.283 ^b	-0.041	-0.135	-0.086	-0.098	-0.008	-0.062	-0.185
Q3	-0.240 ^a	-0.066	-0.161	-0.135	-0.226 ^a	-0.046	-0.076	-0.221 ^a
Q4	-0.307 ^b	-0.070	-0.167	-0.075	-0.102	-0.074	-0.037	-0.202 ^a
Q5	-0.243 ^a	-0.085	-0.236 ^a	-0.190	-0.152	-0.126	-0.183	-0.281 ^b
Q6	-0.188	-0.028	-0.137	-0.080	-0.114	-0.048	-0.060	-0.159
Q7	-0.369 ^b	-0.108	-0.214 ^a	-0.233 ^a	-0.286 ^b	-0.108	-0.114	-0.325 ^b
Q8	-0.190	-0.088	-0.066	-0.032	-0.106	-0.099	-0.055	-0.160
总分	-0.281 ^b	-0.071	-0.152	-0.104	-0.155	-0.066	-0.098	-0.227 ^a

^aP < 0.05, ^bP < 0.01.

3 讨论

QOL 作为一个重要的终效评价指标, 已广泛应用于临床研究^[2-5]. IBS 患者的健康质量受到不同程度的影响^[6,8-21]. 我们采用疾病专用的 IBS-QOL 发现 IBS 组 QOL 总分及各因子分(即烦躁不安、冲突行为、身体角色、异性概念、社会反应、饮食限制、健康忧虑和家庭关系)均显著低于正常组, 进一步说明 IBS 患者的 QOL 是明显降低的. 影响 IBS 患者 QOL 的因素是多方面的, 不仅包括患者的躯体症状, 还涉及患者所处的社会文化背景、患者的心理行为因素和就诊状态以及人口学因素^[2, 5, 9, 11, 15]. 基层医疗单位就诊患者的 QOL 明显好于综合性医学中心就诊的患者^[8, 9, 11, 15, 21], 心理因素和躯体症状分别是影响 IBS 患者 QOL 的独立因素^[16, 22-26]. 女性性别^[2, 9]和睡眠质量^[25-26]也可能是影响患者 QOL 的重要因素. 我们重点探讨了 IBS 患者心理行为因素与 IBS-QOL 的关系, 发现 IBS 患者精神症状多项评分(抑郁、焦虑等积分增高明显)不同于正常人, 并且消极应对积分明显高于正常人, 常常通过幻想和退避来应对具体生活事件, 其主观社会支持度积分也明显低于正常人. 与正常组相比, IBS 组的睡眠质量明显降低. 这些有助于说明就诊 IBS 患者存在多种心理行为异常. 这些心理行为因素的外在表现反映在患者的疾病行为上, 是生活质量测评的重要内容^[2-3]. 因此, 我们进一步评价了这些心理行为因素与患者 QOL 的关系, 发现以 IBS-QOL 总分作为应变量, 以睡眠指数各领域评分作自变量, 多元逐步回归分析显示睡眠质量对 QOL 影响明显, $F^2 = 7.9\%$, 即 QOL 可由睡眠质量解释的比例是 7.9%. 这提示临床上对 IBS 患者进行 QOL 评价时, 不应忽视患者的睡眠质量. IBS 患者 QOL 与生活事件总刺激量尤其是负性事件刺激量、SCL-90 总分及躯体化、强迫症状、人际敏感、忧郁、焦虑、敌对、恐怖、偏执和精神病性诸因子高度负相关, 说明心理认知异常和应付策略不当是影响 IBS 患者 QOL 的重要因素.

IBS 治疗的重要目标是提高患者的 QOL^[19, 27]. 因此, QOL 已成为评价 IBS 病情转归和治疗效果的重要指标^[2, 19-20, 28-32]. 研究发现对有心理行为异常 IBS 患者进行心理行为治疗, 可有效缓解临床症状, 提高患者的 QOL, 减少有限医疗资源的不当占用^[19-20, 28-32]. 我们还发现, 尽管总体上心理行为因素对就诊 IBS 患者 QOL 有明显影响, 但不同 IBS 患者心理行为特征又有差异. 这是值得重视的, 临床上应采用个体化的治疗措施, 纠正 IBS 患者的心理行为异常. 在本研究中, IBS 病例来自区域医学中心的专科门诊, 无疑存在明显的病例选择偏倚. 为探讨心理行为因素与 IBS 患者 QOL 的明确关系, 应进一步研究不同就诊状态 IBS 患者生活质量的影响因素. 致谢: IBS 专用生活质量量表汉化由 Drossman DA, Patrick DL 等三方联合授权王伟岸进行.

4 参考文献

- 1 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45(Suppl 2):43-47
- 2 王伟岸, 胡品津. 生活质量评价与功能性胃肠病. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;11:312-314
- 3 Glise H, Wiklund I. Health-related quality of life and gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl): S72-84
- 4 El-Serag HB. Impact of irritable bowel syndrome: prevalence and effect on health-related quality of life. *Rev Gastroenterol Disord* 2003;3(Suppl 2):S3-11
- 5 Muller-Lissner S, Koch G, Talley NJ, Drossman D, Rueegg P, Dunger-Baldauf C, Lefkowitz M. Subject's global assessment of relief: an appropriate method to assess the impact of treatment on irritable bowel syndrome-related symptoms in clinical trials. *J Clin Epidemiol* 2003;56:310-316
- 6 Portincasa P, Moschetta A, Baldassarre G, Altomare DF, Palasciano G. Pan-enteric dysmotility, impaired quality of life and alexithymia in a large group of patients meeting ROME II criteria for irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:2293-2299
- 7 Wiklund IK, Fullerton S, Hawkey CJ, Jones RH, Longstreth GF, Mayer EA, Peacock RA, Wilson IK, Naesdal J. An irritable bowel syndrome-specific symptom questionnaire: development and validation. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:947-954
- 8 Akehurst RL, Brazier JE, Mathers N, O'Keefe C, Kaltenthaler E, Morgan A, Platts M, Walters SJ. Health-related quality of life and cost impact of irritable bowel syndrome in a UK primary care setting. *Pharmacoeconomics* 2002;20:455-462
- 9 El-Serag HB, Olden K, Bjorkman D. Health-related quality of life among persons with irritable bowel syndrome: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1171-1185
- 10 Kellow JE. Treatment goals in irritable bowel syndrome. *Int J Clin Pract* 2001;55:546-551
- 11 Bijkerk CJ, de Wit NJ, Stalman WA, Knottnerus JA, Hoes AW, Muris JW. Irritable bowel syndrome in primary care: the patients' and doctors' views on symptoms, etiology and management. *Can J Gastroenterol* 2003;17:363-368
- 12 Kennedy A, Robinson A, Rogers A. Incorporating patients' views and experiences of life with IBS in the development of an evidence based self-help guidebook. *Patient Educ Couns* 2003;50:303-310
- 13 Frank L, Kleinman L, Rentz A, Ciesla G, Kim JJ, Zacker C. Health-related quality of life associated with irritable bowel syndrome: comparison with other chronic diseases. *Clin Ther* 2002;24:675-689
- 14 Si JM, Chen SJ, Sun LM. An epidemiological and quality of life study of irritable bowel syndrome in Zhejiang province. *Zhonghua Neike Zazhi* 2003;42:34-37
- 15 Li FX, Patten SB, Hilsden RJ, Sutherland LR. Irritable bowel syndrome and health-related quality of life: a population-based study in Calgary, Alberta. *Can J Gastroenterol* 2003;17:259-263
- 16 Gruszczynski W, Latos W. Quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Psychiatr Pol* 2002;36(6 Suppl): 331-338
- 17 Pace F, Molteni P, Bollani S, Sarzi-Puttini P, Stockbrugger R, Porro GB, Drossman DA. Inflammatory bowel disease versus irritable bowel syndrome: a hospital-based, case-control study of disease impact on quality of life. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1031-1038
- 18 Groll D, Vanner SJ, Depew WT, DaCosta LR, Simon JB, Groll A, Roblin N, Paterson WG. The IBS-36: a new quality of life measure for irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:962-971
- 19 王伟岸, 潘国宗, 钱家鸣. 难治性肠易激综合症的认知治疗. *中华内科杂志* 2002;41:156-159
- 20 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征. *中国医学科学院学报* 2003;25:74-78
- 21 Simren M, Abrahamsson H, Svedlund J, Bjornsson ES. Quality of life in patients with irritable bowel syndrome seen in referral centers versus primary care: the impact of gender and predominant bowel pattern. *Scand J Gastroenterol* 2001;36: 545-552

- 22 Lea R, Whorwell PJ. New insights into the psychosocial aspects of irritable bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5:343-350
- 23 Rutter CL, Rutter DR. Illness representation, coping and outcome in irritable bowel syndrome (IBS). *Br J Health Psychol* 2002;7(Pt 4):377-391
- 24 Silk DB. Impact of irritable bowel syndrome on personal relationships and working practices. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1327-1332
- 25 Rotem AY, Sperber AD, Krugliak P, Freidman B, Tal A, Tarasiuk A. Polysomnographic and actigraphic evidence of sleep fragmentation in patients with irritable bowel syndrome. *Sleep* 2003;26:747-752
- 26 何剑琴, 王伟岸, 胡品津, 陈为. 肠易激综合征患者睡眠质量特征. *世界华人消化杂志* 2004;12:744-747
- 27 詹丽杏, 李兆申. 肠易激综合征的诊断与治疗. *世界华人消化杂志* 2001;9:1177-1179
- 28 Creed F, Ratcliffe J, Fernandez L, Tomenson B, Palmer S, Rigby C, Guthrie E, Read N, Thompson D. Health-related quality of life and health care costs in severe, refractory irritable bowel syndrome. *Ann Intern Med* 2001;134(9 Pt 2):860-868
- 29 Bijkerk CJ, de Wit NJ, Muris JW, Jones RH, Knottnerus JA, Hoes AW. Outcome measures in irritable bowel syndrome: comparison of psychometric and methodological characteristics. *Am J Gastroenterol* 2003;98:122-127
- 30 Watson ME, Lacey L, Kong S, Northcutt AR, McSorley D, Hahn B, Mangel AW. Alosetron improves quality of life in women with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001;96:455-459
- 31 Creed F, Fernandes L, Guthrie E, Palmer S, Ratcliffe J, Read N, Rigby C, Thompson D, Tomenson B. North of England IBS Research Group. The cost-effectiveness of psychotherapy and paroxetine for severe irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2003;124:303-317
- 32 Gonsalkorale WM, Miller V, Afzal A, Whorwell PJ. Long term benefits of hypnotherapy for irritable bowel syndrome. *Gut* 2003;52:1623-1629

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

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 编辑

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

1 题名

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

2 摘要

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

3 正文

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

4 参考文献

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

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

溃疡性结肠炎相关基因研究

刘慧荣, 郑 昱, 吴焕淦, 费晓燕

刘慧荣, 吴焕淦, 上海市针灸经络研究所 上海市 200032
郑昱, 费晓燕, 上海中医药大学附属龙华医院 上海市 200032
国家自然科学基金资助项目 No.30171178
国家中医药管理局资助项目 02-03JP14
项目负责人: 吴焕淦, 200030, 上海市宛平南路 650 号, 上海市针灸经络研究所.
电话: 021-54592009
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-03-24

摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的难治性肠病,其病因和发病机制复杂,迄今尚不十分清楚,诸多基因与之密切相关.免疫功能的异常是UC发病的关键因素之一,多种细胞因子参与UC的发生发展;凋亡基因、癌相关基因与UC肠道病变及癌变密切相关;UC具有较高的遗传倾向,遗传基因表达失调;最新的基因表达谱研究也显示UC与多种基因表达异常相关.

刘慧荣, 郑昱, 吴焕淦, 费晓燕. 溃疡性结肠炎相关基因研究. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1631-1637

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1631.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种反复发作的难治性肠病,其病因和发病机制复杂,迄今尚不十分清楚,但诸多研究显示其与遗传、免疫、环境等因素密切相关,并存在着高于正常人群5-8倍的癌变率^[1].近年来,随着分子生物学技术和基因研究的快速发展,溃疡性结肠炎相关基因表达研究取得一定进展,从多角度对其病因和发病机制进行了探索.

1 细胞因子基因表达异常与UC的发生发展

免疫功能的异常是UC发病的关键因素之一,细胞因子在其病理过程中起着重要作用.重要的促炎细胞因子有IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等,抗炎细胞因子有IL-1ra, IL-4, IL-10, TGF- β 等,促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子的平衡调节,对维持肠道正常免疫反应具有十分重要的病理生理意义^[2-5].

白介素 1(IL-1)是一种具有多种生物活性并能作用于体内多种组织和器官的细胞因子,他在局部和全身炎症及免疫反应中起核心作用,能诱导其他炎症细胞因子(如IL-6)、趋化因子、黏附分子、急性时相蛋白和组织重建酶等的合成.IL-1被公认为是介导UC发病的重要细胞因子之一,可以产生对中性粒细胞等炎症细胞的趋化作用,吸引其进入肠道病变部位,从而引起一系列的肠道病变,如结肠上皮的损伤、小血管

炎、隐窝脓肿等,最终造成UC的发病.相关动物实验研究中发现,正常大鼠结肠黏膜IL-1 β mRNA表达阴性,UC大鼠结肠黏膜IL-1 β mRNA表达增高^[6-9],Street、朱峰 et al 临床研究也显示UC患者肠黏膜活检组织IL-1 β mRNA表达显著增强,且在长期反复发作型UC中表达增高更加明显^[10-12],并有学者认为IL-1mRNA可作为监测UC病情活动和评价临床疗效的指标,还可监测UC早期或潜在活动^[10].

IL-6是主要由T、B细胞和单核-巨噬细胞分泌的细胞因子,在机体的炎症反应和免疫调节过程中发挥重要作用.可协同IL-1诱导T淋巴细胞表达IL-2和IL-2R,促进T细胞的增生^[13],也可促进B细胞的终末分化,诱导免疫球蛋白的分泌,加强细胞毒T细胞及自然杀伤细胞溶解细胞的能力^[14].研究表明UC患者结肠黏膜中IL-6主要来自巨噬细胞,也可由结肠上皮细胞分泌,LPS、IL-1、TNF- α 、集落刺激因子等能刺激IL-6的产生^[15],其作为重要炎症和免疫介导因子参与UC的病理过程.IL-6mRNA在溃疡性结肠炎大鼠脾脏和结肠黏膜中大量表达,而正常对照组大鼠未见表达^[6].研究发现细胞因子IL-6mRNA的表达在UC活动期均高于非活动期^[16-17],UC病变部位的固有层单核细胞(LPNC)表达大量IL-6mRNA并且分泌大量IL-6蛋白,且与疾病活动性呈正相关^[18].

IL-8是吸引、激活多形核中性白细胞的重要细胞因子,该细胞在UC病变肠道内大量存在.诸多研究显示IL-8mRNA的表达在UC发病机制中起到了重要作用,他们作为炎症递质,介导了黏膜病理损伤.已有研究表明,UC患者可能存在短暂的IL-8基因表达稳定性的改变^[19],UC患者肠黏膜活检组织IL-8mRNA表达与对照组相比明显升高,且与HF- κ B DNA结合活性呈显著正相关^[11],在疾病活动期高于非活动期^[16],并可作为监测UC病情活动和评价临床疗效的指标之一^[10].

李琪佳 et al^[17]对UC结肠黏膜TNF- α 表达与UC不同时期浸润的炎细胞免疫表型之间的关系的研究显示,TNF- α mRNA的表达在活动期高于非活动期.Akazawa et al 发现UC患者结肠黏膜TNF- α mRNA表达增高,并与炎症活动程度相关^[9,20],动物实验研究也显示相同结果^[21].因此,可知促炎症因子TNF- α 在UC的发病过程中也发挥着重要作用.

IL-10是Th2细胞、B淋巴细胞、单核以及巨噬细胞产生的一种具有多向性生物活性的免疫抑制因子,起初称为“细胞因子合成抑制因子”(cytokine synthe-

sis inhibiting factor, CSIF), 后命名为 IL-10^[22]. 许多研究证明 IL-10 具有广泛的抑制促炎细胞因子的作用, 他几乎抑制所有促炎细胞因子的合成与释放, 如单核细胞产生 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-8 以及 T 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 等, 还促进抑炎细胞因子白介素 1 受体拮抗剂的合成, 因而具有抑制炎症反应的作用^[23-26]. 而有关 IL-10 在 UC 中表达的研究显示出不同的结果, 也得到不同的解释, Niessner et al 发现与对照组相比活动期 UC 患者肠黏膜 IL-10 mRNA 表达较对照组显著增高, 认为 IL-10 是控制 IBD 炎症反应的重要调节因子^[27]; Akagi et al^[28]的临床研究也显示, UC 患者炎症和非炎症肠组织 IL-10 mRNA 表达均显著增高; 而 Gasche et al^[29]报道, UC 患者肠组织中 IL-10 mRNA 表达减少, 其炎性结肠黏膜固有层单核细胞产生 IL-10 减少及对 rhIL-10 反应减弱. Roussomoustakaki et al^[30]的研究显示 ANCA(+)UC 患者的 IL-1RA 基因 2 频率明显高于 ANCA(-)UC 患者. Bulois et al^[31]用 RT-PCR 方法分析患者的结肠黏膜发现: 当 UC 患者组织学损伤评分 >2 分, 中性粒细胞浸润 >10% 和有隐窝脓肿时, IL-10/IL-8 mRNA 表达显著下降, IL-8 和 IL-10 之间的失衡与结肠黏膜组织损伤有关.

Inoue et al^[32]观察了 61 例溃疡性结肠炎患者, 并设 18 例炎症对照组和 16 例非炎症对照组. 应用 RT-PCR 检测结肠组织中 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-13 和 IL-15 基因表达的变化. 结果 UC 患者 IL-10 表达比率(75.4%)高于非炎症对照组(37.5%, $P < 0.01$), IL-4 阳性表达率(41%)高于炎症对照组(5.6%, $P < 0.01$) 和非炎症对照组. IL-4 (66.7% vs 20.6%, $P < 0.01$) 和 IL-13 (63.0% vs 29.4%, $P < 0.01$) 在活动期 UC 阳性表达高于非活动期 UC. IL-2、IFN- γ 和 IL-15 阳性表达率在各组临床、肠镜、病理炎症分级中均无差异. 提示在活动性 UC 中, IL-4 作为中枢与其他 Th2 样细胞因子共同发挥作用, 而 Th1 样细胞因子和 IL-15 与 UC 局部炎症无明显相关. Sawa et al^[33]应用实时定量 PCR 检测显示活动性 UC 患者结肠黏膜 IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-8、IL-12p40、IFN- γ 和 TNF- α mRNA 表达显著增高.

其他相关细胞因子在 UC 中基因表达研究, 如 Seeger et al^[34]通过对 21 例 IBD 患者(包括 10 例 UC 患者)的研究显示其炎性肠黏膜的 IL-16 mRNA 及其蛋白表达显著增高, 并能促进其他促炎性细胞因子的分泌, 如 IL-1 β 、IL-6、IL-15、TNF- α 等. 王晓娣 et al^[35]对 UC 患者病变部位的黏膜固有层 CD⁺₄T 细胞(LP-CD⁺₄T)与非受累部位的 LP-CD⁺₄T 细胞比较, 他们表达大量的 IL-17 mRNA 并自发分泌大量 IL-17 蛋白. Nielsen et al^[36]结果显示, IL-17 mRNA 在中度和重度活动性 UC 中表达增高, 在活动性 UC 中 IL-12 mRNA 表达水平上调, 缓解期 IL-12 mRNA 表达水平与对照组无差异.

Autschbach et al^[37]应用实时定量 RT-PCR 对 IBD 中 35 个编码细胞因子, 化学增殖素和肠道中的相关分子

的 mRNA 进行分析. 结果 IFN- γ mRNA 呈高水平表达. Lawrance et al^[38]应用原位杂交和免疫组化法分析 TGF- β 和 IGF-1 mRNA 在 CD 肠纤维化、CD 炎症、UC 炎症和对照组肠组织中的表达. TGF- β 和 IGF-1 mRNA 在 UC 表达增高局限在固有层和黏膜下层, 同时在该分布区伴有炎细胞浸润, III 型胶原和 I 型胶原表达比率也增高, 与炎症浸润相一致. 结果提示 TGF- β 和 IGF-1 参与患者肠道细胞外基质的重构, 他们表达的增高依赖于炎症浸润的范围和存在度, 而不是炎症性肠病的类型. di Mola et al^[39]研究显示溃疡性结肠炎中, 神经生长因子(NGF) mRNA 表达增加 58% (2.4-fold; $P < 0.01$), 其高亲和力受体 TrkA mRNA 表达增加 50% (1.5-fold; $P < 0.05$). 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)在炎症性肠病肠组织损伤中可能也起着一定作用, Klebl et al^[40]研究发现患者肠组织 M-CSF 表达频率增高, 但并未发现黏膜 M-CSF mRNA 水平增高.

2 凋亡基因、癌基因表达异常与 UC 癌变相关性

溃疡性结肠炎发病过程中存在细胞凋亡的异常, 并受多种因素的影响. 目前越来越多的证据提示, 肠上皮细胞的凋亡加速与炎症细胞(如中性粒细胞)的凋亡抑制是导致溃疡性结肠炎结肠组织损伤和免疫紊乱的重要机制之一^[41-42]. 同时, 溃疡性结肠炎的形成和演化过程中存在着一系列的癌相关基因表达变化, 慢性复发型溃疡性结肠炎患者具有明显癌变倾向. 癌基因在溃疡性结肠炎癌变过程中发挥着极为重要的作用.

Bcl-2 基因是人们在研究 B 细胞淋巴瘤中发现的一种异常表达的原癌基因, 位于第 18 号染色体短臂(18q^{21.3}), 近年发现, Bcl-2 为一种细胞凋亡抑制基因, 有人又称之为自身免疫基因^[43]. 促凋亡基因 bax 在决定细胞凋亡中也起着重要的作用, Bax 是 1993 年在人前 B 细胞基因文库发现的一种新基因, 是 bcl-2 家族的新成员, 功能上与抗凋亡基因 bcl-2 相反, 可与 bcl-2 形成异源二聚体, 从而抑制 bcl-2 的功能, bax/bcl-2 的比率决定了凋亡的发生与否, 当促凋亡基因 bax 表达过量时, 促进凋亡的发生^[44]. 而 Iimura et al^[45]研究 Bax/Bcl-2 系统在诱导 UC 炎症结肠上皮细胞凋亡的作用中发现 CD95, Bcl-xL 和 Bcl-2 蛋白在正常和 UC 结肠上皮表达水平相当, 而 Bax 蛋白和 mRNA 表达在正常结肠和非活动期 UC 结肠上皮表达一致, 在 UC 炎症结肠上皮 Bax 蛋白和 mRNA 表达显著下降. 研究首次显示 Bax 在 UC 炎症结肠上皮表达降低, 提示在 UC 炎症性结肠黏膜 Bax/Bcl-2 系统似乎并未参与上皮细胞凋亡.

Fas/FasL 也是溃疡性结肠炎肠上皮细胞凋亡的重要途径之一. 正常结肠上皮细胞表达 CD95(Fas), 只有少量 CD95 配体(FasL)阳性细胞散在分布邻近的肠上皮中, 凋亡细胞数量也明显增加, Fas 和 FasL 结合形成死亡诱导信号复合物于固有层, 而在溃疡性结肠炎组织中, FasL 阳性细胞数量明显增加, 其最终引起细胞

凋亡; FasL 在活动性溃疡性结肠炎病变部位表达增强, 可直接使表达 Fas 的结肠上皮凋亡, 并且可通过 IL-8 的产生, 增加中性粒细胞和淋巴细胞的迁移和活性, 从而导致溃疡性结肠炎黏膜的进行性损害^[46-48]. Ueyama et al^[47]对正常和 UC、CD 患者结肠黏膜标本的研究显示, FasL mRNA 在 UC 结肠黏膜病变部位表达增强, 但在与活动性 CD 和活动性直肠炎型 UC 相关的黏膜中表达不明显; FasL mRNA 表达发生在单核细胞浸润的病变部位. Fas 在 UC、CD 和正常的上皮细胞表达, 而 FasL 在 CD3 淋巴细胞浸润的活动性损伤黏膜固有层表达, 认为 Fas-FasL 诱导的凋亡参与 UC 的黏膜损伤.

p53 是一种参与 DNA 修复及诱导细胞凋亡的 DNA 结合蛋白, 野生型 p53 像一个“分子警察”那样监督着 DNA 的完整性. 当 DNA 受到各种基因毒剂损伤时, 野生型 p53 诱导细胞进入 G1 期, 抑制细胞增生, 直到 DNA 修复. 如损伤不能被修复, 野生型 p53 就诱导那些细胞凋亡的基因转录, 使其进入细胞凋亡状态. 当野生型 p53 基因突变时, 便失去了对细胞的监视作用, 细胞因遗传不稳而产生突变和染色体畸变, 最后导致细胞癌变. Yoshida et al^[49]在对溃疡性结肠炎的研究中发现长期溃疡性结肠炎患者存在着 p53 基因突变. Fujii et al^[50]发现 UC 患者有发生结肠癌的高风险, UC 患者再生上皮组织中 p53 外显子 5-8 突变发生频繁. Hussain et al^[51]的研究也显示 UC 中 p53 突变增加, 具有癌变倾向. Brentnall et al^[52]对溃疡性结肠炎活检标本的非分化异常细胞进行了检测, 结果 30% 检出 p53 基因改变, 并发现 p53 突变是早于 p53 杂合子丢失的遗传事件, p53 突变与非整倍体性密切相关. 刘变英 et al^[53]对大肠癌及癌前病变多个相关基因表达的探讨发现 p53 在大肠癌、大肠腺瘤、溃疡性结肠炎及正常组织中高表达率分别为 55%、57%、50%、0%, 突变率分别为 37.5%、14.3%、8.3%、0%, 有显著差异 ($P < 0.05$). 提示 p53 基因高表达在大肠癌前病变即已发生, 与大肠癌的发展阶段有关. 李志 et al^[54]应用改进的非同位素 PCR-SSCP 方法对溃疡性结肠炎及溃疡性直肠癌 (UCACRC) 患者的活检及手术标本进行 p53 基因的检测研究结果显示, 溃疡性结肠炎、癌旁组织及 CRC 分别检出 28.6% (6/21)、31.6% (6/19) 及 47.4% (9/19) 的病例发生 p53 基因改变. 认为 p53 基因的改变在 UCACRC 不是晚期事件. Heinzlmann et al^[55]对 190 例患者 (包括 UC73 例, CD58 例及对照组 49 例非肿瘤、10 例结直肠癌) 的结肠灌洗液分析 p53 和 K-ras 的突变情况. 结果在癌症患者突变发生最频繁 (5/10, 50%), 而在非肿瘤对照组很少发生 (1/49, 2.0%). 在 CD 患者中发生率为 15.4%, 广泛性 UC 中为 18.6%, 左半结肠 UC 中 13.3%, 远端 UC 中为 6.7% ($P > 0.05$). 与疾病病程呈正相关 (11 a, $P < 0.05$).

对于溃疡性结肠炎细胞凋亡的基因调控研究表明, 在 p53 基因表达升高的同时, 溃疡性结肠炎癌变后 c-myc 基因表达亦有显著升高. c-myc 基因亦具有诱导增

生与结肠细胞细胞凋亡的双向作用, 而 c-myc 基因诱导细胞凋亡则需要 p53 基因的参与^[56-57]. Macpherson et al^[58]研究显示 c-myc 原癌基因在 UC 患者结肠组织中表达增高. 刘变英 et al^[53]对大肠癌及癌前病变多个相关基因表达的探讨亦发现 C-myc 基因在大肠癌、大肠腺瘤、溃疡性结肠炎及正常组织中高表达率分别为 95%、63.3%、66.7%、0%.

此外, 对溃疡性结肠炎癌相关的基因研究还发现在大肠癌、大肠腺瘤、溃疡性结肠炎及正常组织中 p73 基因高表达率分别为 82.5%、81.6%、41.7%、15.4%, 有显著差异 ($P < 0.05$), 仅大肠癌组检出 7 例 p73 基因缺失. DCC 基因高表达率、突变率、缺失率在大肠癌分别为 5%、47.5%、40%, 大肠腺瘤分别为 4.1%、14.3%、18.4%, 溃疡性结肠炎分别为 16.7%、25%、0%, 正常组仅 1 例高表达. K-ras 基因在大肠癌、大肠腺瘤、溃疡性结肠炎中高表达率分别为 60%、57.1%、58.3%, 突变率分别为 40%、25.4%、16.7%, 正常组织无高表达或突变^[53]. Kitamura et al^[59]发现 HGF-Met 系统参与 UC 炎症黏膜修复过程, 并为 HGF 和 c-met 基因异常表达提示 UC 患者具有癌变倾向的观点提供了证据. 他们研究了肝细胞生长因子 (HGF) 和 c-met 基因在 UC 患者、UC 相关性结直肠癌患者和正常对照结肠黏膜标本中的表达. 结果与对照组比较 UC 炎症肠黏膜中 HGF 和 c-met 基因表达显著增高, 在 UC 相关性结直肠癌周围炎症组织 HGF 基因表达亦显著增高, c-met 基因在 UC 相关性结直肠癌肠黏膜中高水平过度表达. Hisamatsu et al^[60]的研究显示 IFN- γ 诱导的基因家族 1-8U 在 UC 相关癌强烈表达, 在未癌变的 UC 患者肠黏膜中也表达增强, 但正常黏膜无表达.

3 基因多态性与 UC 遗传倾向

众多研究显示, UC 具有较高的遗传倾向, 一般认为, 不同血统人中, 与 UC 相关联的抗原不同, 提示 UC 通过 MHC 系统带有遗传倾向或带有与本病有关联基因的人群对本病的易感. 董跃斌 et al^[61]对 UC 的 MHC-DR 和 DQ 基因多态性与正常人群进行了分析研究, 结果表明, 人类 MHC-DRB1*0301 和 MHC-DQB1*0301 与汉族人溃疡性结肠炎具有显著相关性, 呈正相关, 可能为汉族人 UC 易感基因或易感亚基因, 尤其是 DRB1*0301. 殷石 et al^[62]从免疫、遗传学角度对 32 例溃疡性结肠炎患者及 101 名无血缘关系的健康人进行 HLA- A、B、C、D 类 (C-4|A、C-4|B、BF) 基因频率及红细胞免疫功能进行测定, 结果 UC 患者的 HLA-B-5|、B-27| 基因频率显著增高, 而 C-4|AQ-0| 的基因频率显著降低, 其他基因 (HLA-A、B、C、A、C-4|B、BF) 和 UC 无明显相关, 提示 HLA-B-5|、B-27| 是我国 UC 的易感基因, C-4|AQ-0| 是抗性基因.

彭仲生 et al^[63]则研究了溃疡性结肠炎患者的人类白

细胞抗原-DR(HLA-DR)基因分型,并分析其与抗中性粒细胞抗体(ANCA)及疾病分型的关系.对81例UC患者和123名健康者分析结果发现:UC患者ANCA的阳性率为55.0%,对照组均为阴性;UC患者HLA-DR2及DR15基因阳性率分别为58.8%和40.0%,较对照组30.1%、17.9%显著增高;与ANCA(-)UC患者比较,ANCA(+)UC患者的DR15基因阳性率显著增加,而DR16基因阳性率显著降低;慢性持续型UC DR2和DR15基因阳性率较其他型显著增加.认为在ANCA阳性和阴性的UC中,分别由DR15和DR16基因阳性率增加所致,HLA-DR基因分型与临床分型有关.Stokkers et al^[64]有关HLA-DR研究的18篇报道荟萃分析,发现HLA-DR2与UC密切相关,即使剔除日本人的研究报道仍然相关,DR2基因频率增加由DR15基因频率增加所致.Futami et al^[65]的研究则显示中国人UC亦与HLA-DR2及DR15基因相关联.而Yang et al^[66]的研究发现,ANCA(+)UC与HLA-DR2基因有关,ANCA(-)UC与HLA-DR4基因有关.

对于IL-1ra基因多态性是否与UC易感性有关,一直有争论,彭仲生 et al^[67]对81例UC患者和114名健康者进行IL-1 β 、IL-1RA、IL-4基因多态性分析.发现中国汉族UC患者与IL-4内含子3的基因多态性相关联,UC患者IL-4RP1基因频率明显降低,而RP2基因频率明显增加,与正常人的差异发生在抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)(+)UC患者;中国汉族UC患者与IL-1 β 、IL-1RA基因多态性无关联.但Bouma et al发现IL-1ra第2位等位基因及单型TNF-C与UC病情程度有显著关系^[68-69].

淋巴毒素 α (LT α),亦称肿瘤坏死因子 β (TNF- β),由激活的T细胞分泌,在炎症性肠病黏膜免疫等方面具有上行调节等重要作用.夏冰 et al^[70-71]检测湖北地区汉族UC和CD患者及健康对照者LT α AspH1以及IL-1RA基因多态性,观察不同种族对UC和CD遗传易感性的影响.研究结果显示中国湖北地区汉族UC和CD患者与正常对照组LT α AspH1基因多态性无显著性差异,IL-1RA基因多态性无显著性差异,提示该基因多态性与汉族人UC无显著性相关.还发现炎症性肠病淋巴毒素 α 基因型1和2杂合子略高于正常对照组,而且淋巴毒素 α 等位基因2与周围血单个核细胞诱生的高水平肿瘤坏死因子 α 产量有关.白介素1受体拮抗剂基因多态与炎症性肠病无显著性相关.认为:中国人群炎症性肠病患者淋巴毒素 α 基因可能对肿瘤坏死因子 α 产生起一定作用.荷兰Pena小组的研究显示LT α 基因第一内含子AspH1限制性片段长度多态性在IBD与正常组比较差异无显著性^[72].

4 溃疡性结肠炎基因表达谱研究

生物芯片是近几年发展起来的一项前沿生物技术,他可快速、高效、大规模、高通量及平行性获取相关生物信息,自1995年Stanford大学的Schena和Brown et al

发表第一篇基因表达谱芯片文章以来,基因芯片已被广泛应用.近年来,已有部分科学工作者应用该技术进行溃疡性结肠炎的相关研究.Dieckgraefe et al^[73-74]应用cDNA array技术对UC患者和炎症、非炎症对照标本UC结肠黏膜基因表达谱进行研究与分析.认为DNA array研究能够提供有关疾病发病机制的大量信息,发现一些炎症递质有可能决定着活动性UC特殊组织学特征.并在应用Affymetrix公司基因芯片杂交实验研究中发现,IBD患者结肠黏膜Reg(regenerating)基因家族中Reg I α 、Reg I β 和Reg III mRNA表达增高.研究提示Reg I α 可能在炎症中起阻止上皮细胞凋亡的作用.Dieckgraefe et al应用Affymetrix基因芯片杂交和组织病理学评分的研究结果显示Reg家族基因表达增高明显,进一步研究显示,结肠黏膜Reg I α 、Reg I β 和Reg III mRNA过度表达.Uthoff et al^[75]应用该技术对UC和CD患者炎性肠黏膜进行分析,发现与CD患者比较,UC患者588种基因中Sarp1(凋亡相关蛋白1)、fz、dvl表达增高,提示Wnt信号传导途径可能参与UC的致癌作用.Nakajima et al^[76]用高密度寡核苷酸方法对葡聚糖硫酸钠小鼠结肠炎模型进行基因表达谱研究,并用实时定量PCR方法验证,发现约12 000基因中,下调基因包括:(1)癌基因;(2)炎症递质相关基因,如干扰素- γ 等;(3)水、电解质相关基因;(4)其他.Lawrance et al^[77]应用DNA基因芯片,观察了炎症性肠病(溃疡性结肠炎和克隆氏病)炎症结肠组织基因表达谱.结果除了显示一些以前确定和IBD相关基因及一些预期上调的细胞因子、趋化因子基因的表达改变,免疫功能相关基因,如IGHG3、IGLL2与CD74,炎症相关基因HNL、NGAL,增生相关的GRO基因等各种基因在UC中过度表达.已被确定的癌相关基因如DD96,DRAL和MXI1仅在UC中有不同程度表达.在UC和CD中均过度表达的有REG基因家族和钙结合蛋白S100基因S100A9与S100P.自然的抗微生物防御素DEFA5和DEFA6基因仅特异性地在CD中过度表达.

5 其他

溃疡性结肠炎的发病涉及多种因素,除了遗传、癌变、凋亡、细胞因子等相关基因外,还有许多其他基因的改变与之相关.在炎症结肠中电解质和盐转运的吸收与分泌会发生紊乱,Lohi et al^[78]比较正常和炎症结肠黏膜三种肠盐运输的主要递质性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)(Cl⁻ channel),SLC26A3(Cl⁻/HCO exchanger)和SLC9A3(Na⁺/H⁺ exchanger) mRNA及其蛋白的表达.将结肠组织标本依据组织学炎症程度分为3组.结果发现CFTR mRNA在轻、中、重度炎症结肠组织中均表达增高,以中度炎症结肠黏膜中最为显著,CFTR蛋白在正常和炎症组织中均有表达.而尽管SLC26A3 mRNA在重度的UC肠组织中表达减少,但SLC26A3蛋白表达在各组中无差异.SLC9A3 mRNA在

中度和重度炎症组表达显著改变. 提示肠道炎症影响了这三种主要肠盐运输递质的表达, 提高了Cl⁻的跨皮分泌和限制了上皮对NaCl的吸收, 从而导致UC患者腹泻的发生.

Renzi et al^[79]应用原位杂交方法观察在正常和炎症肠组织中P物质受体(NK-1R)和神经激肽A受体(NK-2R)表达. 发现在CD和UC患者中NK-1R和NK-2R基因表达均上调. Goode et al^[80]应用RT-PCR检测正常组织和UC、CD患者结肠组织神经激肽-1受体(NK-1R)mRNA表达. 在IBD肠黏膜活检组织NK-1R mRNA表达量显著上调, 明显高于非炎症肠黏膜组织. von Lampe et al^[81]观察到UC患者活检组织基质金属蛋白酶(MMPs)和他们的组织抑制因子TIMPs的基因与蛋白表达. 结果MMP-2、MMP-14和TIMP-1 mRNA在炎症组织中显著增加, 炎症性肠病溃疡结肠黏膜中增加9-12倍. 但TIMP-2 mRNA表达未见改变. MMP-1和MMP-3 mRNA表达与组织急性炎症程度密切相关, 与UC患者正常结肠组织标本相比MMP-1、MMP-3 mRNA表达增加15倍. MMP-1、MMP-3 mRNA等的过度表达提示在IBD结肠组织改变和损伤过程中该类酶起着重要作用. 还有研究显示炎症性肠病患者肠上皮细胞巨噬细胞炎症蛋白-3 α (MIP-3 α)mRNA及其蛋白表达增高^[82].

此外, Gassler et al^[83]采用不同方法分析CD和UC患者活动期、非活动期炎症肠黏膜组织及非炎症组织结合分子变化情况, 发现在活动性IBD组织中结合蛋白及其mRNA显著下调, 非活动性炎症组织中只有上皮细胞钙粘蛋白等少数结合分子有此趋向, 非炎症组织中的结合分子表达与正常对照组无明显差异, 显示结合分子的表达下调与炎症过程密切相关. Wang et al^[84]通过对大鼠三硝基苯磺酸(TNBS)灌肠后HO活性和HO-1基因表达的研究, 发现血红素氧合酶在TNBS诱导的大鼠肠道炎症过程中起保护作用. Masuda et al^[85]发现UC结肠巨噬细胞金属蛋白酶和骨桥蛋白mRNA与对照组相比表达增高, 与UC溃疡的形成相关.

总之, 随着人类对基因研究的深入, 促进了对各种疾病的认识和治疗效果的提高. 溃疡性结肠炎作为一种复杂的难治性疾病, 其发病似乎涉及免疫系统、环境、以及尚未确定的慢性肠道炎症易感基因之间的相互作用. 但在基因表达调控、机体免疫及细胞分化等重要生命活动中都并非每个基因单独发挥作用, 众多基因是作为一个统一的整体对机体进行调节, 发挥作用的. 近几年有关溃疡性结肠炎相关基因的研究即显示其涉及到免疫相关基因、凋亡相关基因、癌相关基因、遗传基因等诸多基因, 基因芯片的应用给溃疡性结肠炎的研究提供了新的有效方法, 但迄今为止尚未发现其特异性的易感基因以及针对性的治疗基因. 因此, 在溃疡性结肠炎病因和发病机制方面还有待我们继续探索与研究, 从而寻找出更加有效的治疗方法, 解决溃疡性结肠炎患者的疾苦.

6 参考文献

- Porschen R, Robin U, Schumacher A, Schauseil S, Borchard F, Hengels KJ, Strohmeyer G. DNA aneuploidy in Crohn's disease and ulcerative colitis: results of a comparative flow cytometric study. *Gut* 1992;33:663-667
- Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22:382-389
- Wirtz S, Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2000;15:144-160
- Bregenholt S. Cells and cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: new insights from mouse T cell transfer models. *Exp Clin Immunogenet* 2000;17:115-129
- Ashwood P, Harvey R, Verjee T, Wolstencroft R, Thompson RP, Powell JJ. Functional interactions between mucosal IL-1, IL-1ra and TGF-beta 1 in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2004; 53:53-59
- Wu HG, Zhou LB, Pan YY, Huang C, Chen HP, Shi Z, Hua XG. Study of the mechanisms of acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis rats in view of the gene expression of cytokines. *World J Gastroenterol* 1999;6:515-517
- Sasaki S, Hirata I, Maemura K, Hamamoto N, Murano M, Toshina K, Katsu K. Prostaglandin E2 inhibits lesion formation in dextran sodium sulphate-induced colitis in rats and reduces the levels of mucosal inflammatory cytokines. *Scand J Immunol* 2000;51:23-28
- 张晓峰, 胡鸿毅, 陈英群, 郝微微, 陆雄, 马贵同. 清肠栓对实验性溃疡性结肠炎大鼠IL-1b、IL-6mRNA表达的影响. *中国中医药科技* 2003;10:263-265
- Wang QY, Chen CL, Wang JD, Lai ZS, Ma Q, Zhang YL. Expression of pro-inflammation cytokines and activation of nuclear factor kappa b in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:1202-1205
- 朱峰, 钱家鸣, 潘国宗, 杨晓鸥. 白介素1b和8mRNA表达等指标监测溃疡性结肠炎活动的应用. *中国医学科学院学报* 1999; 21:384-389
- 甘华田, 欧阳钦, 贾道全, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者核因子- κ B活化与细胞因子基因表达. *中华内科杂志* 2002;41:252-255
- Street ME, de'Angelis G, Camacho-Hubner C, Giovannelli G, Ziveri MA, Bacchini PL, Bernasconi S, Sansebastiano G, Savage MO. Relationships between serum IGF-1, IGFBP-2, interleukin-1beta and interleukin-6 in inflammatory bowel disease. *Horm Res* 2004;61:159-164
- Vink A, Uyttenhove C, Wauters P, Van Snick J. Accessory factors involved in murine T cell activation. Distinct roles of interleukin 6, interleukin 1 and tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 1990;20:1-6
- Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992;37:818-826
- Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta J, Kuroiwa A, Ina K, Kanayama K, Ando T, Matsuura T. Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci* 1995;40:949-959
- 李琪佳, 宫恩聪, 刘叔平, 鄂文. 溃疡性结肠炎发病机制的免疫病理学及分子病理学研究. *中华消化杂志* 2000;20:324-326
- 李琪佳, 宫恩聪, 刘叔平, 鄂文. 溃疡性结肠炎黏膜的白细胞亚群和肿瘤坏死因子- α 的表达. *临床与实验病理学杂志* 2001;17: 216-218
- 王晓娣, 白如雪. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜固有层淋巴细胞表达IL-6的研究. *中日友好医院学报* 2001;15:204-207
- Nielsen OH, Rudiger N, Gaustadnes M, Horn T. Intestinal interleukin-8 concentration and gene expression in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1028-1034
- Akazawa A, Sakaida I, Higaki S, Kubo Y, Uchida K, Okita K. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease, particularly in patients with disease in the inactive phase. *J Gastroenterol* 2002;37:345-353
- Tian L, Huang YX, Tian M, Gao W, Chang Q. Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF-alpha in rats with ul-

- cerative colitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1028-1033
- 22 Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-2095
- 23 Pajkrt D, Camoglio L, Tiel-van Buul MC, de Bruin K, Cutler DL, Afrime MB, Rikken G, van der Poll T, ten Cate JW, van Deventer SJ. Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration. *J Immunol* 1997;158:3971-3977
- 24 Narula SK, Cutler D, Grint P. Immunomodulation of Crohn's disease by interleukin-10. *Agents Actions Suppl* 1998;49:57-65
- 25 Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, Witt C, Lochs H, Schreiber S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 1998;42:470-476
- 26 Schmit A, Carol M, Robert F, Bontems P, Houben JJ, Van Gossom A, Goldman M, Mascart F. Dose-effect of interleukin-10 and its immunoregulatory role in Crohn's disease. *Eur Cytokine Netw* 2002;13:298-305
- 27 Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 1995;101:428-435
- 28 Akagi S, Hiyama E, Imamura Y, Takesue Y, Matsuura Y, Yodoyama T. Interleukin-10 expression in intestine of Crohn disease. *Int J Mol Med* 2000;5:389-395
- 29 Gasche C, Bakos S, Dejaco C, Tillinger W, Zakeri S, Reinisch W. IL-10 secretion and sensitivity in normal human intestine and inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2000;20:362-370
- 30 Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, Landers C, Jewell DP. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112:1845-1853
- 31 Bulois P, Tremaine WJ, Maunoury V, Gambiez L, Hafraoui S, Leteurtre L, Cortot A, Sandborn WJ, Colombel JF, Desreumaux P. Pouchitis is associated with mucosal imbalance between interleukin-8 and interleukin-10. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:157-164
- 32 Inoue S, Matsumoto T, Iida M, Mizuno M, Kuroki F, Hoshika K, Shimizu M. Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2441-2446
- 33 Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003;11:175-179
- 34 Seegert D, Rosenstiel P, Pfahler H, Pfefferkorn P, Nikolaus S, Schreiber S. Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:326-332
- 35 王晓娣, 董恩钰. 白介素-17在溃疡性结肠炎表达的研究. *中华消化杂志* 2001;21:673-676
- 36 Nielsen OH, Kirman I, Rudiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:180-185
- 37 Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 2002;441:500-513
- 38 Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:16-26
- 39 di Mola FF, Friess H, Zhu ZW, Koliopoulos A, Bley T, Di Sebastiano P, Innocenti P, Zimmermann A, Buchler MW. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;46:670-679
- 40 Klebl FH, Olsen JE, Jain S, Doe WF. Expression of macrophage-colony stimulating factor in normal and inflammatory bowel disease intestine. *J Pathol* 2001;195:609-615
- 41 Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7-10
- 42 Bu P, Keshavarzian A, Stone DD, Liu J, Le PT, Fisher S, Qiao L. Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* 2001;10:6399-6403
- 43 Talal N. Concluding remarks: autogenes and oncogenes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:208-209
- 44 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619
- 45 Iimura M, Nakamura T, Shinozaki S, Iizuka B, Inoue Y, Suzuki S, Hayashi N. Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000;47:228-235
- 46 Coffey JC, Bennett MW, Wang JH, O'Connell J, Neary P, Shanahan F, Redmond HP, Kirwan WO. Upregulation of Fas-Fas-L (CD95/CD95L)-mediated epithelial apoptosis—a putative role in pouchitis? *J Surg Res* 2001;98:27-32
- 47 Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, Miyagawa J, Kanayama S, Shinomura Y, Ishikawa H, Ohtani T, Nezu R, Nagata S, Matsuzawa Y. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998;43:48-55
- 48 Strater J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Moller P. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;113:160-167
- 49 Yoshida T, Mikami T, Mitomi H, Okayasu I. Diverse p53 alterations in ulcerative colitis-associated low-grade dysplasia: full-length gene sequencing in microdissected single crypts. *J Pathol* 2003;199:166-175
- 50 Fujii S, Fujimori T, Chiba T. Usefulness of analysis of p53 alteration and observation of surface microstructure for diagnosis of ulcerative colitis-associated colorectal neoplasia. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22:107-115
- 51 Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 2000;66:3333-3337
- 52 Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Rubin CE, Stevens AC, Burmer GC. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;107:369-378
- 53 潘胜武, 孙安乐, 刘变英, 崔大祥, 闫小君, 栗彤, 雷宇锋, 王胜. 大肠癌相关基因表达的早期诊断意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1431-1432
- 54 李志, 权启镇, 陈桂荣, 张志坚. 溃疡性结肠炎、结直肠癌及癌旁组织 p53 基因的改变. *中华消化杂志* 1997;17:62
- 55 Heinzlmann M, Lang SM, Neynaber S, Reinshagen M, Emmrich J, Stratakis DF, Heldwein W, Wiebecke B, Loeschke K. Screening for p53 and K-ras mutations in whole-gut lavage in chronic inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1061-1066
- 56 Dudzisz-Sledz M, Mizerski G, Marzec B, Korszen-Pilecka I, Rudzki S, Wojcierowski J, Mandziuk S. Effect of tyrosinase on programmed cell death in colon adenocarcinoma cell line LS-180. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39(Suppl 2):81-83
- 57 Elliott MJ, Dong YB, Yang H, McMasters KM. E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:3590-3597
- 58 Macpherson AJ, Chester KA, Robson L, Bjarnason I, Malcolm AD, Peters TJ. Increased expression of c-myc proto-oncogene in biopsies of ulcerative colitis and Crohn's colitis. *Gut* 1992;33:651-656
- 59 Kitamura S, Kondo S, Shinomura Y, Isozaki K, Kanayama S, Higashimoto Y, Minami T, Kiyohara T, Yasunaga Y, Ishikawa H, Ohtani T, Ishiguro S, Matsuzawa Y. Expression of hepatocyte growth factor and c-met in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2000;49:320-324
- 60 Hisamatsu T, Watanabe M, Ogata H, Ezaki T, Hozawa S, Ishii H, Kanai T, Hibi T. Interferon-inducible gene family 1-

- 8U expression in colitis-associated colon cancer and severely inflamed mucosa in ulcerative colitis. *Cancer Res* 1999;59:5927-5931
- 61 董跃斌, 李春明, 刘中宏. 应用 PCR-SSP 对溃疡性结肠炎易感基因的研究. *医学研究通讯* 2000;29:37-39
- 62 殷石, 曹峰林, 杨绍忠, 付瑜, 孔炳科. 溃疡性结肠炎的红细胞免疫与 HLA 相关性研究. *武警医学* 1998;9:65-67
- 63 彭仲生, 胡品津, 郭云蔚, 陈旻湖, 崔毅, 刘思纯. 我国溃疡性结肠炎人类白细胞抗原-DR 基因分型的研究. *中华消化杂志* 2001;21:290-292
- 64 Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999;45:395-401
- 65 Futami S, Aoyama N, Honsako Y, Tamura T, Morimoto S, Nakashima T, Ohmoto A, Okano H, Miyamoto M, Inaba H. HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig Dis Sci* 1995;40:814-818
- 66 Yang H, Rotter JI, Toyoda H, Landers C, Tyran D, McElree CK, Targan SR. Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers. *J Clin Invest* 1993;92:1080-1084
- 67 彭仲生, 胡品津, 崔毅, 李初俊. 溃疡性结肠炎的白细胞介素(IL)-1b、IL-1受体拮抗剂、IL-4基因多态性. *中华内科杂志* 2002;41:248-251
- 68 Bouma G, Grusius JB, Garcia-Gonzalez MA, Meijer BU, Hellemans HP, Hakvoort RJ, Schreuder GM, Kostense PJ, Meuwissen SG, Pena AS. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis(UC). *Clin Exp Immunol* 1999;115:294-300
- 69 Carter MJ, di Giovine FS, Jones S, Mee J, Camp NJ, Lobo AJ, Duff GW. Association of the interleukin 1 receptor antagonist gene with ulcerative colitis in Northern European Caucasians. *Gut* 2001;48:461-467
- 70 夏冰, 张贵水, 丁国平, 周燕, 邓长生. 淋巴毒素 aAspH1 基因型和白介素-1受体拮抗剂基因型与溃疡性结肠炎遗传易感性的相关研究. *中华消化杂志* 2000;20:350-352
- 71 夏冰, Crusius JBA, 张贵水, 郭海建, 邓长生, Meuwissen SGW, Pena AS. 炎症性肠病患者淋巴毒素 α 、白介素1受体拮抗剂基因多态性与肿瘤坏死因子 α 、可溶性白介素2受体以及白介素6产量的关系. *湖北医科大学学报* 1997;18:209-213
- 72 夏冰, Crusius JBA, Pena AS. 炎症性肠病患者淋巴毒素 α 基因 AspH1 多态分布. *中华医学遗传学杂志* 1995;12:368-369
- 73 Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR, Swanson PE, Harrington CA. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* 2000;4:1-11
- 74 Dieckgraefe BK, Crimmins DL, Landt V, Houchen C, Anant S, Porche-Sorbet R, Ladenson JH. Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg alpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. *J Invest Med* 2002;50:421-434
- 75 Uthoff SM, Eichenberger MR, Lewis RK, Fox MP, Hamilton CJ, McAuliffe TL, Grimes HL, Galandiuk S. Identification of candidate genes in ulcerative colitis and Crohn's disease using cDNA array technology. *Int J Oncol* 2001;19:803-810
- 76 Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann L, Osawa E, Nagase H, Ueno N, Matsuhashi N, Aburatani H. Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice. *J Gastroenterol* 2002;37(Suppl 14):62-66
- 77 Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 2001;5:445-456
- 78 Lohi H, Makela S, Pulkkinen K, Hoglund P, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J. Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G567-575
- 79 Renzi D, Pellegrini B, Tonelli F, Surrenti C, Calabro A. Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine. *Am J Pathol* 2000;157:1511-1522
- 80 Goode T, O'Connell J, Anton P, Wong H, Reeve J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localisation. *Gut* 2000;47:387-396
- 81 von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:63-73
- 82 Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51:818-826
- 83 Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermuller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G216-228
- 84 Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN, Cho CH. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G586-594
- 85 Masuda H, Takahashi Y, Asai S, Takayama T. Distinct gene expression of osteopontin in patients with ulcerative colitis. *J Surg Res* 2003;111:85-90

幽门螺杆菌感染和环氧化酶-2表达在胃癌发生中的作用

傅熙玲, 孙为豪

傅熙玲, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
孙为豪, 江苏省人民医院老年医学科 江苏省南京市 210029
教育部留学回国人员科研启动基金资助课题, No.9247342057
项目负责人: 孙为豪, 210029, 江苏省南京市, 江苏省人民医院老年医学科.
weihaosun@hotmail.com
电话: 025-83718836-6294 传真: 025-83783506
收稿日期: 2003-12-17 接受日期: 2004-01-08

摘要

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是胃癌发生的重要病因和促进因子,但其确切的致癌机制尚不清楚.近年来研究表明,环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在胃癌及癌前病变中表达增加,在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用. Hp感染可能通过多种途径诱导COX-2表达,刺激胃上皮细胞增生,使细胞增生和凋亡失衡,促进胃癌的发生和发展.

傅熙玲, 孙为豪. 幽门螺杆菌感染和环氧化酶-2表达在胃癌发生中的作用.
世界华人消化杂志 2004;12(7):1638-1640
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1638.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是胃癌发生的重要病因之一,但其确切的致癌机制尚不清楚.近年研究表明,环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在多种肿瘤尤其是消化系统肿瘤中表达增加. 体内外实验研究表明, Hp感染可通过多因素、多途径上调COX-2表达. 本文对近年来有关Hp感染及其诱导的COX-2表达在胃癌发生中作用的研究进展综述如下:

1 Hp感染与胃癌及癌前病变

流行病学资料提示长期Hp感染可导致胃黏膜的萎缩、肠上皮化生及异型增生,最终形成胃癌^[1-3]. 因此,1994年世界卫生组织国际癌症研究机构已正式将Hp列为第一类生物致癌因子. 近年来动物实验研究、胃黏膜上皮细胞培养和Hp根除干预实验等均证实了Hp感染致胃癌的危险性^[4-6]. Hp细胞毒素相关基因A(cagA)阳性菌株具有更强的毒力和危险性,cagA⁺菌株感染后胃黏膜上皮细胞损害明显并影响壁细胞的分泌功能,导致胃酸分泌减少,胃内细菌过度生长,促使硝酸盐降解为亚硝酸盐和亚硝胺等致癌物. 因此,cagA⁺ Hp感染与癌前病变和胃癌的发生密切相关^[7].

然而, Hp感染致胃癌发生的确切机制目前尚不清楚. 现已证明, Hp感染可激活炎症反应中多种细胞因子、自由基和一氧化氮(NO)的释放,这些物质均

可刺激细胞增生并有DNA损伤作用^[8-9]. Hp及其CagA蛋白可能促进细胞凋亡抑制基因Bcl-2表达,诱导抑癌基因p53突变,从而使细胞增生和凋亡失衡,最终导致胃癌的发生^[10-11]. 细胞外基质成分的降解在肿瘤细胞侵犯周围组织和远处转移中发挥重要作用,而基底膜基质的降解与基质金属蛋白酶(MMPs)和组织型金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)的活性密切相关. 最近研究表明, Hp感染可能通过改变MMPs和TIMPs的表达而参与胃癌的转移过程^[12].

2 COX-2表达与胃癌和癌前病变

2.1 COX-1和COX-2在胃黏膜中的表达 环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸合成前列腺素(PGs)过程中一个重要的限速酶,已知COX至少有2种亚型,即COX-1和COX-2. COX-1以基本构成的形式普遍存在于各种组织,促使生理性PGs的合成,以维护自身稳定功能. COX-2与COX-1有59-61%的同源性,在没有受到刺激的正常组织或细胞,COX-2表达极少甚至不能测出. 而Hp相关性胃炎的胃小凹上皮细胞、腺上皮细胞和胃溃疡组织中的巨噬细胞、成纤维细胞以及胃癌的肿瘤细胞内均可见COX-2表达^[13-14]. 但也有研究认为在正常胃黏膜中有COX-2表达, Hp感染性胃炎中COX-1和COX-2表达均增加^[15].

2.2 COX-2在胃癌和癌前病变中表达增加 COX-2与细胞增生和肿瘤发生密切相关,正常情况下COX-2几乎不表达或表达甚少,而在炎症因子、生长因子、内毒素和促癌剂等刺激下,COX-2表达迅速增加,并参与炎症过程和肿瘤的发生、发展^[16]. 众多研究显示,COX-2在胃癌和结直肠癌中表达增加^[17-18]. Son et al^[19]应用RT-PCR检测32例根治性胃癌手术标本中COX-2 mRNA表达,结果显示癌组织中COX-2 mRNA显著高于癌周正常组织. 汪步海et al^[20]对内镜诊断并手术证实的36例Hp阳性胃癌患者的癌组织及其邻近组织标本中COX-2的表达状况进行了回顾性分析,免疫组化染色显示,COX-2蛋白弥漫性表达于近腺体的黏膜上皮细胞,而黏膜下固有层无表达. COX-2蛋白在胃癌早期阶段(癌前病变)即开始表达,在癌症发展的整个过程中均呈高表达状态,肠上皮化生、异型增生和胃癌中COX-2蛋白表达强度无显著性差异. 但也有研究认为,随着癌前病变的进展COX-2蛋白表达递增^[21]. COX-2蛋白在肠型胃癌的表达显著高于弥漫型胃癌^[20,22-23],表明COX-2蛋白的表达与胃癌的组织来源有关. Han et al^[24]

应用 RT-PCR 和免疫组化方法检查 50 例胃癌组织标本, COX-2 高表达者占 76%, 肿瘤直径大于 5 cm、伴 6 个以上淋巴结转移和非印戒细胞癌中 COX-2 高表达更为显著. COX-2 表达与胃癌分期、浸润深度及预后有关^[25]. 但也有研究认为, 尽管 COX-2 在胃癌的发生和发展中起重要作用, 但与胃癌分期及预后并无相关性^[23].

2.3 COX-2 的致癌和促癌机制 尽管 COX-2 与胃癌的发生发展密切相关, 但 COX-2 表达在肿瘤发生、发展中的作用机制尚不明确. COX-2 可能经多种途径促进细胞增生、抑制细胞凋亡、调节肿瘤新生血管形成和增加癌细胞的侵袭性等而发生致癌和促癌作用. 吴汉平 et al^[26]应用反义核酸技术, 将 COX-2 编码 cDNA 序列反向插入真核表达载体并转入 COX-2 高表达的胃癌细胞, 使之在胞内稳定、持续地转录 COX-2 基因的互补 RNA 链以封闭靶基因, 从而制备了 COX-2 基因表达持续下调的细胞模型. 结果显示胃癌细胞中高表达的 COX-2 受抑制后, 癌细胞在体内外增生均减慢, 表明 COX-2 高表达与肿瘤细胞增生等恶性表型密切相关. 动物实验发现, COX-2 表达增加 PGE₂ 合成, PGE₂ 可诱导细胞增生并刺激 Bcl-2 蛋白表达, 后者可抑制细胞凋亡, 使细胞增生和凋亡失去平衡而促进肿瘤发生^[27-28]. 免疫组化检查胃癌患者 COX-2 和血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达, 以微血管密度(MVD)作为肿瘤血管生成的指标. 结果显示 COX-2 和 VEGF 表达呈显著相关性, 二者均为阳性时平均 MVD 水平显著高于阴性组^[29]. 血管生成与胃癌关系的实验研究结果显示, 血管生成在胃癌发生的早期即已启动, 与胃癌发生、发展密切相关^[30]. 因此, COX-2 促进 VEGF 相关的肿瘤血管生成, 可能是其在致癌和促癌中发挥作用的另一重要途径.

3 Hp 感染与 COX-2 表达

3.1 Hp 感染诱导 COX-2 的表达 Hp 感染和 COX-2 表达在胃癌的发生、发展中均起重要作用, Hp 作为促癌因子诱导 COX-2 表达, Hp 感染者胃黏膜中 COX-2 表达明显增加. McCarthy et al^[31]用免疫组化检查结果表明, Hp 感染相关的急、慢性胃炎的胃上皮细胞和单核细胞中 COX-2 蛋白表达增加. 虽然根除 Hp 减少胃黏膜 COX-2 表达, 但不能逆转肠上皮化生. 陆红 et al^[32]报道, 胃黏膜 COX-2 表达与慢性炎症细胞的浸润程度密切相关, 根除 Hp 后胃上皮细胞 COX-2 表达减弱. Kimura et al^[33]研究表明, 根除 Hp 后胃黏膜上皮细胞 COX-2 表达显著减少, 但根除 Hp 对肠上皮化生的胃黏膜 COX-2 表达无明显影响. 动物实验表明, C57BL/6 小鼠感染 Hp 24 h 后 COX-2 mRNA 及其蛋白、PGE₂ 水平和胃小凹厚度均显著高于对照组, 而 COX-2 抑制剂 etodolac 则有效地阻断了 Hp 诱导的 PGE₂ 合成及胃小凹增厚^[34]. Romano et al^[35]将 MKN28 胃黏膜细胞株分别与 Hp 及大肠杆菌孵育培养, 24 h 后发现 Hp 组 COX-2

mRNA 水平增加 5 倍, COX-2 催化合成的 PGE₂ 增加 3 倍, 而 COX-1 表达无变化. 大肠杆菌组 COX-1、COX-2 表达和 PGE₂ 水平均无明显改变, 结果表明 Hp 在体外能够特异性诱导胃黏膜细胞表达 COX-2. Guo et al^[36]研究了 31 例胃癌手术标本, 用免疫荧光染色和 PCR 等方法证实, cagA⁺ 株 Hp 感染的胃癌组 COX-2 表达水平显著高于 cagA⁻ 株感染的胃癌组, 而 5 例 COX-2 无明显表达的胃癌组织中均未扩增到 cagA 基因产物, 提示 cagA⁺ Hp 菌株感染引起的 COX-2 表达上调在胃癌的发生中可能起重要作用. Chen et al^[37]分析 71 例胃腺癌手术标本, 经单变量及多变量分析发现 COX-2 表达阳性组与 Hp 感染和血管侵入密切相关, COX-2 表达阳性组的胃癌预后显著差于 COX-2 表达阴性组. 另外, 干预实验显示 Hp 根除后, 萎缩性胃炎胃黏膜中 COX-2 基因表达明显下调^[38].

3.2 Hp 感染诱导 COX-2 表达的机制 目前, Hp 感染诱导胃黏膜 COX-2 表达的机制尚待阐明, 可能是 Hp 感染引起胃黏膜损伤刺激 COX-2 表达, 也可能是 Hp 感染及其毒素直接诱导 COX-2 表达^[36]. 国内外研究表明, Hp 细菌悬液、超声提取物甚至 Hp 细菌培养液均可诱导培养细胞的 COX-2 表达. Hp 感染可能通过炎症细胞释放细胞因子的间接作用, 亦可能是直接诱导胃黏膜炎症细胞表达 COX-2, 再通过旁分泌机制和信号传导引起上皮细胞表达 COX-2^[31]. Takahashi et al^[39]用 Hp 感染蒙古沙鼠, Western blot 检查结果显示在正常的或 Hp 感染 2 wk 后的胃黏膜中无 COX-2 蛋白表达. 然而, Hp 感染 4 wk 以后, 胃黏膜中 COX-2 蛋白表达及 PGE₂ 水平均明显增加. 虽然该实验未能说明 Hp 及其毒素能否直接诱导 COX-2 表达, 但结果至少提示 Hp 感染引起的炎症反应可能与 COX-2 表达密切相关. Hp 感染后炎症细胞释放多种细胞因子, 如白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)以及氧自由基等, 均为 COX-2 表达的诱导剂^[40]. 这些因子通过多细胞传导途径及细胞核因子 κ B(NF- κ B)诱导 COX-2 表达, 而 NF- κ B 是胃黏膜上皮细胞受 Hp 刺激而转录基因的主要递质^[41].

近来研究表明, Hp 感染常伴有高胃泌素血症, 胃泌素在 Hp 感染相关的 COX-2 过度表达中可能起一定作用. Konturek et al^[42]用胃癌细胞株 KATO- 在浓度渐增的胃泌素中孵育, 结果显示 COX-2 和促肝细胞生长因子(HGF)的 mRNA 及蛋白均呈现剂量依赖性增加, 提示胃泌素可能直接刺激 COX-2 的表达. Jones et al^[43]报道, HGF 诱导大鼠胃上皮细胞(RGM1)COX-2 表达增加. 因此, Hp 感染也可能通过刺激胃泌素分泌, 经过直接的或间接的作用上调 COX-2 表达.

总之, Hp 感染通过 COX-2 途径诱导胃上皮细胞增生, COX-2 表达可能参与了 Hp 相关性胃炎向癌前病变及胃癌的演变过程. 因此, 根除 Hp 和特异性 COX-2 抑制剂的使用可能成为预防胃癌的有效手段.

4 参考文献

- 1 Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995;19(Suppl 1):S37-S43
- 2 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 3 Eid R, Moss SF. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2002;346:65-67
- 4 郑青, 陈晓宇, 施尧, 萧树东. 幽门螺杆菌长期感染蒙古沙土鼠建立胃癌模型的研究. *中华消化杂志* 2003;23:92-96
- 5 何兴祥, 胡品津, Wong BCY, Lam SK, Xia HHX. 幽门螺杆菌慢性感染诱导胃上皮细胞产生凋亡耐受. *中华医学杂志* 2003;83:42-45
- 6 Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y, Yokoyama T, Watanabe M. Improvement in atrophic gastritis and intestinal metaplasia in patients in whom *Helicobacter pylori* was eradicated. *Ann Intern Med* 2001;134:380-386
- 7 Farinati F, Cardin R, Russo VM, Busatto G, Franco M, Rugge M. *Helicobacter pylori* CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? *Helicobacter* 2003;8:227-234
- 8 宋春芳, 孙丽萍, 戴文颖, 袁媛. 幽门螺杆菌相关性胃疾病血清 IL-8 和 NO 含量的检测及意义. *中华肿瘤杂志* 2003;25:258-260
- 9 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
- 10 杜雅菊, 赵晶, 赵瑞波, 李宝杰. 幽门螺杆菌 CagA 蛋白与胃癌组织中 Bcl-2、p53 蛋白表达的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:554-557
- 11 陈孝, 王孟薇, 尤纬蒂. 胃黏膜上皮异型增生细胞增殖活性及凋亡与幽门螺杆菌感染的关系. *癌症* 2003;22:244-247
- 12 李新华, 张桂英, 罗非君, 徐美华, 李乾. 胃癌细胞系幽门螺杆菌感染对金属蛋白酶表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:544-546
- 13 Tatsuguchi A, Sakamoto C, Wada K, Akamatsu T, Tsukui T, Miyake K, Futagami S, Kishida T, Fukuda Y, Yamanaka N, Kobayashi M. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. *Gut* 2000;46:782-789
- 14 Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK, Chan FK. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000;157:729-735
- 15 Jackson LM, Wu KC, Mahida YR, Jenkins D, Hawkey CJ. Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. *Gut* 2000;47:762-770
- 16 Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996;270(3 Pt 1):G393-G400
- 17 van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drillenburger P, Offerhaus GJ. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol* 2002;196:171-179
- 18 Konturek PC, Bielanski W, Konturek SJ, Hartwich A, Pierzchalski P, Gonciarz M, Marlicz K, Starzynska T, Zuchowicz M, Darasz Z, Gotze JP, Rehfeld JF, Hahn EG. Progastrin and cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2002;47:1984-1991
- 19 Son HJ, Kim YH, Park DI, Kim JJ, Rhee PL, Paik SW, Choi KW, Song SY, Rhee JC. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:383-388
- 20 汪步海, 汪竹, 童建东, 钱伟, 侯晓华. 环氧合酶-2 蛋白在胃癌患者肠上皮化生、异型增生及癌灶中的表达. *中华消化内镜杂志* 2003;20:179-181
- 21 王小虎, 彭铁立, 李胜保, 吴清明. 幽门螺杆菌与胃癌及癌前病变的环氧合酶-2 及 p21 表达的研究. *实用肿瘤杂志* 2001;16:182-184
- 22 Yamagata R, Shimoyama T, Fukuda S, Yoshimura T, Tanaka M, Munakata A. Cyclooxygenase-2 expression is increased in early intestinal-type gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:359-363
- 23 Joo YE, Oh WT, Rew JS, Park CS, Choi SK, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 expression is associated with well-differentiated and intestinal-type pathways in gastric carcinogenesis. *Digestion* 2002;66:222-229
- 24 Han SL, Tang HJ, Hua YW, Ji SQ, Lin DX. Expression of COX-2 in stomach cancers and its relation to their biological features. *Dig Surg* 2003;20:107-114
- 25 姬社青, 花亚伟, 庄兢, 高阳, 孔烨, 韩少良, 邵永孚. COX-2、p53、PCNA 和 nm23 异常表达与胃癌生物学行为的关系. *癌症* 2002;21:619-624
- 26 吴汉平, 吴开春, 么立萍, 徐美虹, 樊代明. 环氧合酶-2 反义核酸抑制胃癌细胞的恶性表型. *中华内科杂志* 2002;41:534-537
- 27 Fosslie E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:3-21
- 28 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2000;45:2436-2443
- 29 Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:28-33
- 30 陶厚权, 邹寿椿, 王瑞年, 林言箴. 血管生成与胃癌发生之间关系的实验研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:43-46
- 31 McCarthy CJ, Crofford LJ, Greenson J, Scheiman JM. Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1218-1223
- 32 陆红, 陈晓宇, 刘文忠, 彭延申, 萧树东. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜环氧合酶-2 表达的影响. *中华消化杂志* 2001;21:287-289
- 33 Kimura A, Tsuji S, Tsujii M, Sawaoka H, Iijima H, Kawai N, Yasumaru M, Kakiuchi Y, Okuda Y, Ali Z, Nishimura Y, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Expression of cyclooxygenase-2 and nitrotyrosine in human gastric mucosa before and after *Helicobacter pylori* eradication. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63:315-322
- 34 Xiao F, Furuta T, Takashima M, Shirai N, Hanai H. Involvement of cyclooxygenase-2 in hyperplastic gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:875-886
- 35 Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, Acquaviva AM, Del Vecchio Blanco C, Bruni CB, Zarrilli R. *Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells *in vitro*. *J Biol Chem* 1998;273:28560-28563
- 36 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- 37 Chen CN, Sung CT, Lin MT, Lee PH, Chang KJ. Clinicopathologic association of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 expression in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001;233:183-188
- 38 Konturek PC, Rembiesz K, Konturek SJ, Stachura J, Bielanski W, Galuschka K, Karcz D, Hahn EG. Gene expression of ornithine decarboxylase, cyclooxygenase-2, and gastrin in atrophic gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori* before and after eradication therapy. *Dig Dis Sci* 2003;48:36-46
- 39 Takahashi S, Fujita T, Yamamoto A. Role of cyclooxygenase-2 in *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G791-G798
- 40 Kim H, Lim JW, Seo JY, Kim KH. Oxidant-sensitive transcription factor and cyclooxygenase-2 by *Helicobacter pylori* stimulation in human gastric cancer cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21:121-129
- 41 Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995;95:1669-1675
- 42 Konturek PC, Kania J, Kukharsky V, Ocker S, Hahn EG, Konturek SJ. Influence of gastrin on the expression of cyclooxygenase-2, hepatocyte growth factor and apoptosis-related proteins in gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:17-32
- 43 Jones MK, Sasaki E, Halter F, Pai R, Nakamura T, Arakawa T, Kuroki T, Tarnawski AS. HGF triggers activation of the COX-2 gene in rat gastric epithelial cells: action mediated through the ERK2 signaling pathway. *FASEB J* 1999;13:2186-2194

Sp1/Krüppel 样转录因子家族研究进展

张安平, 张连阳

张安平, 张连阳, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042
项目负责人: 张安平, 400042, 重庆市大坪长江支路 10 号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科. anping_zhang@163.com
电话: 023-68757248
收稿日期: 2004-04-10 接受日期: 2004-04-15

摘要

Sp1/Krüppel 样转录因子(Sp1-like and Krüppel-like transcription factors, Sp1/KLFs)是参与真核细胞转录的高度相关锌指蛋白,以细胞和启动子特异性方式通过调控富含 GC 启动子的基因表达,参与调节细胞功能如细胞增生、凋亡、分化和肿瘤形成。

张安平, 张连阳. Sp1/Krüppel 样转录因子家族研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1641-1645

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1641.asp>

0 引言

启动基因转录是非常复杂的过程,与 Sp1/Krüppel 样转录因子家族相关的序列特异性 DNA 连接蛋白在调控基因转录中发挥作用. 在 Sp1/Krüppel 样转录因子家族中 Sp1 首先被克隆和纯化,在 SV40 启动子中 Sp1 通过 3 个 Cys2His2 锌指与富含 GC 的位点特异性结合. 在果蝇属胚胎调节因子 Krüppel 中也存在类似的 DNA 结合区,随后具有与 Sp1 高度相似锌指结构的其他转录因子相继发现,形成一个新的 Sp1/Krüppel 样转录因子(KLFs)家族^[1-7]. 他们存在于从线虫属到人类的种属中,参与基因转录复制^[8-10]. 在人类存在 21 个 Sp1/KLFs 基因,大

鼠中有 17 个 Sp1/KLFs 蛋白与人同源,而小鼠则有 11 个同源(表 1). 目前对于人类和其他物种的 Sp1/KLFs 蛋白的功能和结构尚无系统比较,Sp1/KLFs 家族与各种富含 GC 的 DNA 元件结合而调节转录、细胞生长和控制生物形态发育,除了 KLF2 (LKLF)和 KLF1 (EKLF)外,编码 Sp1 样蛋白的基因是随意分布在整个基因组中,其产物功能独立,这与其他重要的进化调节因子如 Hox 转录因子、KRAB 因子截然不同^[11-13]. 根据序列和结构相似性将 Sp1/KLFs 家族分为三个亚家族(图 1A). 与 Sp1 高度相关的命名为 Sp1-6 形成亚家族 I,其他的组成另外两个亚家族 II 和 III,依次命名为 KLF1-16.

1 Sp1/Krüppel 样转录因子家族结构和功能特征

作为具有功能的位点特异性转录因子至少有 DNA 结合区、核定位信号和转录调控区. Sp1/KLFs 家族蛋白的主要特征是含有高度保守的 DNA 结合区(同源性超过 65%),在羧基端存在 3 个 Cys2His2 锌指(图 1B),锌指可能参与蛋白之间的相互作用^[14]. Sp1/KLFs 蛋白家族的氨基端变化较大,含有转录激活区或转录抑制区,在锌指内或与其相邻区存在核定位序列^[15-16].

1.1 Sp1/KLFs 锌指区 与 Sp1/KLFs 家族成员 C 末端区相邻的是具有 81 个氨基酸的 DNA 结合区,由 3 个锌指组成,锌指均含有 Cys2His2 的共同序列 C-X2-5-C-X3-(F/Y)-X5- -X2-H-X3-5-H (X 代表任何氨基酸,是疏水残基)^[17]. Sp1 与该家族的其他成员的氨基酸相似性至少在 66.7% (图 1B). 在前两个锌指中各含有 23 个氨基酸而第 3 个锌指则含有 21 个氨基酸. 锌指之间有 7

A

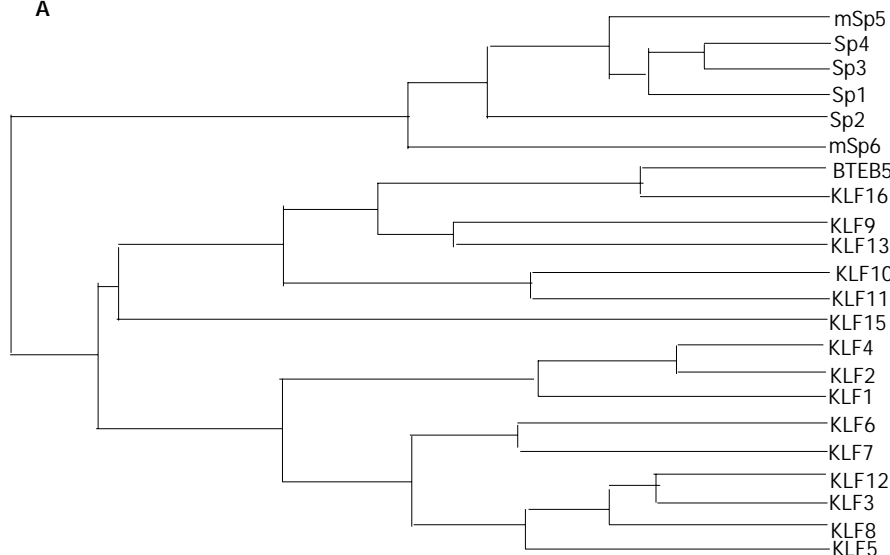


表 1 Sp1 /KLFs 蛋白家族

蛋白	KLF 成员	种类	染色体 定位	转录活性 (功能区域)	表达方式	相互作用的共激活子 和/或共抑制因子	细胞功能
Sp1	-	人、小鼠、 大鼠、果蝇属	12q13	激活因子(富含 Q 区)	普遍表达	CRSP,p300/CBP, TAFII130	胚胎发育
Sp2	-		17q21	未知(富含 Q 区)		未知	未知
Sp3	-		2q31	激活因子或抑制因子(富 含 Q 区)	普遍表达	未知	未知
Sp4	-	人、小鼠、 大鼠	7p15	激活因子(富含 Q 区)	脑	未知	出生后存活、 雄性生殖
mSp5	-	小鼠	未知	未知	普遍表达	未知	未知
Sp6	KLF14	人、小鼠	17q21	激活因子	普遍表达	未知	未知
EKLF	KLF1	人、小鼠	19p13	激活因子(酸性区)	红细胞、 肥大细胞	p300/CB、PCAF、 SWI/SNF、mSin3A	红细胞形成
LKLF KLF2	LLF2	人、小鼠	19p13	激活因子(酸性区)	肺、血管、 淋巴细胞	未知	血管和肺的发育、 T 细胞存活
BKLF	KLF3	人、小鼠、 大鼠	4p14	激活因子/抑制因 子(PVALS/T 基序)	形成红细胞的 组织、脑组织	CtBP2	未知
GKLF	KLF4	人、小鼠、 大鼠、斑马鱼	9q31	激活因子和/或抑制因子 (酸性区)	消化道	p300/CBP	抑制增生、存活
IKLF	KLF5	人、小鼠、 大鼠	13q21	激活因子	消化道、 上皮组织	未知	细胞生长
CPBP	KLF6	人、小鼠	10p15	激活因子	谱表表达	未知	肿瘤因子
UKLF	KLF7	人、小鼠	2q32	激活因子(酸性区)	普遍表达	未知	细胞周期停滞
BKLF3	KLF8	人	Xp11	抑制因子	普遍表达	CtBP2	未知
BTEB1	KLF9	人、小鼠、	9q13	激活因子/抑制因子(SID)	普遍表达		神经轴突生长
TIEG1	KLF10	人	8q22	抑制因子	普遍表达	mSin3A	凋亡、抑制增生
TIEG2/ FKLF	KLF11	人	2p25	激活因子和/或抑制因子 (SID,R2, R3)	普遍表达	mSin3A	抑制增生
AP-2rep	KLF12		13q21	抑制因子	脑、肾、肝、肺	CtBP1	未知
BTEB3/RFLA T-1/FKLF-2	KLF13	人、小鼠、 大鼠	15q12	激活因子/抑制因子 (SID, R2, R3)	普遍表达	mSin3、PCAF、 p300/CBP	抑制增生.
KKLF	KLF15	人、小鼠、 大鼠	3q13	抑制因子	普遍表达	未知	未知
BTEB4 mDRRF	KLF16	人、小鼠	19q13	抑制因子(SID)	普遍表达	mSin3A	致癌物的 新陈代谢
BTEB5	-	人	7	未知	未知	未知	未知

2 Sp1/Krüppel 样转录因子参与转录调节的机制

Sp1/Krüppel 样转录因子家族成员与共抑制/激活因子相互作用参与转录调节, 研究表明组蛋白乙酰化和去乙酰化可能是 Sp1/KLFs 蛋白是激活/抑制因子的功能转换开关. 组蛋白去乙酰化酶特异性抑制因子 HDAC1 的过度表达通过 TSA 可明显抑制 KLF4 启动子的转录活性^[37]. 在大肠癌细胞系中 KLF4 的 5' 不翻译区的超甲基化可能是 KLF4 作为肿瘤抑制因子的原因之一^[38], KLF4 也可通过抑制组氨酸脱乙酰化酶的启动子发挥抑制因子的功能^[39]. KLF13 可激活如 SV40, 趋化因子 RANTES, β -球蛋白的启动子^[22,40-41], 却抑制细胞色素 P450 CYP1A1^[34], 这表明 KLF13 部分反式调节活性是启动子依赖性. Song et al^[16] 研究表明 CREB 结合蛋白 (CBP) 共激活因子和他的同源物 p300, CBP/p300 相关因子 (PCAF) 结合, KLF13 锌指区乙酰化, 可使 KLF13 DNA 结合活性活化, 尽管在 KLF13 氨基区没有相关的激活因子存在, 但该区域仍可能具有激活区的功能. 最近发现的三个独特抑制区 SID, R2 和 R3^[20], 均存在于 KLF13 的氨基区, 可与 mSin3A 组氨酸脱乙酰化共抑制因子复合物相互作用, 使 KLF13 抑制 CYP1A1 的表达. 而 KLF13 的 SID 残基与具有激活功能的氨基区重叠, 则 KLF13 以激活因子存在^[16]. 运用转基因技术可确定与 Sp1/KLFs 氨基区相互作用的新结构^[42].

总之, 近年对 Sp1/Krüppel 样转录因子的研究已取得很大进展, 但是他们的精确结构、生化功能, 以及氨基区的转录调节功能是目前研究的热点. 而整个家族成员形成一个功能网络相互重叠, 因此该家族成员在转录调节中相互关系, 以及在人类疾病如肿瘤发生中的作用尚待进一步研究.

3 参考文献

- Turner J, Crossley M. Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* 1999;24:236-240
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and Krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 2001;188:143-160
- Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:1103-1121
- Bieker JJ. Krüppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 2001;276:34355-34358
- Cook T, Gebelein B, Urrutia R. Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors. *Ann NY Acad Sci* 1999;880:94-102
- Philipsen S, Suske G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2991-3000
- Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 1999;238:291-300
- Ossipova O, Stick R, Pieler T. XSPR-1 and XSPR-2, novel Sp1 related zinc finger containing genes, are dynamically expressed during *Xenopus* embryogenesis. *Mech Dev* 2002;115:117-122
- Schock F, Purnell BA, Wimmer EA, Jackle H. Common and diverged functions of the *Drosophila* gene pair *D-Sp1* and *buttonhead*. *Mech Dev* 1999;89:125-132
- Oates AC, Pratt SJ, Vail B, Yan YL, Ho RK, Johnson SL, Postlethwait JH, Zon LI. The zebrafish *klf* gene family. *Blood* 2001;98:1792-1801
- Patel NH, Prince VE. Beyond the Hox complex. *Genome Biol* 2000;1:1027
- Ferrier DE, Holland PW. Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nat Rev Genet* 2001;2:33-38
- Eichler EE, Hoffman SM, Adamson AA, Gordon LA, McCreedy P, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW. Complex β -satellite repeat structures and the expansion of the zinc finger gene cluster in 19p12. *Genome Res* 1998;8:791-808
- Zhang W, Kadam S, Emerson BM, Bieker JJ. Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Krüppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. *Mol Cell Biol* 2001;21:2413-2422
- Shields JM, Yang VW. Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Krüppel-like factor define a subfamily of closely related Krüppel proteins. *J Biol Chem* 1997;272:18504-18507
- Song A, Patel A, Thamtrakoln K, Liu C, Feng D, Clayberger C, Krensky AM. Functional domains and DNA-binding sequences of RFLAT-1/KLF13, a Krüppel-like transcription factor of activated T lymphocytes. *J Biol Chem* 2002;277:30055-30065
- Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000;29:183-212
- Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 1999;397:446-450
- Cook T, Gebelein B, Belal M, Mesa K, Urrutia R. Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins. *J Biol Chem* 1999;274:29500-29504
- Zhang JS, Moncrieffe MC, Kaczynski J, Ellenrieder V, Prendergast FG, Urrutia R. A conserved α -helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A. *Mol Cell Biol* 2001;21:5041-5049
- Asano H, Li SX, Stamatoyannopoulos G. FKLF, a novel Krüppel-like factor that activates human embryonic and fetal β -globin genes. *Mol Cell Biol* 1999;19:3571-3579
- Asano H, Li XS, Stamatoyannopoulos G. FKLF-2: a novel Krüppel-like transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes. *Blood* 2000;95:3578-3584
- Imataka H, Sogawa K, Yasumoto K, Kikuchi Y, Sasano K, Kobayashi A, Hayami M, Fujii-Kuriyama Y. Two regulatory proteins that bind to the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P-4501A1 gene. *EMBO J* 1992;11:3663-3671
- Kobayashi A, Sogawa K, Imataka H, Fujii-Kuriyama Y. Analysis of functional domains of a GC box-binding protein, BTEB. *J Biochem (Tokyo)* 1995;117:91-95
- Majello B, De Luca P, Lania L. Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J Biol Chem* 1997;272:4021-4026
- Gill G, Pascal E, Tseng ZH, Tjian R. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:192-196
- van Vliet J, Turner J, Crossley M. Human Krüppel-like factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1955-1962
- Ellenrieder V, Zhang JS, Kaczynski J, Urrutia R. Signaling disrupts mSin3A binding to the Mad1-like Sin3-interacting domain of TIEG2, an Sp1-like repressor. *EMBO J* 2002;21:2451-2460
- Kuo CT, Veselits ML, Leiden JM. LKLF. A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science* 1997;277:1986-1990
- Nakamura T, Unda F, de-Vega S, Vilaxa A, Fukumoto S, Yamada KM, Yamada Y. The Krüppel-like factor epiprofin is expressed by epithelium of developingteeth, hair follicles, and limb buds and promotes cell proliferation. *J Biol Chem* 2004;

- 279:626-634
- 31 Kumar AP, Butler AP. Enhanced Sp1 DNA-binding activity in murine keratinocyte cell lines and epidermal tumors. *Cancer Lett* 1999;137:159-165
- 32 Vax VV, Gueorguiev M, Dedov II, Grossman AB, Korbonits M. The Krüppel-like transcription factor 6 gene in sporadic pituitary tumours. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:397-402
- 33 Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, Lin CY, Engler JA, Grizzle WE, Ruppert JM. Increase of GSK3 messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:6488-6495
- 34 Foster KW, Ren S, Louro ID, Lobo-Ruppert SM, McKie-Bell P, Grizzle W, Hayes MR, Broker TR, Chow LT, Ruppert JM. Oncogene expression cloning by retroviral transduction of adenovirus E1A-immortalized rat kidney RK3E cells: transformation of a host with epithelial features by c-MYC and the zinc finger protein GSK3. *Cell Growth Differ* 1999;10:423-434
- 35 Adam PJ, Regan CP, Hautmann MB, Owens GK. Positive- and negative acting Krüppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. *J Biol Chem* 2000;275:37798-37806
- 36 Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, Glucksman MJ, Narla J, Eng FJ, Chan AM, Ferrari AC, Martignetti JA, Friedman SL. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 2001;294:2563-2566
- 37 Chen ZY, Rex S, Tseng CC. Krüppel-like factor 4 is transactivated by butyrate in colon cancer cells. *J Nutr* 2004;134:792-798
- 38 Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbitt BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 2004;23:395-402
- 39 Ai W, Liu Y, Langlois M, Wang TC. Krüppel-like factor 4 (KLF4) represses histidine decarboxylase gene expression through an upstream Sp1 site and downstream gastrin responsive elements. *J Biol Chem* 2004;279:8684-8693
- 40 Song AF, Chen YF, Thamtrakoln K, Storm TA, Krensky AM. RFLAT-1 a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. *Immunity* 1999;10:93-103
- 41 Martin K, Cooper W, Metcalfe J, Kemp P. Mouse BTEB3, a new member of the basic transcription element binding protein (BTEB) family, activates expression from GC-rich minimal promoter regions. *Biochem J* 2000;345(Pt 3):529-533
- 42 Li JZ, Chen X, Yang H, Wang SL, Gong XL, Feng H, Guo BY, Yu L, Wang ZG, Fu JL. Establishment of transgenic mice carrying gene encoding human zinc finger protein 191. *World J Gastroenterol* 2004;10:264-267

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

• 消息 •

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

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

高温环境对人肠屏障功能的损伤

宋卫兵, 肖冰, 阎丽

宋卫兵, 肖冰, 阎丽, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化病研究所 广东省广州市 510515
项目负责人: 肖冰, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化病研究所. xiaobing@fimmu.edu.cn
电话: 020-61641545 传真: 020-61641541
收稿日期: 2004-03-06 接受日期: 2004-04-13

摘要

正常肠屏障可防止肠道内细菌和内毒素侵入血液循环,但在高温环境下,肠黏膜会出现功能紊乱,引起肠道屏障功能损害。现主要从肠屏障功能的组成,高温对肠屏障功能损伤的机制,肠屏障功能改变的测定,对高温下肠屏障功能障碍的防治等方面综述高温对肠屏障功能的损伤。

宋卫兵, 肖冰, 阎丽. 高温环境对人肠屏障功能的损伤. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1646-1649

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1646.asp>

0 引言

肠道作为消化器官,在维持机体正常营养中起着极其重要的作用。正常情况下,肠道上皮细胞具有屏障作用^[1],可防止肠道内细菌和内毒素侵入血液循环。中暑是环境高温和/或剧烈体力活动时,因热的作用而引起的一种急性热致疾病,其中最严重的一种是热射病^[2-5]。近期研究表明,内毒素(Endotoxin, ET)在中暑发生中起着不可忽视的作用^[6]。当机体体温升高到一定程度,肠黏膜对ET的通透性增大,导致肠内细菌、内毒素易位。同时肠道ET大量入血,刺激人单核巨噬细胞释放肿瘤坏死因子- α (Tumour Necrotic Factor- α 即TNF- α)等细胞因子,这些细胞因与ET共同作用,引起机体肠道屏障功能损害。肠道被认为是机体应激时的中心器官之一。因此,了解高温对肠屏障功能损害有着重要临床意义。正常肠屏障功能的维持依赖于肠道所具有的特有功能,是由上皮、分子与免疫等组成的复杂功能^[7-10]。他能防止肠道内细菌、细菌产物逸至肠道外进入机体。正常情况下,肠黏膜表面生长着大量的厌氧菌,可抑制其他侵入性微生物的增生与过度生长;另外,上皮细胞对CL离子的主动转运可促进肠腔内液体流量而对有害物质起冲刷作用,同时肠道作为体内最大的免疫器官之一,含有大量免疫活性细胞的如各种B或T淋巴细胞亚群、浆细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等。这些细胞都有助于防止由肠腔内微生物入侵所引起的全身感染。然而,肠道最重要的屏障是肠上皮本身和覆盖在黏膜表面及小肠绒毛表面并延伸到腺管的黏液胶。相邻肠上皮细胞顶端之间为紧密连接,该连接封闭了顶部的细胞间隙,可

阻止大分子物质进入。紧密连接由多蛋白质复合物组成,对物质转运起选择性作用,使许多物质如脂肪多糖、一系列由细菌产生的前炎症物质等无法通过,于是这些物质大量存在于远端小肠及结肠肠腔中。近年来的研究提示,紧密连接还具有相当大的可控制性,其开放和关闭受肠腔内物质、细胞因子等各种生理及病理刺激的调节^[11]。肠黏膜中柱状上皮细胞是主要的吸收细胞,其他类型细胞如杯状细胞、肠内分泌细胞及Paneth细胞对肠黏膜上皮屏障起协调增强作用。另外,在肠道上还有一种结构比较特殊的细胞-M细胞。该细胞是属于与胃肠道滤泡相关的特异性上皮细胞,其主要生理功能是快速摄入特殊抗原及微生物,并呈递给淋巴滤泡中的免疫细胞,以引起有效的免疫反应。M细胞只覆盖在黏膜淋巴小结的穹隆上,是肠道上惟一具有通透性的上皮细胞,因而是肠黏膜屏障的一个薄弱环节,成了病原体入侵的门户。抗原大分子及一些病毒、细菌、原生动植物通过胞饮及吞噬作用而进入M细胞胞质内,从而突破黏膜屏障,然后与黏膜上皮具有免疫活性的细胞相互作用而引起黏膜和全身免疫反应^[12]。

1 高温对肠屏障功能损伤的机制

关于中暑的发生和发展机制,目前仍不清楚。近年来,国外学者认为,肠源性内毒素入血在中暑的发生和发展中具有重要作用^[13-17]。目前,人们对应激性肠屏障功能改变的病理生理机制提出了许多观点。然而,由于肠屏障功能的复杂性,没有哪一种单一机制能解释肠屏障功能不全的方方面面。

1.1 内毒素 第一军医大学热卫系罗炳德教授对动物受热致死过程中血浆中ET含量的动态变化水平进行了研究^[18],认为ET在中暑发病过程中起很大作用。内毒素是革兰阴性菌细胞壁的脂多糖(LPS)成分,类脂A是LPS的“毒力中心”。正常机体肠腔内含有大量细菌及内毒素,正常胃肠黏膜既能选择性地吸收营养成分,又能有效防止微生物及毒素的侵入。正常肠黏膜可允许少量内毒素通过进入门静脉,而少量内毒素对维系肝脏网状内皮系统处于激活状态有一定意义。机体在高温环境下,肠黏膜有可能发生通透性增高,导致细菌和内毒素易位^[19-21]。内毒素可以激活补体,和血液凝固、产生刺激血管的激肽、产生激活巨噬细胞的白介素1(IL1)和恶病质素(cachectin)。当门静脉血内毒素浓度增高时,又可使肝脏免疫功能受损,同时肝脏枯否细胞吞噬内毒素后可释放一系列花生四烯酸产物及细胞因子,如

前列腺素、血栓素、肿瘤坏死因子(TNF)、IL1、IL6等引起全身多脏器的损害,可使患者对治疗的反应性降低^[22].反过来,内毒素又可使肠黏膜通透性进一步增高^[23],造成恶性循环,进一步加重病情.

1.2 氧自由基 由于在高温环境因素可以显著改变机体的能量代谢,使得高温环境下机体微循环障碍加重,ATP生成减少,过氧化脂质反应增强^[24],并通过分解产物和氧自由基的过氧化引起细胞损伤^[25-26].氧自由基最容易攻击生物膜磷脂中的不饱和脂肪酸,引发链式脂质过氧化反应,产生脂质过氧化物.脂质过氧化物是不稳定的,能分解生成一系列的复杂产物,包括形成新的氧自由基,引起蛋白质分子内和分子间的交联,从而使功能蛋白丧失活性,氧自由基对细胞的损伤机制是多方面的^[27-29],主要包括对细胞膜的损伤,线粒体的损伤,而且认为自由基除了可直接损伤血管内皮细胞外,还可通过其他递质间接影响微血管通透性,由于自由基产生大量增加,使血管调节素作用减弱,从而导致微血管通透性升高^[30].目前,氧化剂损伤肠屏障功能的确切机制还不清楚.在各种体外实验模型中,如双氧水或超氧根离子等氧化剂能提高肠上皮细胞通透性,并能通过促进过多的肌动蛋白聚合作用来破坏细胞骨架,而细胞骨架是肠黏膜保持完整性的关键组成部分.反应性氧代谢产物能引起ATP耗竭^[31],也是引起肠屏障功能不全的一个重要因素.

1.3 ATP耗竭 尽管人们普遍认为ATP耗竭能增加上皮或内皮细胞的通透性,其确切机制还不清楚.ATP耗竭可破坏肌动蛋白微丝^[32],而以肌动蛋白为基础的细胞骨架的正常功能,对维持正常肠上皮细胞通透性是相当必需的,ATP耗竭通过干扰正常的细胞内钙平衡而促进细胞骨架紊乱^[33-34].

1.4 细胞因子及炎症递质 肠含有大量淋巴细胞^[35-38],能分泌许多细胞因子及炎症递质以刺激与调控肠的免疫功能.免疫细胞反应失控时,将损伤肠道屏障功能.细胞因子和炎症递质^[39-41]损伤中以及相互间的作用尚不十分清楚,主要包括肿瘤坏死因子、干扰素、白介素,血小板激活因子等,这些分子均有细胞毒作用,可直接引起肠黏膜组织水肿和破坏.高温环境下,肠道ET大量入血,刺激人单核巨噬细胞释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等细胞因子,提高动物模型上皮细胞的通透性.虽然其确切机制还不明了,但已知 $\text{INF}\gamma$ 或加上其他细胞因子能刺激一氧化氮(NO)的生成^[42-43]其机制可能为细胞因子引发NO合成酶生成,引起过多NO而导致肠上皮通透性增高.NO是L精氨酸的分解产物,其对心血管、神经和免疫系统有重要的调节和影响的自由基^[44-47],而且对胃肠道的生理和病理生理有多方面的作用^[48-53].肠道内许多细胞类型均可产生NO,如肠肌层神经元、血管内皮细胞及肠上皮;黏膜下炎症细胞包括肥大细胞、巨噬细胞及多形核白细胞等都是NO的潜在来源^[54].此外,肠腔内细菌为另一种潜在的NO来源.NO对肠上

皮通透性有调节作用^[55-56].研究表明,NO可调节生理状况下的黏膜屏障功能,并能下调急性病理生理状态下的肠上皮通透性.NO对肠屏障的保护机制包括维持血流、抑制血小板与白细胞黏附、调节肥大细胞反应、并能清除超氧化物等反应性氧代谢产物.然而一些研究结果提示,NO的过度生成对肠黏膜屏障的完整性有害.高浓度的NO可破坏肌动蛋白细胞骨架、抑制ATP生成、松散细胞紧密连接等引起肠上皮通透性增大.NO生成的持续增加尚可引起氧化剂的形成过度.氧化剂抑制线粒体功能而引起DNA分裂及细胞程序性死亡^[57].细胞程序性死亡使肠上皮出现短时的裸区而引起肠屏障功能减退,并易于发生细菌移位^[58-59].

1.5 黏膜酸中毒 黏膜酸中毒是由于局部缺氧产生大量酸性代谢产物堆积所引起.文献^[60]报道在实验性粪性腹膜炎的研究中发现黏膜pH值下降与肠通透性增加相一致.酸中毒本身可直接引起细胞代谢障碍、组织损伤,也可间接通过细胞外Ca离子的内流增加而使细胞及组织水肿加重,上皮通透性增加;应用Ca离子通透拮抗剂可以减轻肠黏膜损伤程度^[61].

2 肠屏障功能改变的测定

目前临床上直接观察肠屏障功能仍很困难,多采用间接方法进行测定.常用的方法有绒毛结构的评估及肠通透性的监测.

2.1 黏膜结构 肠道黏膜是防止细菌和内毒素移位的最外层屏障,因而黏膜结构的改变可引起肠屏障功能的改变.通过光镜观察绒毛高度、黏膜厚度及腺管深度是黏膜结构改变最常用的测量参数,并已广泛用于动物和人的研究中.但由于这些参数未包含细胞大小、生长率及绒毛宽度的信息及不同的研究引用不同的测量方法,因而对所得结果还有待进一步论证.

2.2 肠通透性 可采用酶学分光光度法测定血浆D-乳酸水平评价肠黏膜通透性.应用高压液相色谱法测量尿中乳果糖和甘露醇的含量也是一种灵敏和可靠的方法,测量乳果糖、甘露醇排泄率的比值可反映肠黏膜通透性,可作为监测肠屏障功能的有效指标^[62-64].

3 对高温下肠屏障功能障碍的防治

随着对肠屏障功能障碍机制理解的不断深入,有助于提高危重患者肠道衰竭的防治水平,改善危重患者肠道的反应性,减少细菌移位的发生.目前,人们对肠衰竭防治措施通常包括以下几个方面:(1)选择了一些抗内毒素的药如甘氨酸(G),甘氨酸能对ET的致热性产生有效的抑制,且破坏其结构,山莨菪碱是临床抗感染性休克的常规用药,动物实验证实,它具有稳膜作用,在细胞膜水平上抑制宿主细胞与内毒素的结合,并能增强巨噬细胞系统清除内毒素的能力,山莨菪碱能提高动物对高温的耐受性,对中暑内毒素血症有一定的预防作用.(2)改善肠系膜灌注,保持肠道足够的氧供对维持

肠屏障尤为重要。(3)危重患者的热量和蛋白质需要量增加,因而进行营养支持很重要。早期肠内营养有助于保持肠道屏障功能,提高免疫功能,减轻对创伤的高代谢反应。一些特殊营养物质,如谷氨酰胺、精氨酸、核苷酸等,可改善肠道和全身的免疫功能,增强对肠道结构和功能的保护作用。(4)调节应激时的代谢反应,有利于改善肠道的结构和功能。这些治疗措施包括抗内毒素制剂、抑制细胞因子及其他炎症反应活性成分的合成、清除氧自由基、保持内源性NO的水平、抑制交感神经过度兴奋、添加生长因子等。(5)合理应用抗生素,避免发生菌群失衡。必要时,行选择性肠道清洁,以改善肠道微生态环境。

总之,肠黏膜屏障损伤涉及微生态、免疫及分子生物学等诸多领域,是个相当复杂的过程。近年来,通过大量的动物实验和临床研究,在肠黏膜屏障损伤的原因、发生发展过程以及对机体的影响等方面取得了不少成绩,为肠屏障功能障碍的诊断和防治打下了基础,但也仅仅是一个轮廓性的了解,具体到参与其中的细胞、分子及相互间的作用等仍有许多不够明确之处,有待进一步深入地研究与探讨。

4 参考文献

- 1 石辛甫, 高杰英. 肠黏膜上皮细胞的免疫学功能. 国外医学免疫学分册 1999;4:203-206
- 2 于丽, 管英俊. 高温致畸与热休克反应、凋亡相关关系的研究进展. 科学进展 2002;8:271-273
- 3 贾长河. 热休克蛋白与胃粘膜病变. 陕西医学杂志 2003;6:530-533
- 4 刘兵, 张雪玲, 徐文, 郭堂春, 陈胜. 沙漠热环境负重行军者血浆热休克蛋白与热应激的关系. 中国公共卫生 2001;17:139-140
- 5 Lambert GP, Gisolfi CV, Berg DJ, Moseley PL, Oberley LW, Kregel KC. Selected contribution: Hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *J Appl Physiol* 2002 ;92:1750-1761
- 6 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
- 7 汪仕良, 王斐, 彭凌辉, 赵云, 尤忠义, 陶曦. 肠道营养支持对烧伤大鼠肠黏膜屏障功能的保护作用及于丽其机制. 基础医学与临床 2001;21:352-356
- 8 宫德正, 邹原, 梅懋华. 肠黏膜免疫系统与细胞因子. 大连医科大学学报 2002;24:56-60
- 9 谭建美. 肠黏膜屏障损伤的机制. 第一军医大学学报 2001;21:627-629
- 10 解基, 张志尧, 吴咸中. 承气方剂对肠屏障功能保护作用的实验研究. 中国中西医结合外科杂志 2002;8:189-191
- 11 Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seeger D, Schreiber S. TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:1001-1009
- 12 Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:993-1000
- 13 Szepes Z, Kiss J, Lamarque D, Moran AP, Nemcsik J, Morschl E, Laszlo F, Whittle BJ. Attenuation of *Helicobacter pylori* endotoxin-provoked rat intestinal inflammation by selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase. *J Physiol Paris* 2001;95:453-455
- 14 Taner AS, Cinel I, Ozer L, Onde U, Taner D, Koksoy C. Poly (adp-ribose) synthetase inhibition reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge. *Shock* 2001;16:159-162
- 15 Wang X, Wang B, Wu J, Wang G. Beneficial effects of growth hormone on bacterial translocation during the course of acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2001;23:148-156
- 16 Hall DM, Buettner GR, Oberley LW, Xu L, Matthes RD, Gisolfi CV. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H509-521
- 17 Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, Lu Q, Xu D. Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2000;28:3692-3696
- 18 罗炳德. 实验性中暑兔血浆内毒素与血液学指标的变化. 中国煤炭工业医学杂志 1999;2:386-388
- 19 Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Patsoukis N, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats. *Acta Physiol Scand* 2004;180:177-185
- 20 Scopa CD, Koureleas S, Tsamandas AC, Spiliopoulou I, Alexandrides T, Filos KS, Vagianos CE, Beneficial Scopa CD, Koureleas S, Tsamandas AC, Spiliopoulou I, Alexandrides T, Filos KS, Vagianos CE. Ects of growth hormone and insulin-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats. *J Am Coll Surg* 2000;190:423-431
- 21 Saitoh N, Hiraoka T, Uchino R, Miyauchi Y. Endotoxemia and intestinal mucosal dysfunction after the relief of obstructive jaundice by internal and external drainage in rats. *Eur Surg Res* 1995;27:11-18
- 22 Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, Gouma DJ. Treatment with recombinant bactericidal/permeability-increasing protein to prevent endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats. *J Am Coll Surg* 1999;189:374-379
- 23 Comert M, Taneri F, Tekin E, Ersoy E, Oktemer S, Onuk E, Duzgun E, Ayoglu F. The effect of pentoxifylline on the healing of intestinal anastomosis in rats with experimental obstructive jaundice. *Surg Today* 2000;30:896-902
- 24 Diebel LN, Liberati DM, Dulchavsky SA, Diglio CA, Brown WJ. Enterocyte apoptosis and barrier function are modulated by SIgA after exposure to bacteria and hypoxia/reoxygenation. *Surgery* 2003;134:574-580
- 25 Baylor AE 3rd, Diebel LN, Liberati DM, Dulchavsky SA, Brown WJ, Diglio CA. The synergistic effects of hypoxia/reoxygenation or tissue acidosis and bacteria on intestinal epithelial cell apoptosis. *J Trauma* 2003;55:241-247
- 26 Satoh T, Morisaki H, Ai K, Kosugi S, Yamamoto M, Serita R, Kotake Y, Takeda J. Olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, reduces gut mucosal injury and portal endotoxin level during acute hypoxia in ra bbits. *Anesthesiology* 2003;98:1407-1414
- 27 Baylor AE, Diebel LN, Liberati DM, Dulchavsky SA, Diglio CA, Brown WJ. The effects of varying oxygen conditions and immunoglobulin A on barrier defense to bacterial invasion. *Am Surg* 2003;69:231-237
- 28 Sun Z, Olanders K, Lasson A, Dib M, Annborn M, Andersson K, Wang X, Andersson R. Effective treatment of gut barrier dysfunction using an antioxidant, a PAF inhibitor, and monoclonal antibodies against the adhesion molecule PECAM-1. *J Surg Res* 2002;105:220-233
- 29 Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Halliday MI, Campbell FC. Bactericidal, permeability-increasing protein attenuates systemic inflammation and acute lung injury in porcine lower limb ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 2001;234:233-244
- 30 Banan A, Fitzpatrick L, Zhang Y, Keshavarzian A. OPC-compounds prevent oxidant-induced carbonylation and depolymerization of the F-actin cytoskeleton and intestinal barrier hyperpermeability. *Free Radic Biol Med* 2001;30:287-298
- 31 Banan A, Zhang Y, Losurdo J, Keshavarzian A. Carbonylation and disassembly of the F-actin cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in a human colonic cell line. *Gut* 2000;46:830-837
- 32 Liu TS, Musch MW, Sugi K, Walsh-Reitz MM, Ropeleski MJ, Hendrickson BA, Pothoulakis C, Lamont JT, Chang EB. Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am J Physiol*

- Cell Physiol* 2003;284:1073-1082
- 33 Stephens RH, O'Neill CA, Bennett J, Humphrey M, Henry B, Rowland M, Warhurst G. Resolution of P-glycoprotein and non-P-glycoprotein effects on drug permeability using intestinal tissues from *mdr1a* (-/-) mice. *Br J Pharmacol* 2002;135:2038-2046
- 34 Veau C, Leroy C, Banide H, Auchere D, Tardivel S, Farinotti R, Lacour B. Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1607-1614
- 35 Inamura T, Miura S, Tsuzuki Y, Hara Y, Hokari R, Ogawa T, Teramoto K, Watanabe C, Kobayashi H, Nagata H, Ishii H. Alteration of intestinal intraepithelial lymphocytes and increased bacterial translocation in a murine model of cirrhosis. *Immunol Lett* 2003;90:3-11
- 36 Sheen-Chen SM, Chen HS, Ho HT, Sheen CC, Chen WJ, Eng HL. Obstructive jaundice alters LFA-1 α expression in rat small intestine. *Dig Dis Sci* 2003;48:1165-1170
- 37 Woodside KJ, Spies M, Wu XW, Song J, Quadeer SS, Daller JA, Wolf SE. Decreased lymphocyte apoptosis by anti-tumor necrosis factor antibody in Peyer's patches after severe burn. *Shock* 2003;20:70-73
- 38 Wildhaber BE, Yang H, Tazuke Y, Teitelbaum DH. Gene alteration of intestinal intraepithelial lymphocytes with administration of total parenteral nutrition. *Pediatr Surg* 2003;38:840-843
- 39 Straumann A, Simon HU. He physiological and pathophysiological roles of eosinophils in the gastrointestinal tract. *Allergy* 2004;59:15-25
- 40 Tsuji E, Hiki N, Nomura S, Fukushima R, Kojima J, Ogawa T, Mafune K, Mimura Y, Kaminishi M. Simultaneous onset of acute inflammatory response, sepsis-like symptoms and intestinal mucosal injury after cancer chemotherapy. *Int J Cancer* 2003;107:303-308
- 41 Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003;171:6164-6172
- 42 Parks RW, Halliday MI, McCrory DC, Erwin P, Smye M, Diamond T, Rowlands BJ. Host immune responses and intestinal permeability in patients with jaundice. *Br J Surg* 2003;90:239-245
- 43 Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, Gonzalez DE, Quan C, Tom J, Mrsny RJ, Turner JR. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology* 2002;123:163-172
- 44 Han X, Fink MP, Yang R, Delude RL. Increased iNOS Activity is Essential for Intestinal Epithelial Tight Junction Dysfunction in Endotoxemic Mice. *Shock* 2004;21:261-270
- 45 Freeman SL, MacNaughton WK. Nitric oxide inhibitable isoforms of adenylate cyclase mediate epithelial secretory dysfunction following exposure to ionising radiation. *Gut* 2004;53:214-221
- 46 Chen LW, Wang JS, Hwang B, Chen JS, Hsu CM. Reversal of the effect of albumin on gut barrier function in burn by the inhibition of inducible isoform of nitric oxide synthase. *Arch Surg* 2003;138:1219-1225
- 47 Snygg J, Aneman A, Pettersson A, Fandriks L. Intestinal nitric oxide output during reduced mucosal blood flow in healthy volunteers. *Crit Care Med* 2003;31:2198-2204
- 48 Kukuruzovic R, Brewster DR, Gray E, Anstey NM. Increased nitric oxide production in acute diarrhoea is associated with abnormal gut permeability, hypokalaemia and malnutrition in tropical Australian aboriginal children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003;97:115-120
- 49 Samel S, Keese M, Lanig S, Kleczka M, Gretz N, Hafner M, Sturm J, Post S. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthesis influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats. *Shock* 2003;19:378-382
- 50 Han X, Fink MP, Delude RL. Proinflammatory cytokines cause NO^{*}-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 2003;19:229-237
- 51 Banan A, Farhadi A, Fields JZ, Zhang LJ, Shaikh M, Keshavarzian A. The delta-isoform of protein kinase C causes inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide up-regulation: key mechanism for oxidant-induced carbonylation, nitration, and disassembly of the microtubule cytoskeleton and hyperpermeability of barrier of intestinal epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:482-494
- 52 Banan A, Zhang L, Fields JZ, Farhadi A, Talmage DA, Keshavarzian A. PKC-zeta prevents oxidant-induced iNOS upregulation and protects the microtubules and gut barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;281:283-288
- 53 Rachlis A, Watson JL, Lu J, McKay DM. Nitric oxide reduces bacterial superantigen-immune cell activation and consequent epithelial abnormalities. *J Leukoc Biol* 2002;72:339-346
- 54 Deitch EA, Shorshtein A, Houghton J, Lu Q, Xu D. Inducible nitric oxide synthase knockout mice are resistant to diet-induced loss of gut barrier function and intestinal injury. *J Gastrointest Surg* 2002;6:599-605
- 55 Resta-Lenert S, Barrett KE. Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. *Gastroenterology* 2002;122:1070-1087
- 56 Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:1234-1246
- 57 Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294:997-1008
- 58 Langrehr JM, Machens C, Zill E, Leder K, Nussler A, Hoffman R, Neuhaus P. Bacterial translocation during graft-versus-host disease after small bowel transplantation is reduced following inhibition of inducible nitric oxide synthesis. *Transplantation* 2000;69:2415-2421
- 59 Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, Duran WN, Xu DZ. Endotoxin-induced mesenteric microvascular changes involve iNOS-derived nitric oxide: results from a study using iNOS knock out mice. *Shock* 2000;13:397-403
- 60 Ogata Y, Nishi M, Nakayama H, Kuwahara T, Ohnishi Y, Tashiro S. Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *J Surg Res* 2003;115:18-23
- 61 Dayde S, Brumas V, Champmartin D, Rubini P, Berthon G. Aluminum speciation studies in biological fluids. Part 9. A quantitative investigation of aluminum(III)-glutamate complex equilibria and their potential implications for aluminum metabolism and toxicity. *J Inorg Biochem* 2003;97:104-117
- 62 蒋小华, 李宁, 刘放南, 李元新, 黎介寿. 健康国人肠粘膜通透性的检测. *肠外与肠内营养* 2001;8:233-235
- 63 Lambert GP, Gisolfi CV, Berg DJ, Moseley PL, Oberley LW, Kregel KC. Selected contribution: Hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *J Appl Physiol* 2002;92:1750-1761
- 64 Hall DM, Buettner GR, Oberley LW, Xu L, Matthes RD, Gisolfi CV. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:509-521

丙型肝炎病毒感染动物模型研究进展

蒋黎, 毛青

蒋黎, 毛青, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所重庆市 400038
项目负责人: 毛青, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. qingmao@yahoo.com
电话: 023-68754475
收稿日期: 2004-03-20 接受日期: 2004-04-27

摘要

丙型肝炎病毒(HCV)感染是全球关注的公共卫生问题,对HCV分子生物学特性的深入探讨有赖于实验模型的建立.建立理想的HCV动物模型,不仅有利于丙型肝炎疫苗的研制,同时对深入研究丙型肝炎慢性化机制,包括病毒变异与宿主免疫应答以及与疾病的关系等,均具有重要意义.文章主要介绍了黑猩猩、猴、树鼩转基因鼠以及人鼠嵌合肝模型感染HCV,同时探讨了该模型体系存在问题及应用前景.

蒋黎, 毛青. 丙型肝炎病毒感染动物模型研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(7):1650-1655

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1650.asp>

0 引言

由于缺乏良好体外细胞复制系统和小动物模型,使HCV发病机制的研究还局限于HCV感染自然史的观察和黑猩猩的实验感染.但黑猩猩是受保护动物,数量有限,价格昂贵,不易获得,因此近年来人们一直致力于HCV体外细胞感染模型及小动物感染模型的研究,以期促进HCV发病机制、治疗药物筛选及疫苗等方面研究.有关黑猩猩的研究已较为深入,而猴和树鼩(Tupaia)也已被证实可感染HCV.此外,转基因和免疫耐受的人鼠嵌合肝模型的研究取得了一定进展.

1 黑猩猩

黑猩猩是公认的最好的HCV感染实验模型,已经证实HCV在黑猩猩体内能复制,黑猩猩对HCV的应答与人体相似,对HCV感染产生的免疫保护力也很差,不论是自限性感染或是慢性感染,这些黑猩猩可再感染其他HCV分离株,甚至同一HCV分离株^[1],HCV RNA水平和肝受累范围与人类感染HCV相似^[2].然而,与人类感染HCV后E2表现出极高的异质性相反, Bassett et al^[3]报道一组实验感染HCV黑猩猩的自然史不同于典型人类感染.这些黑猩猩HCV的清除率较高(61%),包膜蛋白抗体的产生率较低(抗E1: 22%; 抗E2: 15%),且包膜蛋白氨基酸的变异率亦较低. Major et al^[4]亦发现了类似现象,即HCV E2区氨基酸很少改变.我们观察了

HCV在黑猩猩中传代和慢性感染时HVR1区变异状况,发现非同义替换率较人感染时低,非同义替换与同义替换的比率也下降^[5].说明出现上述差异可能与黑猩猩选择性免疫压力低有关,也就是说尽管人和黑猩猩体内HCV复制率是相似的,但由于黑猩猩的免疫选择压力低,从而减少了HCV基因的变异. Mizukoshi et al^[6]为了鉴定黑猩猩在感染HCV后免疫应答中主要组织相容复合物HLA系的分子和免疫学上的意义发现,黑猩猩的MHC和人共同的等位基因HLA-A1, -A2, -A3, 和 -B7具有紧密功能的同源性,并且HCV感染后产生的HCV肽均能够被黑猩猩和人的组织适合抗原系所识别.因此,通过感染黑猩猩有利于研究HCV感染后免疫病理^[7-9],设计、评价疫苗^[10-13].

黑猩猩感染HCV后病毒血症有3种表现形式:(1)暂时性:多于感染后2 wk出现,持续9-38 wk,表现为自限性感染;(2)持续性:病毒血症可持续至少6 mo以上,甚至长达11 a,表现为慢性感染;(3)间断性:病毒血症呈间断性阳性,也表现为慢性感染.HCV RNA在黑猩猩血清中存在时间短,表现为自限性感染居多,形成慢性感染的概率报道不一.慢性感染的黑猩猩HCV RNA大部分持续阳性^[14-15],但有少部分呈间歇性阳性^[16].

Shimizu et al^[17]研究发现,黑猩猩接种HCV后3-4 d即可于血清中检测出HCV RNA,7 wk时HCV RNA水平达峰值,为 10^7-10^8 CID/L,同时血清ALT水平最高.感染后3 d,肝细胞活检即可检测到HCV RNA. Farci et al^[18]发现,在HCV感染的6只黑猩猩中,4只病毒血症持续17(10-27 wk),随后血清HCV RNA消失,而另2只则在观察的36 mo内持续阳性. Schlauder et al^[19]从实验感染HCV 10 a的黑猩猩血清中检测到HCV RNA,说明HCV在黑猩猩中长期存在.而 Prince et al^[20-21]发现1只黑猩猩在接种HCV后1-16 wk内,HCV RNA呈弱阳性,至5, 6, 9 mo时为阴性,而8, 10 mo及其后血清都为阳性,可见HCV RNA在黑猩猩体内有持续性及间歇性表达两种,1次PCR检测阴性不能确定HCV已经停止复制,而必须进行动态观察.黑猩猩感染HCV后,其肝组织HCV RNA的变化与血清HCV RNA的阳转时间、高峰时间、持续时间完全一致,说明血清HCV RNA的检测可准确反映HCV在肝细胞中的复制情况.

2 猴

1995年,夏宁邵 et al^[22-24]报道了猕猴实验感染HCV的

结果. 他们用HCV阳性的献血员血清经静脉接种6只食蟹猴、3只恒河猴和3只熊猴. 结果9例猕猴出现不同程度的肝炎症状, 12例血清ALT升高, 2例出现黄疸, 5例抗HCV C22IgG抗体阳性, 4例抗HCV E-24 IgG抗体阳性, 10例抗HCV C33cl gG抗体阳性, 2例抗HCVNS4-40 IgG抗体阳性, 11例抗HCV NS5-A IgG抗体阳性, 无1例抗HCVNS5-B IgG抗体阳性, 9例HCV-RNA阳性. 肝病理检查示肝细胞气球样变, 点状坏死及少许纤维组织增生. 仅1例呈碎片坏死, 界板破坏, 纤维组织增生明显, 汇管区炎性细胞浸润. 并在内质网里看到约30 nm的类病毒颗粒, 免疫组化显示3只动物肝组织内HCVNS3抗原阳性. 他们还进行了传代感染研究, 发现各代间5' UTR-C区核苷酸和氨基酸的同源性均很高, 分别为95.25-98.07%和92.84-98.21%.

1997年, Garson et al^[25]尝试用小狨猴(tamarin)作为HCV感染模型. 用HCV感染血清静脉注射3只小狨猴, 检测各种血清指标及肝组织病理学改变, 血清HCV RNA只在注射后10 min呈阳性, 未检测到主动免疫应答产生的抗-HCV, 但有一只小狨猴在注射后1 wk尚可检测到被动输入的抗-HCV, 未见肝组织有炎症反应, 提示小狨猴不是HCV的易感动物. 近年有关猴作为HCV感染模型报道不多, 其作为可供研究HCV使用模型的可能性有待验证.

3 树鼩

树鼩(tree shrew, tupaia)介于啮齿类与灵长类之间, 与人类有近缘关系. 树鼩共有11种, 其中8种*T. belangeri*分布在中国, 主要生活在云南和广西两省. 树鼩体积小, 经济易得, 目前已可进行人工繁殖, 适合作为动物模型. 试验证明, 树鼩对HBV、HDV等肝炎病毒相对易感. 1997年, 王海平 et al^[26]报道用HCV阳性血清经静脉接种6只树鼩, 对照组则注射正常人血清, 隔天再次接种. 结果发现全部实验组树鼩在试验过程中都出现一过性的精神差、食欲下降、轻度腹泻及尿黄等, 持续约1 wk. 接种后2-3 wk, 有3只树鼩血清HCV RNA呈间歇性阳性, 9-11 wk, 有2只ALT水平升高, 峰值达108 μ kat/L. 实验组树鼩肝组织活检, 可见汇管区淋巴细胞浸润、肝细胞脂肪变及嗜酸性变等与人HCV感染相似的病理改变, 免疫组化发现阳性颗粒分布于肝细胞质中, 电镜检查发现肝细胞线粒体及滑面内质网出现中毒性改变.

我们也发现, 树鼩接种HCV阳性血清后, 出现不同程度的肝炎症状, 血清ALT升高. 肝组织表现为急性或慢性肝炎的病理学变化, 肝组织中HCV抗原阳性. 血清HCV RNA均呈间歇性阳性, 并可在肝组织中检测到负链HCV RNA(复制中间体). 还发现有感染肝外组织的可能^[27]. 谢志春 et al^[28]对HCV感染树鼩模型进行了更为深入的研究. 他们用不同亚型HCV分离株进行接

种, 并比较了正常树鼩和经辐照树鼩的感染状况. 发现经辐照后, 树鼩的HCV病毒血症持续时间更长, 抗-HCV滴度更高. 病毒血症持续最长的树鼩在接种后2 wk检测到HCV RNA, 一直持续到第7 wk, 然后消失, 到14 wk和27 wk时又再出现; 用原位PCR检测到肝细胞中的HCV RNA, HCV主要分布在肝细胞质靠近核膜一侧^[29].

虽研究表明树鼩可急性感染HCV, 同时原代树鼩肝细胞分离培养后可感染HCV^[30], 但目前难以建立树鼩慢性HCV感染模型, 而且HCV感染树鼩后病毒的复制及表达水平不高. 另外, 目前我国的树鼩多为野生型, ALT基础水平一般较高(可能为寄生虫感染等因素导致的肝损伤), 不易饲养及繁殖, 所获得的感染结果多不肯定, 因此给建立HCV树鼩感染模型带来很大困难.

4 转基因小鼠模型

转基因技术自1980年代初发展起来现已成为生命科学领域中普遍应用的常规技术手段, 他利用细胞核显微注射等技术将外源DNA导入动物, 使其在基因组中稳定整合并表达. 自1995年Koike et al第一次成功地建立了HCV转基因小鼠模型以来^[31], 各种转基因小鼠模型相继问世, 从而不仅为研究HCV感染细胞的机制, 病毒在肝细胞内的装配、转运及免疫病理提供了重要的技术保证, 也为抗HCV药物的研究提供了新的方法.

HCV转基因小鼠主要为结构基因转基因小鼠, 在病毒导致肝炎、脂肪肝变及肝癌的致病机制方面的研究居多. Pasquinelli et al^[32]将编码HCV结构蛋白的C、E基因分别插入到鼠主尿蛋白(Mup)启动子下游, 建立携有HCV基因片段的转基因小鼠. Kawamura et al^[33]构建了HCV结构基因转基因鼠, 经长期的观察共同发现: 没有任何生化及病理学证据表明小鼠肝细胞有损伤、炎症及肿瘤发生. 谭文杰 et al^[34]将HCV的5' - 非编码区和结构基因插入于pcDNA3表达载体中所获得的转基因小鼠系, 同样未发现小鼠的病理损伤, 不过在小鼠的心、肾、肝中均同时检出Fas抗原, 其表达水平与核壳蛋白的表达呈正相关. Honda et al^[35]建立的HCV结构基因转基因鼠与正常小鼠相比, 转基因鼠对Fas抗体更为敏感, 这似乎显示HCV结构基因的复制和表达与肝细胞的损伤无直接相关性, 而HCV的致病可能是HCV的基因表达诱导Fas系统并激发特异性杀伤性T细胞(CTL)细胞转型与免疫损伤; Soguero et al^[36-37]. Moriya et al^[38]应用超速离心、Western blotting杂交法及免疫染色法确定了HCV结构蛋白转基因小鼠肝细胞内结构蛋白的亚细胞定位. 此外, 为了了解HCV核壳蛋白是否具有致肝细胞病变效应, 构建了2个独立的转基因小鼠系^[39]. 自2 mo起, 病理检查就发现鼠肝细胞质中出现了空泡样变; 3 mo脂肪变形成, 16 mo有肝细胞癌(HCC)的出现^[40]. 值得注意的是, HCV包膜蛋白转基因

小鼠并未出现任何肝组织学改变. 此外, Perlemuter et al^[41]在转基因鼠中发现 HCV 核壳蛋白的过量表达可以抑制极低密度脂蛋白(VLDL)的分泌和装配, 导致微粒体甘油三酯转移蛋白(MTP)的活性降低及 VLDL 颗粒的缩小. 成军 et al^[42]发现约 80% 的 HCV 结构基因的转基因小鼠模型发生肝脏等内脏的脂肪变, 为研究 HCV 慢性感染引起的脂肪变奠定了基础.

最近, 我国 HCV 转基因小鼠的研究获得了较快发展. 任进余 et al 成功地建立了稳定表达与诱导表达 HCV 结构基因转基因小鼠. 在稳定表达型小鼠中发现, HCV 结构基因在小鼠发育早期的高表达, 可导致死胎; 中度表达可致多脏器严重的组织损伤; 低表达或不表达则使小鼠幸存; 低表达小鼠 6 月龄后 80% 以上可发生肝细胞脂肪变性. 研究结果提示, HCV 结构基因具有明显细胞毒作用, 且与表达水平密切相关. HCV 结构基因高表达, 可迅速导致小鼠多脏器严重损伤, 46.7% 的小鼠在 3-5 d 内死亡, 从而证实 HCV 结构蛋白具有明显的直接致细胞病变作用. 另外, 免疫组化研究后得出结论, 高表达核型 HCV-core 在肝细胞凋亡或坏死区域多见, HCV-E2 表达区可见肝肾细胞脂肪变性、间质性肺炎、肺肉芽肿等, 提示 HCV-core、E2 致病机制可能不同.

转基因小鼠还可以用于 HCV 感染导致 HCC 发病机制的研究^[43-45]. Moriya et al^[46]报道了对 HCV 核壳蛋白转基因鼠致癌机制的研究. 他们认为, HCV 核壳蛋白可能通过改变肝内氧化/抗氧化系统而致癌, 此外可直接引起脂代谢紊乱. 通过 C18:0 脂肪酸途径间接诱发肝癌. Lerat et al^[47]也在 HCV 转基因鼠中观察到了肝脂肪变, 同时认为, 表达 HCV 结构蛋白基因会致脂肪变, 而表达低水平的非结构蛋白基因会使癌变的概率提高. 在 HCV 非结构基因转基因小鼠的研究中, Matsuda et al^[48]将全长的 HCV cDNA 转入 C57 小鼠, 结果只有一个鼠系有 HCV 蛋白的表达, 且表达水平低下.

虽然转基因小鼠作为 HCV 感染模型报道较多^[49-52], 但各方研究发现不尽相同^[53], 且存在许多问题^[54]; 转基因小鼠处于免疫耐受状态, 对 HCV 导致肝细胞损伤的原因, 究竟是病毒的直接作用还是病毒与机体免疫系统的相互作用尚有争议, 并难以用于疫苗的研发. 要建立更为理想的 HCV 转基因鼠, 尚需进一步加强基因结构、功能、表达调控和转基因动物技术方法的研究.

5 人鼠嵌合肝模型

5.1 转基因人鼠肝细胞重构动物模型 由于受 MHC 种族特异性的限制, 肝炎病毒不能感染动物肝细胞, 随着分子生物学技术的发展, 使移植人肝细胞到免疫缺陷的小鼠肝脏中成为可能, 并使重构于小鼠肝脏的人肝细胞可用于分析代谢性或病毒性肝病的基因治疗和探讨生物机制^[55-58]. 既往研究发现移植的肝细胞虽能和宿主肝实质一体化^[59], 但在正常的受体肝脏, 移植肝细胞

只能显示出有限的数量增长活性^[60]. 通过转基因小鼠或(和)免疫缺陷小鼠建立的人鼠嵌合肝, 却显示了受体肝细胞重构后的选择性生长活性^[61], 有助于移植肝细胞的生长. 表达尿激酶纤维蛋白溶酶原激活因子(urokinase-type plasminogen activator, uPA)的转基因鼠就是其例, uPA 基因由白蛋白启动子(Alb-uPA)转录调控. uPA 的表达具有肝细胞毒性, 故以肝细胞为靶目标的转基因 Alb-uPA 的表达会逐渐耗尽宿主肝细胞, 而移植的肝细胞却可以多细胞系的增长. 然而宿主鼠某些内源性的肝细胞可消除转基因的表达, 导致宿主和人肝细胞竞争性生长; 为避免转基因的消除, 可采用与不同小鼠品系杂交, 从而分别形成了 HBV^[67]和 HCV 体内感染模型.

Mercer et al^[62]所建立的感染 HCV 的小型动物模型-人鼠嵌合肝, 无疑是巨大的进步. Alb-uPA 转基因鼠和严重联合免疫缺陷小鼠(C.b-17/SCID/bg 株)杂交后, 把人肝细胞移植到纯合子 Alb-uPA 的杂交鼠中所建立的嵌合肝, 人肝细胞数量在小鼠肝内重构可达 50% 以上. 且纯合子 Alb-uPA 的杂交鼠以持续产出人白蛋白为特性. 接种 HCV 感染的病毒血清后在移植了人肝细胞的小鼠中 75% 都可以产生持续性病毒血症. 直到 35 wk HCV RNA 的滴度仍可持续在 3×10^7 - 3×10^9 拷贝/L, 这和感染人群相似. 此外, 接种 HCV 感染血清后病毒滴度近 3 倍增长, HCV 负链 RNA 可在移植的肝细胞中发现, 且 HCV 病毒蛋白定居于肝细胞结节, 其通过血液途径造成数代小鼠的感染充分证实了该感染模型可合成和释放感染性的病毒颗粒. 该嵌合体作为第一个适合于研究 HCV 体内感染的小鼠模型, 优点在于^[63]: (1)HCV 感染处于人肝细胞的微环境中, 这区别于病毒感染黑猩猩及其他动物模型; (2)成功的感染有望从不同的 HCV 阳性血清接种后分离不同的 HCV 型别; (3)最重要的是该系统可反映 HCV 自然感染的全过程; (4)不但可检测抗病毒效力, 同时可用于其他如药物作用及代谢的研究. 不过, 其尚存在一些未知的问题: (1)免疫系统在 HCV 发病过程中占有重要地位, 而该模型无法用于发病机制的研究, 从而无法研究有效疫苗. 然而, 用人类免疫系统成分重塑免疫功能可扩展该模型在这方面的研究^[64]; (2)获得该模型是否方便、简易、杂交的紊乱以及近 35% 的新生 SCID(Severe combined immunodeficiency disease)小鼠死亡率使得操作上较为艰难; (3)要获得移植用的新鲜肝组织来源有限, 这急需大力发展有效的冷冻技术; (4)非实质肝细胞在宿主小鼠肝内大量生长, 并且在肝细胞中相互作用, 他们很可能扮演着某些未知的角色, 至少具有高分化的功能.

5.2 HCV 三聚体小鼠(HCV-Trimera mouse) Ilan et al^[65]在建立了乙型肝炎病毒三聚体小鼠(HBV-Trimera Mouse)后, 同样运用致死剂量辐射去除正常小鼠的免疫系统, 再与 SCID 小鼠骨髓细胞进行重构, 最后将已经感染了 HCV 的人肝细胞移植到鼠肝内建立 HCV 三聚体小鼠^[66]. 病毒血症(HCV RNA)水平在移植后 18 d 达到高

峰, HCV 感染率近 85%. 复制中间体(HCV RNA 负链)也可在肝细胞中发现. 通过这种模型不仅可检测HCV内源性核糖体位点抑制物的活性来评估抗HCV药物的效力, 且能产生抗HCV人单克隆抗体(HCV AB(XTL)68). 该模型目前已走入产业化的道路, 便于获得.

5.3 大鼠 - 人肝细胞嵌合体 转基因人鼠肝细胞重构动物模型是用无免疫活性的小鼠作为受者来克服异种移植引发的排斥反应, 而大鼠 - 人肝细胞嵌合体却是把人肝细胞移植到正常大鼠肝内, 诱导产生针对移植物的特异耐受建立的动物模型. 免疫系统在出生后不久就可区分“自我”和“非我”, 所以如果动物在胚胎发育时期接触到外来抗原, 他们会逐渐对这些抗原产生耐受, 允许异种移植在大白鼠中存活. Ouyang et al^[67]在大白鼠妊娠15-17 d时, 给予子宫胚胎腹腔注射人肝细胞, 导致胚鼠对人肝细胞特异性耐受; 在其出生24 h内脾内注射原代人肝细胞, 从而形成人鼠嵌合肝模型. 混合淋巴细胞的测定表明胚胎时期接触到人肝细胞的鼠, 出生后对人肝细胞的移植耐受. 经观察, 移植了人肝细胞的耐受鼠在移植后的16 wk发现了人白蛋白基因, 且移植细胞具有一定的功能活性, 如表达人白蛋白的mRNA和人白蛋白基因产物, 而抗人白蛋白抗体尚未被发现. 如果在出生1 wk接种HBV, 此后第3 d耐受鼠的血清可产生HBsAg. 经过至少60 d的观察, 鼠血清病毒水平可增长5倍, 并持续保持0.7 ng/L. 人血清白蛋白染色阳性的肝细胞中用免疫组化发现近30%的HBsAg阳性. 血清HBV DNA在感染后1-15 wk均可发现, 代表病毒复制的共价闭合环状DNA(cccDNA)也能在肝脏和血清中检测到. 这些数据表明原代人肝细胞移植到正常免疫力的啮齿动物, 不仅能够存活并且保持上述特性, 足够证明该模型能产生人血清白蛋白并可被HBV感染^[68-69]. 这种人鼠嵌合肝同样能运用于HCV的感染. 此外建构在正常免疫系统基础上的动物模型, 为研究免疫反应、发病机制、抗病毒治疗和开发强效疫苗开辟了道路.

转基因和人鼠嵌合肝模型的实用性和有效性还需要在实践中不断证实. 不过, 人鼠嵌合肝的建立和发展已经为研究病毒性肝炎提供了更佳的手段.

6 参考文献

- Wyatt CA, Andrus L, Brotman B, Huang F, Lee DH, Prince AM. Immunity in chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus: role of minor quasispecies in reinfection. *J Virol* 1998;72:1725-1730
- Agnello V, Abel G, Knight GB, Muchmore E. Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;28:573-584
- Bassett SE, Thomas DL, Brasky KM, Lanford RE. Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees. *J Virol* 1999;73:1118-1126
- Major ME, Mihalik K, Fernandez J, Seidman J, Kleiner D, Kolykhalov AA, Rice CM, Feinstone SM. Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol* 1999;73:3317-3325
- Ray SC, Mao Q, Lanford RE, Bassett S, Laeyendecker O, Wang YM, Thomas DL. Hypervariable region 1 sequence stability during hepatitis C virus replication in chimpanzees. *J Virol* 2000;74:3058-3066
- Mizukoshi E, Nascimbeni M, Blaustein JB, Mihalik K, Rice CM, Liang TJ, Feinstone SM, Rehermann B. Molecular and immunological significance of chimpanzee major histocompatibility complex haplotypes for hepatitis C virus immune response and vaccination studies. *J Virol* 2002;76:6093-6103
- Rollier C, Drexhage JA, Verstrepen BE, Verschoor EJ, Bontrop RE, Koopman G, Heeney JL. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* 2003;38:851-858
- Larsson M, Babcock E, Grakoui A, Shoukry N, Lauer G, Rice C, Walker C, Bhardwaj N. Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *J Virol* 2004;78:6151-6161
- Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghrayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003;302:659-662
- Puig M, Major ME, Mihalik K, Feinstone SM. Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine* 2004;22:991-1000
- Rollier C, Depla E, Drexhage JA, Verschoor EJ, Verstrepen BE, Fatmi A, Brinster C, Fournillier A, Whelan JA, Whelan M, Jacobs D, Maertens G, Inchauspe G, Heeney JL. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *J Virol* 2004;78:187-196
- Major ME, Mihalik K, Puig M, Rehermann B, Nascimbeni M, Rice CM, Feinstone SM. Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *J Virol* 2002;76:6586-6595
- Bassett SE, Guerra B, Brasky K, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR, Lanford RE. Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology* 2001;33:1479-1487
- Shata MT, Tricoche N, Perkus M, Tom D, Brotman B, McCormack P, Pfahler W, Lee DH, Tobler LH, Busch M, Prince AM. Exposure to low infective doses of HCV induces cellular immune responses without consistently detectable viremia or seroconversion in chimpanzees. *Virology* 2003;314:601-616
- Prince AM, Pawlotsky JM, Soulier A, Tobler L, Brotman B, Pfahler W, Lee DH, Li L, Shata MT. Hepatitis C virus replication kinetics in chimpanzees with self-limited and chronic infections. *J Viral Hepat* 2004;11:236-242
- Katayama K, Kumagai J, Komiya Y, Mizui M, Yugi H, Kishimoto S, Yamanaka R, Tamatsukuri S, Tomoguri T, Miyakawa Y, Tanaka J, Yoshizawa H. Titration of hepatitis C virus in chimpanzees for determining the copy number required for transmission. *Intervirology* 2004;47:57-64
- Shimizu YK, Purcell RH, Yoshikura H. Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6037-6041
- Farci P, Munoz SJ, Shimoda A, Govindarajan S, Wong DC, Coiana A, Peddis G, Rubin R, Purcell RH. Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J Infect Dis* 1999;179:1007-1011
- Schlauder GG, Leverenz GJ, Amann CW, Lesniewski RR, Peterson DA. Detection of the hepatitis C virus genome in acute and chronic experimental infection in chimpanzees. *J Clin Microbiol* 1991;29:2175-2179
- Prince AM, Brotman B, Huima T, Pascual D, Jaffery M, Inchauspe G. Immunity in hepatitis C infection. *J Infect Dis* 1992;165:438-443
- Prince AM, Brotman B. Biological and immunological aspects of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 1998;62:250-265
- 田保平, 夏宁邵, 汤权, 季维智, 杨上川, 屠建平, 许加福, 毕胜利.

- 丙型肝炎病毒感染猕猴属三种动物的血清丙氨酸转氨酶动态观察. 中华实验和临床病毒学杂志 1995;9:375-376
- 23 夏宁邵, 毕胜利, 杨永平, 赵同兴, 金冬雁, 季维智, 洪宁, 田保平, 汤权, 刘敏, 谢德胜, 詹美云. 中国株丙型肝炎病毒实验感染3种猕猴的初步结果. 中国科学·B辑 1995;25:732-739
- 24 夏宁邵, 王海林, 毕胜利, 洪宁, 田保平, 郑延硕, 刘敏, 季维智, 侯云德. 中国株丙型肝炎病毒(HCV)感染猕猴后5' NTR-C区基因组的cDNA序列分析. 病毒学报 1996;12:111-117
- 25 Garson JA, Whitby K, Watkins P, Morgan AJ. Lack of susceptibility of the cottontop tamarin to hepatitis C infection. *J Med Virol* 1997;52:286-288
- 26 王海平, 周永兴, 姚志强, 洪沙, 李光玉. 成年树鼩实验感染丙型肝炎病毒的初步研究. 第四军医大学学报 1997;18:375-376
- 27 刘志, 毛青, 王宇明, 李奇芬. 丙型肝炎病毒感染成年树鼩的实验研究. 第三军医大学学报 1998;6:472-475
- 28 Xie ZC, Riezu-Boj JJ, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 1998;244:513-20
- 29 谢志春, 高伟志, 苏洁寒, 邬质彬, 徐国城, Ignacio J, Boj R, Prieto J. 树鼩对丙型肝炎病毒的易感性研究. 广西医科大学学报 2000;17:347-350
- 30 Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, Wolff-Vorbeck G, Barth H, Levy S, von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2002;109:221-232
- 31 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
- 32 Pasquinelli C, Shoenberger JM, Chung J, Chang KM, Guidotti LG, Selby M, Berger K, Lesniewski R, Houghton M, Chisari FV. Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology* 1997;25:719-727
- 33 Kawamura T, Furusaka A, Koziel MJ, Chung RT, Wang TC, Schmidt EV, Liang TJ. Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology* 1997;25:1014-1021
- 34 谭文杰, 丛郁, 李光三, 毕胜利, 杜森, 詹美云. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠的建立. 病毒学报 1997;13:19-23
- 35 Honda A, Arai Y, Hirota N, Sato T, Ikegaki J, Koizumi T, Hatano M, Kohara M, Moriyama T, Imawari M, Shimotohno K, Tokuhisa T. Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *J Med Virol* 1999;59:281-289
- 36 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
- 37 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
- 38 Moriya K, Fujie H, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Tsutsumi T. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in the liver of transgenic mice. *Jpn J Med Sci Biol* 1997;50:169-177
- 39 Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 7):1527-1531
- 40 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. *Nat Med* 1998;4:1065-1068
- 41 Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Brechot C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002;16:185-194
- 42 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
- 43 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
- 44 Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:394-400
- 45 Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62(Suppl 1):29-37
- 46 Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001;61:4365-4370
- 47 Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, Okuda M, Gosert R, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002;122:352-365
- 48 Matsuda J, Suzuki M, Nozaki C, Shinya N, Tashiro K, Mizuno K, Uchinuno Y, Yamamura K. Transgenic mouse expressing a full-length hepatitis C virus cDNA. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:150-158
- 49 Disson O, Haouzi D, Desagher S, Loesch K, Hahne M, Kremer EJ, Jacquet C, Lemon SM, Hibner U, Lerat H. Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* 2004;126:859-872
- 50 Kato T, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Taya C, Yonekawa H, Ohue C, Yagi S, Seki E, Hirano T, Fujimoto J, Shirai T, Wakita T. Repeated hepatocyte injury promotes hepatic tumorigenesis in hepatitis C virus transgenic mice. *Cancer Sci* 2003;94:679-685
- 51 Blindenbacher A, Duong FH, Hunziker L, Stutvoet ST, Wang X, Terracciano L, Moradpour D, Blum HE, Alonzi T, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology* 2003;124:1465-1475
- 52 Takaku S, Nakagawa Y, Shimizu M, Norose Y, Maruyama I, Wakita T, Takano T, Kohara M, Takahashi H. Induction of hepatic injury by hepatitis C virus-specific CD8+ murine cytotoxic T lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:330-337
- 53 Masciopinto F, Freer G, Burgio VL, Levy S, Galli-Stampino L, Bendinelli M, Houghton M, Abrignani S, Uematsu Y. Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology* 2002;304:187-196
- 54 Pietschmann T, Bartenschlager R. Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2003;7:23-43
- 55 Galun E, Burakova T, Ketzinel M, Lubin I, Shezen E, Kahana Y, Eid A, Ilan Y, Rivkind A, Pizov G. Hepatitis C virus viremia in SCID→BNX mouse chimera. *J Infect Dis* 1995;172:25-30
- 56 Petersen J, Dandri M, Gupta S, Rogler CE. Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepatitis C virus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:310-315
- 57 Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 2001;33:981-988
- 58 Sefrioui H, Donahue J, Gilpin EA, Srivastava AS, Carrier E. Tolerance and immunity following in utero transplantation of allogeneic fetal liver cells: the cytokine shift. *Cell Transplant* 2003;12:75-82
- 59 Brown JJ, Parashar B, Moshage H, Tanaka KE, Engelhardt D, Rabbani E, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice. *Hepatology* 2000;31:173-181
- 60 Dandri M, Burda MR, Gocht A, Torok E, Pollok JM, Rogler CE, Will H, Petersen J. Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepatitis C virus infection and mouse liver repopulation after

- cryopreservation. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):824-833
- 61 Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998;4:1185-1188
- 62 Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001;7:927-933
- 63 Brass V, Blum HE, Moradpour D. Of mice and men: a small animal model of hepatitis C virus replication. *Hepatology* 2002; 35:722-724
- 64 Mosier DE. Human xenograft models for virus infection. *Virology* 2000;271:215-219
- 65 Ilan E, Burakova T, Dagan S, Nussbaum O, Lubin I, Eren R, Ben-Moshe O, Arazi J, Berr S, Neville L, Yuen L, Mansour TS, Gillard J, Eid A, Jurim O, Shouval D, Reisner Y, Galun E. The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents. *Hepatology* 1999;29:553-562
- 66 Ilan E, Arazi J, Nussbaum O, Zauberman A, Eren R, Lubin I, Neville L, Ben-Moshe O, Kischitzky A, Litchi A, Margalit I, Gopher J, Mounir S, Cai W, Daudi N, Eid A, Jurim O, Czerniak A, Galun E, Dagan S. The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J Infect Dis* 2002;185:153-161
- 67 Ouyang EC, Wu CH, Walton C, Promrat K, Wu GY. Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:324-330
- 68 Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Wu GY. Liver cell transplantation-novel animal model for human hepatic viral infections. *Croat Med J* 2001;42:446-450
- 69 Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Promrat K, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:978-983

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

• 消息 •

影响因子记录中国期刊进步足迹

《科学时报》2004-06-24 报道：美国科学信息研究所的《期刊影响因子 - 网络版》(The Journal Citation Reports on the Web) 6月18日公布了2003年度5907种来源期刊的影响因子。中国期刊影响因子较2002年再创新高。

2003年SCI网络版收录中国学术期刊76种，2003年JCR网络版公布的是前两年在收的70种中国期刊(含中国机构主办由外国出版商代为出版的期刊)的影响因子。经统计，70种期刊的影响因子总值为39.718，平均值为0.567；若按收录期刊76种计算平均值为0.523。

中国学术期刊年年都有进步。就整体而言，中国在1999年以前未曾有过影响因子达到1的期刊，2000年仅有1种期刊影响因子刚好为1，2001年有2种期刊影响因子超过1，2002年则有6种期刊影响因子超过1，而2003年共有11种期刊影响因子超过1。

从收录期刊数和影响因子平均值来看，1997年~2003年收录中国期刊总数分别为36种，45种，57种，63种，66种，70种和76种；有影响因子的期刊分别为21种，32种，37种，48种，60种，64种和70种。按收录期刊总数计算影响因子平均值，7年分别为：0.125；0.159；0.178；0.240；0.351；0.422和0.523，若仅按有影响因子的期刊数计算平均影响因子，则这7年分别为：0.214；0.224；0.274；0.313；0.386；0.452和0.567。

从各年度中国期刊影响因子最高值看，1997年-2003年分别是：0.513(《中国科学：B辑》)；0.818(《高能物理与核物理》)；0.839(《生物医学与环境科学》)；1.000(《地质学报》)；2.102(《细胞研究》)；2.532(《世界胃肠病学杂志》)；3.318(《世界胃肠病学杂志》)。这几串单向变化的数字已清晰记录了中国期刊整体进步的足迹。

近两年连续排在中国期刊影响因子第一位的《世界胃肠病学杂志》(World Journal of Gastroenterology)，自1998年开始被SCI收录。JCR 2000年度报告中，该刊影响因子为0.993，2001年为1.445。在这两年也均是中国期刊中影响因子较高者。该刊在SCI中归属“胃肠病学与肝脏病学”(Gastroenterology & Hepatology)类目，此类目2001年和2003年都是收录47种专业期刊，该刊影响因子在这两年中分别排在此类目第27位、第11位，可谓后起之秀。

中国期刊影响因子提高较快有以下原因：一是国家对科研投入大幅增长，科研创新条件改善，使高水平科研成果不断增多，从而投送到国内期刊上发表的高质量研究成果相应增加，期刊质量得以提高。二是经过各方面的努力，我国期刊编辑规范化程度和国际化程度有一定提高。三是SCI近年新增入选中国期刊较多，中国期刊的增多开始产生了一定的“协同效应”。四是部分期刊实现了印刷版、电子版并存发行的发展态势，提高了期刊的显示度和可获得性。五是不少期刊出版周期有所缩短，增强了时效性。六是中国期刊原有指标基数较低，在低指标基础上提高指标相对容易。

《世界胃肠病学杂志》等刊影响因子快速提升，除上述原因外，该刊编辑部的开放意识和网络技术帮了大忙。该刊在中国学术期刊中不仅建设了比较理想的期刊网站，还率先加入了美国国立医学图书馆(National Library of Medicine, NLM)的PubMed系统，通过PubMed系统为读者提供1998年以来的全文免费查阅和下载。随后又加入了Free Medical Journals免费查阅网站和Directory of Open Access Journals免费查阅网站，利用这些重要的期刊免费开放平台，广泛向全世界开放，让全世界同行不仅能检索到，还能免费下载使用其全文。编辑部紧跟时代步伐的开放意识、利用网络技术的能力和服务作者、服务读者的精神，为作者投稿、读者查阅下载极大地提供了方便，同时也赢得了期刊声誉、期刊显示度和利用率的明显提高。

中国学术期刊进步很大，但相比国际名刊还有不小差距。如2003年JCR中影响因子最高值为52.280；6907种来源期刊的平均影响因子值为1.592。显然中国期刊的发展仍是任重道远。国家科技部、自然科学基金委员会、中国科学院等科技管理部门和学术机构应继续支持中国学术期刊；各学科院士、学术带头人要积极关心中国学术期刊，为之献计献策，将自己高水平科研成果更多地投送到国内期刊上发表，使中国学术期刊获得进一步发展，取得更好的成效。

注：由The Journal Citation Reports on the Web直接从“Peopls R China”检索只有67种期刊。文中70种中国期刊是按我国通常采用的统计方法，计入了包含了由中国电子学会主办的《电子学报》(Chinese Journal of Electronics)、由中国化学学会主办的《高分子科学》(Chinese Journal of Polymer Science)及《亚洲天然产品研究杂志》(Journal of Asian Natural Products Research)3种在境外或国外出版的期刊。按67种期刊统计，其影响因子总值为38.022，平均值也为0.567。(科学时报 2004-06-24 赵基明)

抗乙型肝炎病毒的联合序贯治疗

李莉, 成军, 纪冬, 李梵, 藏红

李莉, 成军, 纪冬, 李梵, 藏红, 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
国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689, No.C39970674, No.C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No.98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

乙型肝炎(Hepatitis B)是一种致命性的肝脏疾病, 系感染 HBV 所致, 是世界上最常见的传染病之一, 在我国 HBV 感染率非常之高, 因此乙型肝炎的抗病毒治疗成为国内、外专家的研究热点, 且其进展很快。但由于单一药物治疗效果不佳, 抗乙型肝炎病毒的联合/序贯治疗已得到了专家们的共识。目前最常见的抗病毒药物仍为干扰素以及核苷类似物(如拉米夫定), 他们之间的联合应用可以取得较好的效果。

李莉, 成军, 纪冬, 李梵, 藏红. 抗乙型肝炎病毒的联合序贯治疗. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1656-1658

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1656.asp>

0 引言

病毒性肝炎临床抗病毒治疗研究进展很快, 已有一些较好的抗病毒药物及免疫调节药物在临床应用并取得一定效果, 传统医学在治疗领域中也发挥着重要作用。但抗病毒治疗效果尚不十分满意, 主要因为肝炎病毒为细胞内寄生和复制; 肝炎病毒, 如: 乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)等易发生变异; HBV DNA 可与宿主细胞染色体整合, 整合后的 HBV DNA 不易被抗病毒药物清除; HBV DNA 在复制过程中, 以共价闭环(ccc)DNA 作为复制模板, 而目前的抗病毒药物尚不能彻底清除 ccc DNA; 慢性乙型肝炎易形成人体免疫耐受, 对抗病毒药物治疗效果不佳。基于上述种种原因, 目前所应用的抗病毒药物只能抑制病毒的复制, 还不能从根本上清除病毒。尤其是单独应用某一种抗病毒药物。但是只要能清除复制的病毒就可能缓解炎症活动, 就可能停止向肝硬化、肝细胞癌进展, 这一点已取得专家们的共识。因此, 今后慢性病毒性肝炎抗病毒的治疗, 是在继续研制高效、低毒的抗病毒新药的前提下, 应用现有的抗病毒药物, 探索不同抗病毒药物一起使用的联合治疗(combined therapy)或先后使用的序贯治疗

(sequential therapy)是目前研究的主流方向^[1-7]。

1 联合/序贯治疗的目的和原则

1.1 联合/序贯治疗的目的 提高治疗有效率, 延迟耐药性的发生。目前大多数患者只能达到抗病毒的有限目标, 对慢性乙型肝炎抗病毒治疗, 目前还只能要求持续清除血液中的病毒复制标志物, 如 HBeAg, HBV DNA 和病毒聚合酶(DNAp)。HBeAg 转换伴血清 HBV DNA 消失(斑点杂交), 同时肝内病毒量明显减少, 复制型病毒消失, 随着病毒靶抗原的清除, 肝组织炎症缓解而血清 ALT 下降。干扰素 α (IFN- α), 以拉米夫定、阿地福韦、恩替卡韦为代表的核苷类似物, 以及胸腺素 $\alpha 1$ 为代表的免疫调节因子, 是目前临床上用于抗 HBV 治疗的主要药物, 这些临床上已经应用的抗病毒药在单独用药情况下, 都分别在部分(25-40%)患者中取得了不同程度的抗病毒治疗效果, 但不满意, 鉴于 HBV 与人免疫缺陷病毒(HIV)在分子生物学特性上有诸多相似之处, 不同作用机制的抗 HIV 药物组成所谓“鸡尾酒”疗法, 在抗 HIV 治疗中, 已经发挥了重要作用^[8]。而目前应用的抗 HBV 药物作用机制不尽相同, 因此完全有理由进行探索抗 HBV 的不同药物的一起作用的联合治疗, 或先后使用的序贯治疗, 增加治疗的有效率, 减少药物的耐药性, 以取得更好的抗病毒治疗效果。而且不同抗病毒药物的作用机制不同, 诱导病毒产生突变的形式也不同, 同时对多种抗病毒药物耐药的病毒, 其自身的复制、生存能力也明显下降, 因此联合/序贯用药具有明显的优越性^[9]。

1.2 联合/序贯治疗的原则 当前对于慢性病毒性肝炎联合/序贯抗病毒治疗, 虽已取得专家们的共识, 但由于国际、国内尚无统一方案, 因此联合/序贯抗病毒治疗存在很大的随意性, 导致联合/序贯用药的种类、剂量、疗程多种多样, 有些难以到达联合/序贯治疗抗病毒的目的, 使医生和患者面对多种组合而感到无所适从, 甚至造成一种错觉, 以为任何 2 种或 2 种以上抗病毒药一起使用即为联合治疗, 而只要联合就可能增加疗效, 忽略不恰当的联合可能对人体带来的潜在的影响和不必要的经济负担。因此在明确联合抗病毒治疗的目的前提下, 界定其原则尤为必要。联合/序贯抗病毒治疗的原则就是合理性, 即(1)最大限度的抑制病毒复制, 减少基因变异的机会; (2)提高机体抗病毒特异性免疫; (3)加强肝脏各种细胞, 包括肝实质细胞的抗病毒能力, 争取彻底清除体内残留肝炎病

毒, 防止复发, 达到根治目的. 因此考虑联合 / 序贯抗病毒的治疗之前, 应对被治疗的患者病原学诊断, 临床类型、病程、病情严重程度、药物作用机制、副作用等情况进行综合分析, 认真进行设计, 慎重决定和选择抗病毒药物, 谨慎严密制定有效的联合 / 序贯治疗方案^[10-11].

1.3 联合 / 序贯抗病毒治疗的策略 多靶点切断 HBV 复制途径. 根据药物抗 HBV 作用的不同靶点联合 / 序贯使用抗病毒药. 如: 理想的联合 / 序贯用药中每种药物的作用机制应是不同的, 因此可以选择抑制病毒核酸多聚酶活性, 抑制病毒 mRNA 的生成, 及能够结合病毒外壳抗原、整合和清除过多的抗原(如 HBsAg)等不同作用机制的抗病毒药联合. 增强机体的免疫功能. HBV 虽无直接致肝细胞病变的作用, 但可以诱发人体的免疫应答, 使肝细胞发生免疫病理, 引起炎症、坏死和纤维化病变. 因此用一些免疫调节剂激活细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)、自然杀伤(NK)细胞、淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞, 激活抗原特异的 B 细胞等, 改善宿主的抗病毒状态, 从而达到抑制 HBV 复制的目的^[12].

2 抗病毒药物的免疫治疗基础

肝炎病毒是导致病毒性肝炎肝脏病变的始动因素, 抗病毒治疗是当今病毒性肝炎治疗学中的研究热点, 因此抗病毒药的免疫治疗基础有助于联合 / 序贯用药的选择, 目前抗病毒治疗药有如下几类药: (1) 化学类药物, 主要有核苷类似物, 如: 阿糖腺苷, 单磷酸无环鸟苷, 泛昔泛韦, 拉米夫定, 还有非核苷类药物, 如膦甲酸钠、苏拉明等; (2) 生物类药物, 主要有干扰素及其诱导剂, 特异性转移因子、胸腺激素、免疫核糖核酸等; (3) 植物天然药物, 很多主要由苦参素、香菇多糖、云芝多糖、猪苓多糖、黄芪、苦味叶下珠等.

2.1 抗病毒药物的作用机制 这些抗病毒药物分别作用于病毒复制的不同时期和靶位, 产生抑制病毒复制的作用. 研究较多的仍然是干扰素和核苷类药物. 抗病毒药作用于病毒复制过程: (1) 黏附: 病毒感染宿主细胞首先通过病毒的外膜蛋白, 与宿主细胞膜上的相应受体结合, 使病毒黏附于细胞表面. 作用于这一环节的抗病毒药有: 病毒特异的中和抗体, 如免疫球蛋白、单克隆或多克隆抗-HBs 抗体, 常加干扰素 α 合用, 增加疗效. (2) 穿入: 病毒吸附于宿主细胞表面后, 通过细胞的胞饮作用, 病毒穿过宿主细胞膜, 进入细胞内. (3) 脱壳: 进入细胞中的病毒可脱去外壳, 使病毒核酸复制, 目前没有作用于穿入和脱壳过程的抗 HBV 的药物. (4) 生物合成: 病毒核酸(DNA 或 RNA) 可以复制、转录和翻译病毒蛋白, 作用此环节的抗病毒药有干扰素 α , 核苷类似物等, 非核苷类似物膦甲酸钠等. 这些药物抑制乙肝 HBV DNA 复制, 阻止肝内病毒感染健康的肝细胞. (5) 组装和释放: 病毒核酸和蛋白合成后, 可在宿主细胞内装配成新的病毒, 从细胞内释放到细胞外, 重新感染新的宿

主细胞. 清除含 HBV 的肝细胞, 只有通过细胞免疫才能完成, 干扰素 α 和胸腺素具有免疫调节作用, 能强化体内细胞毒性淋巴细胞和自然杀伤细胞的功能, 或促进感染了 HBV 的肝细胞表面人白细胞抗原-I(HLA-I)型抗原表达, 从而增强细胞免疫介导的肝细胞-病毒共死亡反应^[13].

从药物分子生物学看, 干扰素 α 作为一种糖蛋白, 不能直接灭活病毒, 他主要作用于细胞受体, 使细胞内产生抗病毒蛋白, 以阻断细胞内的病毒复制. 抗病毒的分子作用机制, 在于抑制病毒蛋白合成, 抑制病毒增强子的活性, 抑制病毒蛋白转录、装配和释放, 对 DNA、RNA 病毒均有效. 而核苷类药物, 除病毒唑抑制病毒 mRNA 合成, 抑制转录酶而抑制病毒, 其他均是抑制病毒逆转录酶, 乙肝病毒多聚酶活性, 达到抑制病毒复制. 但是乙肝病毒感染肝细胞, 乙肝病毒 DNA 进入肝细胞核并停留于此, 形成 ccc DNA, 作为稳定的宿主 DNA 存在, 不受核苷类似物、非核苷类似物影响, 不被干扰素 α 清除, 成为治疗后复发原因. 他们对于整合型的病毒难以发挥抗病毒作用. 在慢性 HBV 感染过程中, HBV 特异性的 TH2 细胞因子为主的反应, 有助于抗体产生, 但以白介素-2(IL-2) 为代表的 TH1 型细胞因子对病毒生活周期和宿主免疫反应的影响尚待进一步探讨.

2.2 机体的免疫应答状态 慢性肝炎的肝损害发病机制虽与进行性活动性病毒复制密切相关, 但先由宿主的免疫反应所决定. 因此, 联合 / 序贯治疗前要充分考虑机体的免疫应答状态. 宿主的免疫状态大致分为 4 类. (1) 免疫耐受类. 像乙型肝炎表面抗原携带者, 持续外周血 HBsAg 阳性, 机体对此无细胞增生或细胞毒反应, 因此打破机体免疫耐受状态成了这类患者的重要治疗环节. 用重组类似乙型肝炎病毒包膜抗原的模拟抗原或组建改变抗原递送途径的新型免疫原, 如: 治疗性疫苗, (核酸疫苗, DNA 疫苗). 激活免疫耐受, 从而打破宿主免疫耐受状态, 即可预防又可治疗. (2) 免疫抑制或免疫功能低下类. 如慢性乙型肝炎细胞免疫、体液免疫应答低下, 对促有丝分裂原植物血凝素(PHA)的细胞增生反应低下, 血清免疫球蛋白水平较低, 有时血清存在细胞免疫反应的抑制因子. 此类患者应全面提高特异性及非特异性免疫应答, 并尽可能及时观察免疫低下纠正的情况. (3) 自身免疫类. 可检测到自身抗体 (如抗核抗体、抗线粒体抗体、抗肝细胞抗体, 以及抗肝 / 肾微粒体抗体), 出现对人正常细胞的细胞免疫反应, 对这类患者应根据个体特异性采用降低免疫应答的方案, 如用肾上腺皮质激素, 同时采用抗病毒治疗, 抑制病毒抗原的表达, 对此类患者的治疗也有帮助. (4) 免疫复合物类. 血清中补体水平低下, 肝外组织中有免疫复合物沉积, 血清中也可发现免疫复合物, 伴有肝外其他脏器的免疫复合物沉积导致的疾病 (如肾病、关节病), 治疗时可短期应用激素, 辅以其他免疫调节因子, 对治疗会有裨

益,但慢性乙型肝炎患者病毒状态复杂,临床治疗中应对个体特异性进行综合评价。

3 联合/序贯抗病毒治疗方法的选择

在慢性乙型肝炎病毒感染治疗中,不是随意选两种抗病毒药结合即为联合治疗。根据抗HBV作用的不同位点联合/序贯抗病毒治疗是今后的发展方向,如不同种类核苷类似物的合用,或与干扰素 α 等抗病毒合用等。干扰素 α 适用于HBV DNA低水平,因此对高水平HBV DNA的患者,预先应用拉米夫定抑制HBV DNA,可望提高干扰素 α 疗效。另外,干扰素 α 的作用目标是已感染HBV的肝细胞,而拉米夫定仅能抑制HBV DNA,并不能清除肝细胞内HBV,二者联合理论上是合理的。单一核苷类似物,如拉米夫定、泛昔洛韦尚不足以清除多数慢性感染者的HBV,并可能诱导耐药病毒出现。联合应用不同的核苷类似物以提高疗效,降低耐药性出现。

近年来,抗HBV的核苷类似物的研究取得很大进展^[14-16],其抗病毒共同点:(1)迅速抑制病毒DNA的逆转录过程,对蛋白的合成影响较慢;(2)易于诱导DNA多聚酶的突变形成耐药性;(3)停药后易于复发。一些新型核苷类似药进入II期临床,显示良好前景。如阿地福韦,不仅抗病毒还有免疫调节作用,其优势是对拉米夫定等核苷类药耐药的病毒株具有抑制作用,恩替卡韦也对拉米夫定耐药病毒株有效。与干扰素 α 联合使用的效果有待研究。

当前已进入一个对慢性病毒性肝炎治疗的新时期,尤其是慢性乙型肝炎,目前采用抗病毒、免疫调节、改善肝功能和抗纤维化的综合治疗中,抗病毒治疗是最重要的治疗措施。由于抗病毒治疗存在着疗效不满意,容易复发等缺点,今后将针对不同抗病毒靶位和机制进行药物的联合/序贯治疗展开深入研究,把慢性病毒性肝炎的治疗提高到一个新的水平。

4 参考文献

- 1 Lewin S, Walters T, Locarnini S. Hepatitis B treatment: rational combination chemotherapy based on viral kinetic and animal model studies. *Antiviral Res* 2002;55:381-396
- 2 Leung N. Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:409-414

- 3 Ling R, Harrison TJ. Production of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in transfected cells is independent of surface antigen synthesis. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 6):1463-1467
- 4 Wang J, Zhu Q, Zhang T, Yu H. A pilot study on the combined therapy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and hepatitis B vaccine on chronic hepatitis B virus carrier children. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1824-1828
- 5 Deleaval P, Stadler P, Descombes E, Hecker E, Schrago G, Chizzolini C, Nicole A, Pugin P, Regamey C. Life-threatening complications of hepatitis B virus-related polyarteritis nodosa developing despite interferon-alpha2b therapy: successful treatment with a combination of interferon, lamivudine, plasma exchanges and steroids. *Clin Rheumatol* 2001;20:290-292
- 6 Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2002;36:1408-1415
- 7 Heijtkink RA, Janssen HL, Hop WC, Osterhaus AD, Schalm SW. Interferon-alpha therapy in chronic hepatitis B: early monitoring of hepatitis B e antigen may help to decide whether to stop or to prolong therapy. *J Viral Hepat* 2000;7:382-386
- 8 Kaufmann DE, Rosenberg ES. The value of preserving HIV-specific immune responses. *J HIV Ther* 2003;8:19-25
- 9 Saruc M, Ozden N, Turkel N, Ayhan S, Hock LM, Tuzcuoglu I, Yuceyar H. Long-term outcomes of thymosin-alpha 1 and interferon alpha-2b combination therapy in patients with hepatitis B e antigen (HBeAg) negative chronic hepatitis B. *J Pharm Sci* 2003;92:1386-1395
- 10 Li XM, Yang YB, Hou HY, Shi ZJ, Shen HM, Teng BQ, Li AM, Shi MF, Zou L. Interruption of HBV intrauterine transmission: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2003;9:1501-1503
- 11 Jaboli MF, Fabbri C, Liva S, Azzaroli F, Nigro G, Giovanelli S, Ferrara F, Miracolo A, Marchetto S, Montagnani M, Colecchia A, Festi D, Reggiani LB, Roda E, Mazzella G. Long-term alpha interferon and lamivudine combination therapy in non-responder patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B: Results of an open, controlled trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:1491-1495
- 12 Park SG, Kim Y, Park E, Ryu HM, Jung G. Fidelity of hepatitis B virus polymerase. *Eur J Biochem* 2003;270:2929-2936
- 13 Deres K, Rubsamen-Waigmann H. Development of resistance and perspectives for future therapies against hepatitis B infections: lessons to be learned from HIV. *Infection* 1999;27(Suppl 2):S45-51
- 14 Westland CE, Yang H, Delaney WE 4th, Gibbs CS, Miller MD, Wulfsohn M, Fry J, Brosgart CL, Xiong S. Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003;38:96-103
- 15 Huang YH, Wu JC, Chang TT, Sheen IJ, Lee PC, Huo TI, Su CW, Wang YJ, Chang FY, Lee SD. Analysis of clinical, biochemical and viral factors associated with early relapse after lamivudine treatment for hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients in Taiwan. *J Viral Hepat* 2003;10:277-284
- 16 Zoulim F, Trepo C. New antiviral agents for the therapy of chronic hepatitis B virus infection. *Intervirol* 1999;42:125-144

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

• 消息 •

马老师:您好!

最新一期(12期)的发表文章大致看了一遍,内容丰富海外来稿很多!英国、美国、希腊、匈牙利、巴西、土耳其等。不知您是如何约来海外稿件的?

关于网页提几点建议:(1)每篇文章后面有 Review, Add 功能,是发表意见栏(留言簿),对吗?把 Review(一般理解为综述)改为 Comments (to this article)为好。(2)more 点进去怎么一篇都没有?可能是还没有建好数据库,最好有正在建库等提示,以免误导。(3)全文 html 中图片仍为 PDF 链接,点击很慢,能否直接链接图片文件?这样更直观、方便。

以上意见仅供参考。上次去北京到您社里虽然时间匆忙,但从您的介绍中我们获益匪浅,希望能常联系。(吴民淑编辑 中国药理学报 2004-06-24)

肝源性糖尿病的治疗研究进展

李莉, 成军, 纪冬

李莉, 成军, 纪冬, 中国人民解放军第 302 医院感染四科 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院感染四科. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

我国肝源性糖尿病多继发于慢性肝炎, 肝硬化, 这类患者存在不同程度的肝损害, 治疗更要考虑周全, 综合治疗, 使血糖得到控制. 根据肝源性糖尿病的特点, 明确肝源性糖尿病的治疗目的和降低血糖的达标标准, 以便合理地进行综合治疗, 原则禁用口服降糖药, 尽量早用胰岛素, 除了药物, 目前对糖尿病的治疗已进展到胰腺移植, 胰岛细胞移植, 人工毛细血管装置的胰岛细胞移植, 还有对重型肝炎, 肝硬化实施肝移植, 这些是否适合肝源性糖尿病以及移植后一系列问题尚研究中.

李莉, 成军, 纪冬. 肝源性糖尿病的治疗研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(7):1659-1662

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1659.asp>

0 引言

各种肝病导致肝实质损害, 诱发糖代谢紊乱, 临床表现以高血糖, 葡萄糖耐量减低为特征^[1]. 这种继发于肝实质损害的糖尿病称之为肝源性糖尿病(hepatic diabetes), 属 II 型糖尿病但又与之有所不同. 其病因尚未完全阐明, 目前尚属不能根治. 治疗要兼顾肝损害和糖尿病两个方面, 其原则在治疗原发肝病的同时, 通过现代综合治疗, 使血糖得到控制. 因此, 医生要根据肝源性糖尿病的特点, 明确肝源性糖尿病的治疗目的和降低血糖的达标标准, 以便合理地进行综合治疗^[2].

1 肝源性糖尿病的特点和治疗目的

肝源性糖尿病发病机制主要是胰岛素抵抗, 随着病情发展也可以出现胰岛素分泌相对不足; 高胰岛素血症伴内源性胰岛素敏感性下降. 葡萄糖耐量试验(OGTT)减低, 其曲线形态偏高, 表现高峰、高坡或趋高型; 胰岛素释放试验, 高峰反应为主; C 肽释放实验正常, C 肽/胰岛素比值明显减少. 临床表现有的隐性, 有的显性, 症状轻重不等, 但典型的“三多”症状多不明显, 往往被慢性肝病症状所掩盖, 极少发生酮症酸中毒等

并发症^[3]. 肝源性糖尿病的治疗目的: 改善和保护肝功能, 降低高血糖, 缓解症状; 纠正脂代谢紊乱及其他代谢紊乱; 防治肝病及糖尿病各种急、慢性并发症的发生和发展, 降低死亡率; 通过教育, 使患者掌握自我监测, 自我保健的能力, 确保治疗达标^[4]. 肝源性糖尿病降糖治疗的达标标准: 餐后血糖 6.7-9.0 mmol/L; 餐后 2 h 血糖 6.7-12.0 mmol/L; 糖化血红蛋白 7.0-9.0%. 肝源性糖尿病降糖治疗控制标准(见表 1).

表 1 肝源性糖尿病降糖治疗控制标准

指标	控制标准		
	良好	临界	差
空腹血糖(mmol/L)	4.4-6.1	7.0	> 7.0
餐后 2 h 血糖(mmol/L)	4.4-8.0	10.0	> 10.0
糖化血红蛋白(%)	< 6.2	6.2-8.0	> 8.0
总胆固醇(mmol/L)	< 5.2	5.2	6.5
高密度脂蛋白 - 胆固醇(mmol/L)	> 1.1	1.1-0.9	< 0.9
甘油三酯(mmol/L)	< 1.5	< 2.2	2.2
低密度脂蛋白 - 胆固醇	< 2.5	2.5-4.4	> 4.5
体重指数(kg/m ²)			
男	< 25	< 27	27
女	< 24	< 26	26
血压(KPa)	< 17.3/10.6	21.3/12.6	> 21.3/12.6

¹ 控制良好是理想指标, 应因人而异, 老年肝源性糖尿病无必要达到.

2 肝源性糖尿病的治疗现状

目前肝源性糖尿病的治疗已经达到了一个新高度. (1) 积极合理治疗肝脏疾病, 通过修复肝细胞, 改善肝功, 恢复肝细胞膜受体的数目及受体结合的能力; (2) 进行肝源性糖尿病教育. 肝源性糖尿病是一种全身疾病, 坚持合理治疗是一项长期、细致和艰苦的过程, 需医生、患者及家属配合, 教育的目的是让患者对肝源性糖尿病的基础知识、特点以及饮食、药物治疗、自我监测和护理等有初步认识, 意识到治疗的终身性和长期性, 使其积极配合达到最佳的治疗效果; (3) 饮食治疗. 饮食治疗是糖尿病的基本疗法之一, 无论对哪一型糖尿病, 适当控制饮食, 都可减轻胰岛 β 细胞的负担, 有利病情控制. 即使需要药物治疗的糖尿病患者如忽视饮食, 单纯依赖药物也难以奏效. 糖尿病的饮食治疗原则从 18 世纪末即已存在, 但至今发生了很大变化, 自 1980 年代以来, 糖尿病膳食结构已转变为高碳水化合物、低脂

肪、低蛋白、高纤维素膳食,其中碳水化合物占总热量的55-65%,脂肪占总热量的20-30%,以不饱和和脂肪酸为主,蛋白质占总热量的10-15%,膳食纤维总量每日40-60g,胆固醇含量每日300mg,食盐每日6g,鼓励进食富含维生素及微量元素易于消化饮食。每日膳食总热量要根据患者体重、年龄、性别、有无并发症、工作性质、劳动强度而定。肝源性糖尿病的饮食治疗原则和原发性糖尿病相似,只是注意兼顾肝病及糖尿病两方面,如有食管静脉曲张的肝硬化患者,注意选用适宜的高纤维膳食的摄入,有肝性脑病,则限制蛋白质的摄入等;(4)运动疗法。运动疗法也是糖尿病的基本治疗之一,但是肝源性糖尿病由于存在肝细胞损伤,肝功能异常往往使此项治疗受到限制。一般鼓励进行适量的日常生活活动,活动时间不宜过长且在餐后30min后开始进行,餐后2h以后要保持相对安静。对轻、中度慢性肝炎,尤其较肥胖的患者,肝功能正常可以进行适量的运动^[6]。同原发性糖尿病一样也要制定运动处方,即以患者体力和耐力及肝功能为基础,制定符合本人状况的运动程序,包括运动种类、运动量、注意事项等。其益处不但降低血糖还能改善精神状态,提高生活质量^[6]。

3 降糖药临床应用进展

口服降糖药物是糖尿病治疗的重要手段,近90%的糖尿病患者均有可能接受口服降糖药治疗,包括肝源性糖尿病。虽然现在专家主张口服降糖药禁用于肝性糖尿病,但由于患者对胰岛素使用存在种种的误区和顾虑,所以临床仍有不少病例选择口服降糖药^[7]。

3.1 磺脲类(SU)制剂 所有磺脲类降糖药均是磺胺衍生物,是中等强度的降糖药。其作用刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素,减少肝糖输出。近年来还观察到某些磺脲类药物,如达美康、糖适平有刺激周围组织中受体、受体后作用,增加胰岛素受体的数目和亲和力,促进葡萄糖转运载体(Glut)向细胞膜转位,刺激葡萄糖激酶活性等。副作用:低血糖,中度增加体重,肝功能异常但发生率少不足2%,过敏反应如皮疹、红斑、搔痒、溶血性贫血等。骨髓抑制则非常少见。此类药的种类有:第一代:氯磺丙脲、甲磺丁脲(D860,甲糖宁),由于其严重的副作用,低血糖,肝功能损害等,目前基本淘汰。第二代:格列苯脲(优降糖、达安疗)、格列赫素、格列吡嗪(吡磺环己脲、美吡达、灭糖尿、瑞易宁或格列吡嗪控释片)、格列齐特(达美康、甲磺吡胺)、格列喹酮(糖适平、糖肾平)。第二代药物作用副作用小,成为磺脲类选用的主流,其降糖作用的强弱依次为优降糖>美吡达>达美康>糖适平。肝源性糖尿病患者原则上不适于使用此类药,因为从理论上讲SU制剂刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素,并不能很好控制肝源性糖尿病的血糖,同时还有可能引起肝损害。在实际工作中,当患者肝功正常或肝功能损害极轻,拒绝使

用胰岛素,以及存在胰岛素分泌相对不足的情况下,临床也有使用并取得一定疗效。因此,值得特别注意的是尽量选择对肝功影响小的SU制剂,如达美康、糖适平来治疗肝源性糖尿病,对重症肝炎、肝硬化晚期、肝功能衰竭的患者要避免使用。第三代:格列美脲(格列美脲),临床应用尚少,有待进一步使用观察^[8]。

3.2 双胍类降糖药物 双胍类降糖药物于本世纪50年代发现,引致了苯乙双胍和二甲双胍的广泛使用。但因为其可以引起严重的危及生命的乳酸中毒,1970年代除了中国和印度,大多数国家已停止使用苯乙双胍(降糖灵、苯乙福明),目前已极少应用基本淘汰。现在临床使用只有二甲双胍(甲福明、降糖片、格华止)。并在欧洲和亚洲已广泛应用许多年。该药降糖降脂减肥,其作用机制不十分清楚,目前认为主要通过降低肝糖产生、降低胃肠道对葡萄糖的吸收,增加肌肉组织、脂肪组织胰岛素受体的数目和给合力;促进葡萄糖载体向膜转运,增加外周组织对糖的摄取。尤其适合肥胖的II型糖尿病患者。副作用为恶心、食欲降低、腹泻,这些现象是暂时的,与食物同服可减少这些症状。本药最大的副作用是乳酸性酸中毒,发生的机率并不高,大多发生于肾功能不全或药物过量(>3g/d)的患者。肝源性糖尿病原则也是禁用。但临床对轻型肝损害的糖尿病仍在使用,如果应用也应避免在严重肝损害时使用,尤其避免用于肝硬化晚期,肝功衰竭和肾功不全的患者。对老年人也要谨慎用药。该药与其他降糖药联合用药,作用优于单独用药^[9]。

3.3 葡萄糖苷酶抑制剂 于1980年代上市,作用机制与磺脲类及双胍类均不同,通过抑制小肠黏膜刷状缘膜 α -葡萄糖苷酶,延缓碳水化合物在肠道吸收,从而降低餐后血糖。该药有防止胰岛 β 细胞疲劳,改善血糖控制的作用。第一个葡萄糖苷酶抑制剂有效成分为阿卡波糖(拜糖苹),他是生物合成的假性四糖。第二个葡萄糖苷酶抑制剂的有效成分为伏格列波糖(倍欣片),抑制小肠黏膜 α -葡萄糖苷酶的作用比阿卡波糖强,与其他降糖药物合用会有低血糖出现,单独应用则不会。此类药的副作用最常见的是腹胀、腹泻、排气过多,一般以2wk左右缓解,偶有腹痛、便秘、恶心,罕见过敏反应如皮疹、搔痒等。无症状ALT,AST等酶升高,该药与其他降糖药联合应用可有效降低餐后血糖,适合肝源性糖尿病空腹血糖正常,餐后血糖升高的患者。但失代偿肝硬化继发糖尿病常有消化吸收障碍,使用该制剂后在胃肠道不能较好发挥改善血糖控制的作用,腹胀加重。因有肝酶升高故有严重肝损害者慎用,转氨酶不超过正常2倍可小量使用,有恶化趋势则停用。肝功衰竭、重度肾功减退、有严重糖尿病并发症者则禁用^[10]。

3.4 促胰岛素分泌剂 瑞格列奈(诺和龙),1998年上市,是一新型口服非磺脲类抗糖尿病药物,对胰岛素的分泌有促进作用。是第一代餐时血糖调节剂,不直接刺

激胰岛素分泌, 不抑制胰岛素的生物合成, 而是通过关闭胰岛 β 细胞膜中ATP-依赖性钾通道, 使细胞内钙增加, 达到增加胰岛素分泌的效果, 是有效的一线单独治疗药, 适合所有II型糖尿病患者包括肥胖与非肥胖, 与二甲双胍合用比各自单独应用疗效好, 磺脲类药失效改用此药也能取得较好疗效. 副作用极少, 不引起肝、肾功能损害和严重低血糖, 偶有胃肠道反应, 过敏反应, 有中度肝脏与肾脏损害患者对此药有较好耐受性, 理论上较适合肝损害不重的肝源性糖尿病, 餐后血糖升高及胰岛素分泌相对不足的患者. 临床应用尚少, 其作用和副作用都有待进一步使用观察^[11-15].

3.5 胰岛素增强剂 指噻唑烷二酮(TZDs)衍生物, 又称格列酮. 1982年研究其降脂作用, 同时发现还有减肥降低血糖作用, 其作用机制是通过活化过氧化物酶增生活化因子受体 γ (PPAR- γ), 调控葡萄糖、脂肪代谢, 促进脂肪细胞分泌, 并直接影响增加胰岛素敏感性的许多过程, 如胰岛素受体激酶活性、胰岛素受体磷酸化过程、胰岛素受体数量, 达到降低血浆葡萄糖和胰岛素水平, 改善糖耐量, 保护胰岛 β 细胞的作用. 抗糖尿病的作用强弱顺序: 罗格列酮>曲格列酮>塞格列酮>恩格列酮. 该类药副作用: (1) 体重增加(等于或大于磺脲类药); (2) 水肿; (3) 严重肝损害. 因此目前曲格列酮均已退出市场. 肝损害的作用是否为TZDs类药共同作用, 有待进一步研究. 鉴于此肝源性糖尿病应禁用该类药^[16-18].

3.6 胰岛素 胰岛素自1922年用于临床以来已有80a的历史. 近几十年由于人胰岛素及胰岛素类似物问世, 以及注射技术、给药方法的不断改进, 胰岛素的应用已进入一个全新的时代. 到目前为止每个糖尿病患者都有使用胰岛素的机会, 而胰岛素亦适合任何一型糖尿病, 迄今无任何降糖药可以取代胰岛素在糖尿病治疗中的地位^[19]. 1970-1980年代成功合成人胰岛素, 一种是半合成人胰岛素, 以猪胰岛素等原料, 将其B链上30位的丙氨酸转换为苏氨酸而获得. 另一种是利用基因重组工程生物合成人胰岛素, 人胰岛素的优点: (1) 免疫原性大大降低, 胰岛素抗体的生成率30%以下, 故过敏反应和其他副作用少; (2) 效价强, 相应剂量降血糖作用比动物胰岛素增强30%左右; (3) 皮下注射吸收快, 但作用短于动物胰岛素. 目前胰岛素的给药途径和注射方法有很大改革, 可多种途径给药, 如肛栓, 腹膜内给药, 鼻吸入及肺吸入等, 但均因有刺激性, 吸收不规则而未被常规采用. 1970年代以来研制口服胰岛素, 用脂质体膜包被防止在胃部破坏, 但由于仍是吸收不规则, 个体差异大, 难以预计有效血药浓度及降糖效果, 目前未用于临床. 注射方法以皮下注射最广泛, 但注射工具有很大改进, 如一次性注射器, 胰岛素泵与胰岛素笔, 以胰岛素笔最简便实用, 近年还研制出压力喷雾注射器, 不但吸收快, 还避免常规注射的痛苦, 但尚未普及使用. 在胰岛素的应用和制剂选择方面, 目前对II型糖尿病使用胰岛素指征趋于积极态度, 采用短效加中效或长

效的各种组合注射方案, 尤其强化治疗方案常被临床使用, 现在认为强化治疗对防治糖尿病各种慢性并发症具有重要意义, 而被临床推崇使用. 预混制剂虽方便, 但缺点是无法分别调整各自剂量. 肝硬化时肝脏糖原贮量下降, 夜间低血糖, 以每列前注射短效型胰岛素较为合理^[20].

我国肝源性糖尿病多继发于慢性肝炎, 肝硬化, 虽然血浆中胰岛素水平升高, 但临床使用胰岛素仍然有效, 推测此类患者胰岛素是低生物活性, 仍需外源性胰岛素. 这类患者存在不同程度的肝损害, 一般主张尽早使用胰岛素, 而不用口服降糖药. 对较轻的患者通过饮食治疗和口服 α -葡萄糖苷酶可以较好抑制血糖. 医生在使用胰岛素之前应对各类胰岛素制剂的成分、来源、使用时间、含量要一清二楚, 尽量选用人胰岛素, 患者的饮食也一定要定时定量, 对治疗中密切监测血糖也要一丝不苟, 包括患者自测血糖, 因要根据所测血糖变化随时调整胰岛素剂量. 剂量使用的原则遵循由小到大. 每日胰岛素量超过200u, 提示体内产生胰岛素抗体, 一般在治疗3-4wk出现抗体, 随着时间延长抗体逐渐上升, 剂量越大越易产生抗体. 注意口服降糖药转换胰岛素, 二者用量之间无统一转换剂量可以参考^[21].

近年来, 一些胰岛素类似物问世. 1992年礼来公司用基因重组技术成功制造人胰岛素类似物称Lyspro, 具有与人胰岛素相同的生物活性, 也在短效、长效制剂, 其实用价值有待进一步观察. 动物实验还证明C肽具有血糖调节作用, C肽又称连接肽, 系胰岛素原在形成胰岛素过程中裂解产生的片段, 过去认为无生物活性. 现认为他降低血糖, 对胰岛素调节血糖有协同作用. 其降血糖的作用未完全阐明, 但他不依赖胰岛素受体和酪氨酸刺激, 不刺激升血糖激素分泌, 不易被肝摄取, 在血中清除较缓慢, 不影响胰岛素耐量, 还有一定的改善微循环、扩张小血管作用. 临床应用价值有待进一步研究^[22].

总之, 肝源性糖尿病降糖治疗, 原则禁用口服降糖药, 尽量早用胰岛素, 不但有效降低血糖, 还可有利肝细胞修复、肝功恢复. 但也有极少部分用胰岛素治疗无效的难治性病例. 除了药物, 目前对糖尿病的治疗已进展到胰腺移植, 胰岛细胞移植, 人工毛细血管装置的胰岛细胞移植, 还有对重型肝炎, 肝硬化实施肝移植, 这些是否适合肝源性糖尿病以及移植后一系列问题尚待研究.

4 参考文献

- 1 Sibley SD, Palmer JP, Hirsch IB, Brunzell JD. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslipidemia in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3379-3384
- 2 Iozzo P, Hallsten K, Oikonen V, Virtanen KA, Parkkola R, Kempainen J, Solin O, Lonnqvist F, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P. Effects of metformin and rosiglitazone monotherapy on insulin-mediated hepatic glucose uptake and their relation to visceral fat in type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:2069-2074

- 3 Dhahbi JM, Mote PL, Cao SX, Spindler SR. Hepatic gene expression profiling of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2003;5:411-420
- 4 Edvardsson U, von Lowenhillem HB, Panfilov O, Nystrom AC, Nilsson F, Dahllof B. Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators. *Proteomics* 2003;3:468-478
- 5 Link JT. Pharmacological regulation of hepatic glucose production. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4:421-429
- 6 Lam TK, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E863-E873
- 7 Gaskin DA, Bondona NC, Williams NP. Hepatic abscesses at the University Hospital of the West Indies. A 24-year autopsy review. *West Indian Med J* 2003;52:37-40
- 8 McGuinness OP, Cherrington AD. Effects of fructose on hepatic glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:441-448
- 9 Clark JM, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *JAMA* 2003;289:3000-3004
- 10 Schalinske KL. Interrelationship between diabetes and homocysteine metabolism: hormonal regulation of cystathionine beta-synthase. *Nutr Rev* 2003;61:136-138
- 11 Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003;300:1574-1577
- 12 Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, Matsumoto K, Saeki A, Yanagi K, Abiru S, Nakagawa Y, Shigeno M, Miyazoe S, Ichikawa T, Ishikawa H, Nakao K, Eguchi K. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 2003;97:3036-3043
- 13 Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, Li R, Li X, Ohzeki T, Friedman TC. Leptin activation of corticosterone production in hepatocytes may contribute to the reversal of obesity and hyperglycemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Diabetes* 2003;52:1409-1416
- 14 Shah P, Basu A, Rizza R. Fat-induced liver insulin resistance. *Curr Diab Rep* 2003;3:214-218
- 15 Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 2003;423:550-555
- 16 Iozzo P, Hallsten K, Oikonen V, Virtanen KA, Kempainen J, Solin O, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P. Insulin-mediated hepatic glucose uptake is impaired in type 2 diabetes: evidence for a relationship with glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2055-2060
- 17 Shen L, Fan JG, Shao Y, Zeng MD, Wang JR, Luo GH, Li JQ, Chen SY. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey. *World J Gastroenterol* 2003;9:1106-1110
- 18 Wiegman CH, Bandsma RH, Ouwens M, van der Sluijs FH, Havinga R, Boer T, Reijngoud DJ, Romijn JA, Kuipers F. Hepatic VLDL production in ob/ob mice is not stimulated by massive de novo lipogenesis but is less sensitive to the suppressive effects of insulin. *Diabetes* 2003;52:1081-1089
- 19 El-Agroudy AE, Bakr MA, Shehab El-Dein AB, Ghoneim MA. Death with functioning graft in living donor kidney transplantation: analysis of risk factors. *Am J Nephrol* 2003;23:186-193
- 20 Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Maccioni D, Antonini TM, Alessandri C. Non-alcoholic fatty liver syndrome: a hepatic consequence of common metabolic diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:588-594
- 21 Friedenber F, Pungpapong S, Zaeri N, Braitman LE. The impact of diabetes and obesity on liver histology in patients with hepatitis C. *Diabetes Obes Metab* 2003;5:150-155
- 22 Graham DJ, Green L, Senior JR, Nourjah P. Troglitazone-induced liver failure: a case study. *Am J Med* 2003;114:299-306

《严重急性呼吸综合征(SARS)基础与临床》出版

《严重急性呼吸综合征(SARS)基础与临床》一书是由第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心聂青和博士主编,国内20余名高等院校、科研机构从事SARS一线临床、科研、防疫专家学者们共同编写。承蒙著名呼吸病学专家、中国SARS防治首席科学家钟南山院士及著名传染病专家姜素椿教授为本书赐序。编写者在总结分析现有文献的基础上,将自己战斗在SARS一线成功救治、预防、研究SARS丰富、宝贵的亲身实践经验及体会无私地奉献给读者。本书是在“后SARS时代”编写的一部SARS学术专著,全书从理论到实践全面系统地将SARS研究加以论述(76万字、28章),内容包括系统理论、临床、实验、预防及心理五个部分,专业涉及传染病学、呼吸病学、危重急救医学、儿科学、微生物学、免疫学、分子生物学、生物化学、流行病学、医学检验、放射医学、心理学、护理学及预防医学等学科。本书基础临床并重,广泛论及SARS方方面面,兼顾不同学术观点,内容丰富、信息量大,集系统性、先进性、科学性和实用性于一身,反映了SARS研究的最新进展。书末附有SRAS患者胸片、CT片、病理及病原学照片等极其珍贵的原始影像学资料百余幅。另将SARS重要网站、官方文件汇总、SARS大事记、SARS常见问题解答以及SARS患者X线胸片及CT片400余张等内容制作光盘一并出版,使这套作品内涵延伸、新颖、可读性强。可作为医务人员、科研工作者,尤其是传染科、呼吸科、儿科、急诊科、放射科及卫生防疫人员的常备读物,也可作为其它临床科室、医学检验、心理学、护理学、实验动物学等工作者的参考书。同时也为生物医学类大学生、研究生的学习提供一本全新的参考教材。

《严重急性呼吸综合征(SARS)基础与临床》一书已由高等教育出版社(北京)2004年1月出版(全书760千字,28章,大16K精装本,定价48.60元含光盘)。

乙型肝炎治疗的新靶点与新方法

曲建慧, 张玲霞, 成军, 辛绍杰

曲建慧, 张玲霞, 成军, 辛绍杰, 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 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

抗病毒治疗一直是乙型病毒性肝炎治疗过程中的重要环节,但目前所用的抗病毒治疗措施均有其局限性.寻找新的、有效的抗病毒治疗措施应从病毒的生命周期、机体的免疫反应出发,以达到抑制病毒复制以至清除病毒的目的.基因治疗方法也正处于研究阶段.本文就目前乙型病毒性肝炎的抗病毒治疗及其进展方面作一阐述.

曲建慧, 张玲霞, 成军, 辛绍杰. 乙型肝炎治疗的新靶点与新方法. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1663-1666

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1663.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)在慢性乙型肝炎(CHB)患者体内的持续复制,可以导致不同程度的肝内炎症,而且与肝硬化和肝细胞癌(HCC)的发生密切相关.HBsAg疫苗的广泛应用,在一定程度上能够安全有效地预防HBV感染,降低了感染的发生率^[1],而对于慢性HBV感染者,应用抗病毒化学药物治疗,在抑制病毒活跃复制、阻止威胁生命的肝脏疾病的发展方面也展现了良好的前景^[2].有效地进行抗病毒治疗,可以诱导疾病缓解,阻止肝硬化进程,防止出现肝衰竭和/或肝细胞癌的严重后果.HBV感染的肝细胞与宿主免疫反应之间复杂的相互作用极大地影响着疾病的临床过程,因而影响了临床处理策略.目前所用的抗病毒治疗主要是通过干预病毒复制过程或者针对宿主抗病毒的不同环节,达到抵抗病毒、保护机体的作用,但任何治疗方法都有其应用的局限性,使HBV感染始终是困扰人们的难题,寻找新的有效治疗药物也一直是人们不懈追求的目标.

目前只有干扰素 α (IFN α)、拉米夫定、阿德福韦(ADV)是获批准的治疗CHB的药物.在HBeAg阳性和HBeAg阴性的CHB患者,这些药物治疗具有相似的短期作用与有限的长期效应,因此,需要寻找新的治疗措施,以克服他们所存在的局限性.最近几种新的抗

HBV复合物正在评估之中,其中包括恩替卡韦, emt-ricitabine(LMV的5-氟衍生物), clevudine(L-FMAU)以及其他的L-核苷例如L-脱氧胸腺嘧啶(L-dT).

另外,某些免疫调节剂,例如白介素-2(IL-2)、干扰素 γ (IFN γ)、胸腺素 α 、疫苗等的治疗效果尚有争议^[3-4];DNA疫苗治疗方法,虽然理论上似乎很有吸引力,但在临床应用方面却没有更大的进展^[4-5];两种聚乙二醇化的干扰素,PEG-IFN α -2b、PEG-IFN α -2a,是治疗慢性HCV的较有前途的药物,最近已经应用于慢性乙型肝炎的治疗.将来以上这些方法的发展会为临床工作者提供更多的治疗选择.

1 病毒的生命周期

要确认潜在的抗病毒靶点,理解HBV生命周期是很关键的.成熟的HBV病毒颗粒由整合了病毒表面蛋白的脂质双层包绕核粒核心组成.核粒内部是结构紧凑、呈松弛环状结构的3.2 kb的部分双链DNA基因组,具有重叠的开放读码框架(ORF),分别编码HBsAg(L, M, S), HBcAg, HBeAg, 聚合酶和X蛋白.

HBV的复制始于病毒与肝细胞表面的受体黏附,介导病毒进入细胞,脱去核衣壳,转移至细胞核,松弛环状基因组通过宿主细胞机制转化成cccDNA,这个复制中间体是产生各种HBV RNAs的转录模板,包括前基因组RNA(pgRNA),为病毒复制所必须,也是有效治疗、控制CHB的主要障碍.3.5 kb的pgRNA的转录发挥三方面的作用:(1)其翻译可以产生核心蛋白与聚合酶蛋白;(2)参与核粒包装反应,其特异性由一个特殊的位于pgRNA的5'-和3'-末端的称为 ϵ 的茎-环-茎结构所决定,宿主蛋白例如Hsp90可以稳定这种pol- ϵ 的相互作用^[6].顺式翻译的核心蛋白在pgRNA-pol复合物周围形成二聚体,自我排列形成病毒核粒;(3)一旦装配成核粒,pgRNA即发挥逆转录模板的作用:聚合酶蛋白结合至5'- ϵ -结构,作为自身引物起始并合成负链DNA的前3个核苷酸,新生DNA再转位到pgRNA的3'-末端,结合至12 nt的DR1互补序列,负链DNA在此继续合成,聚合酶蛋白的RNA酶H活性使模板pgRNA降解.这个RNA寡聚体转移至12 nt重复的DR2,开始合成正链DNA.正链DNA从负链DNA的5'-末端延伸,出现了第3条链转换.这由在负链DNA模板的一个短的富余片段所促进,这个片段与正链DNA 5'-末端的富余片段退火,因而使基因组环化^[7].聚合酶蛋白对正链DNA合成的成熟前终止引起特征性的部分双链

基因组. 含有部分 dsDNA 的 HBV 核粒或者循环回核, 增加 cccDNA 的供应, 或者在内质网和高尔基体进一步组装. 成熟的病毒粒通过组成型分泌途径从细胞中运出.

2 宿主对 CHB 感染的反应

急、慢性 HBV 感染导致的肝脏疾病主要是由免疫反应介导, 理解对 HBV 免疫反应的复杂性与多样性, 具有免疫治疗意义. HBV 感染的动物模型例如 HBV- 感染猿、HBV 转基因鼠的应用, 对于研究免疫反应与肝脏疾病、病毒的控制与清除方面具有重要意义^[8-9], 但是, 动物模型的应用尚存在一定的局限性, 尤其在 HBV- 转基因鼠模型中, 缺乏 cccDNA 的产生与加工等关键的 HBV 复制事件.

HBV 感染的过程受到免疫反应强烈程度的影响. 感染早期、固有的和调节性免疫反应对于 HBV 的清除是很关键的. 抗原提呈细胞, 尤其是树突状细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞, 在刺激 CD4⁺ 辅助性 T 细胞、CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞以控制肝内 HBV 复制中起着重要的作用. 根据所分泌细胞因子的不同, 这些细胞可分为 Th1 与 Th2 细胞, 诱导原发性细胞介导的免疫反应. Th1 细胞主要产生 IL-2, Th2 主要产生白介素 -4(IL-4)、白介素 -5(IL-5)和白介素 -10(IL-10), 触发体液免疫反应以产生抗体. 当 Th1、细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)细胞都活化, 并对病毒包膜、聚合酶、核心蛋白产生多特异性抗体, 可达到对 HBV 的清除^[10]. 主要活化 Th2 细胞以产生抗体的免疫反应可能会导致 HBV 感染的持续, 因此, T 细胞亚群的不一致性可能是导致新生儿与成人急性感染过程中, HBV 持续存在的原因之一.

一般认为, HBV 清除是通过 CTL 活化的穿孔素或 Fas- 依赖性途径的细胞因子介导的对 HBV 感染细胞的破坏, 而现在有新的观点强调了细胞因子介导的非溶细胞性 HBV 清除^[9]. 在急性 HBV 感染的猿猴与 HBV 转基因鼠的研究中发现, 细胞因子, 主要是肿瘤坏死因子 α (TNF α), IFN γ 和 IFN α/β , 可以不必杀死肝细胞而抑制 HBV 复制; 在转基因鼠模型中诱导这些细胞因子, 能够至少干扰 HBV 生命周期的两条途径: HBV RNA 的转录后降解以及清除含有 pgRNA 的非成熟核粒, 导致 HBV 核心蛋白的翻译后缺失^[10]. IFN α/β 可能活化与 dsRNA- 依赖的蛋白激酶(PKR)和 dsRNA- 依赖的 2' 5' - 寡腺苷酸合成酶有关的两条细胞路径, 对双链 RNA 蛋白激酶(PKR)的诱导可能导致 HBV 蛋白合成的抑制, 而对 2', 5' - 寡腺苷酸合成酶的诱导活化了 RNase L 以降解 HBV RNA. IFN α/β 和 IFN γ 可诱导细胞基因的转录改变^[11]. 但是, 这些细胞因子诱导的作用于 HBV 复制的“分子抗病毒”的意义还不明确.

通过转基因鼠研究, 逐渐阐明了 HBV RNA 转录后降解的基本分子基础^[9]. 研究表明, 在 TNF α 和 IFN 被诱导后的病毒 RNA 降解过程中, 细胞蛋白 -La 蛋白,

发挥着一定的作用. 在 HBV 中, 这种蛋白特异地结合一个在病毒 RNA 内的位于转录后调节元件的茎 - 环结构 5' - 末端, 可能介导 HBV RNA 的核移出. 最近研究表明, La 蛋白上的特异性 HBV RNA 结合点可能是潜在的抗病毒靶点. 目前, 尚不了解在 CHB 患者中控制 HBV 复制的非溶细胞过程的免疫反应. 从临床应用角度, 面对的挑战应该是建立免疫治疗方案, 克服少数炎症细胞浸润或肝细胞坏死的 T- 细胞低反应性^[12-13], 开拓非溶细胞的 HBV 从肝细胞中清除过程.

3 新治疗靶点

HBV 生命周期表明, 除了逆转录过程, 多数病毒过程依赖于宿主细胞机制, 其中最重要的是 cccDNA 的产生与持续存在. 传统的病毒 DNA 合成抑制物例如核苷类似物能够阻止或降低 cccDNA 新分子的产生, 但是, 成功清除已存在嗜肝 cccDNA 只能通过非细胞溶解的 Th1 免疫反应或通过免疫介导的细胞杀伤作用^[14-15]. 另外, 核苷类似物治疗 CHB 还能够(部分)恢复(特异性)免疫反应, 这一点很重要, 这对于介导宿主对感染的持久控制是必要的^[16]. 总之, 成功治疗 CHB 的重点是集中到抗病毒与免疫调节方法治疗两方面内容上.

3.1 小分子抑制剂 核苷/核苷酸类似物是聚合酶抑制剂, 通过细胞激酶代谢成三磷酸形式, 能选择性或竞争性抑制病毒聚合酶的催化作用; 类似物的整合(如 LMV 和 ADV)也可以导致新生病毒基因组的链终止; 另外, 由于在 HBV 负链 DNA 的引物序列的核苷酸是 5' - GAA - 3', 因而嘌呤核苷类似物能抑制聚合酶的引物活性^[6-7, 17]. 许多核苷/核苷酸类似物在 CHB 中的应用已得到检验, 例如拉米夫定、阿德夫韦、恩替卡韦、LY582563、MIV-210 等.

最近发现另外几种复合物具有 HBV 抑制的机制, 但与病毒聚合酶不相关. 第 1 种是苯丙酰胺衍生物: AT-61 和 AT-130. King et al^[18]表明 AT-61 并不影响总 HBV RNA 的产生或 HBV DNA 聚合酶的活性, 但确实能明显降低核壳化的 RNA. 重要的是, AT-61 和 AT-130 对于野生型和多种不同 LMV- 抗性株具有同样的抗病毒活性^[19]. Feid et al^[20]应用能够顺式包装 HBV RNA 的重组杆状病毒系统和一个能够反式包装 HBV 核心蛋白的表达载体系统观察了 AT-130 的作用机制: 体外研究表明, AT-130 明显抑制了核壳化 HBV RNA 的产生, 但对于总 HBV RNA 没有作用, 也并不影响核心蛋白或核粒的产生, 表明其本身能够干扰核壳化过程, 其机制可能是通过空间抑制或者与宿主细胞伴随蛋白例如 Hsp90 相互作用. 苯丙酰胺不是水溶性的并具有极低的生物利用度, 成功地发展成抗病毒药还需要克服其潜在的毒性和药物化学事件. 但是, 这些发现证明了野生型与药物抗性 HBV 能够非依赖于病毒聚合酶而被选择性地抑制复制水平明显抑制.

体内、外实验还表明, 另一组复合物, 异芳基二

氢嘧啶(HAP),也是潜在的HBV复制的非核苷抑制剂^[21],HAP复合物由Bayer公司发现,包括的候选分子有Bay41-4109及其同种物Bay38-7690、Bay39-5493.受Bay41-4109作用的HBV感染细胞,通过抑制病毒核粒的形成导致核心蛋白的降解增加,在HBV转基因鼠中也发现这些HAP复合物具有抗HBV的作用^[21].这种新的作用机制和高度特异性的抗病毒作用表明,HAP复合物可能会进入将来的临床研究.第3种复合物,LY582563,是一种2-氨基-6-芳硫-9-磷甲氧乙基嘌呤双酯,一种新的核苷类似物,磷甲氧乙基嘌呤的衍生物,其结构类似于ADV.这种复合物具有极好的抗HBV活性和较低的毒性^[22],对于具有LMV-抗性的HBV也是有效的,其作用机制及早期临床正在研究之中.

3.2 基因治疗方法 基因治疗是将新的基因材料导入靶细胞中,以产生对宿主细胞的治疗作用.抗病毒基因治疗策略如核酶、反义寡核苷酸、干扰肽或蛋白、治疗性DNA疫苗已经被研究用于CHB的分子治疗.而且,治疗或阻止CHB相关肝硬化或肝癌的分子策略也正在研究之中^[5,23].一种新的分子治疗方法是siRNA.RNA干扰是一种序列特异性的基因沉默的细胞过程,小双股RNA靶向一个同源序列,通过细胞核酶使之裂解^[24].大约22 nt的siRNA导入哺乳动物细胞,能够导致细胞mRNAs特异性地沉默,而没有由长双股RNA激活所诱导的非特异性的干扰素反应,这种方法已经在细胞培养中成功地用于HBV和HCV复制子RNA^[25].siRNA分子可以显著降低病毒特异性蛋白表达和RNA合成,并且这些抗病毒作用非依赖于IFN. siRNA以及传统的基因治疗,虽然是很有前途的治疗方法,但在基因传递、稳定性、毒性、抗性以及安全性等方面仍有很多问题有待解决.

3.3 免疫调节治疗 免疫调节治疗的目的是刺激宿主HBV-感染细胞的免疫反应而清除病毒感染. IFN α 和胸腺肽 α ^[4-5]已经用于临床,本文强调其他对治疗CHB有用的免疫调节药物.白介素-12(IL-12)与白介素-18(IL-18)由活化的巨噬细胞和树突状细胞分泌. IL-12通过促进Th1细胞反应在调节免疫系统中发挥重要作用^[26].在IL-12存在的情况下,IL-18能够作用于Th1细胞、NK细胞和树突状细胞,诱导IFN γ 的产生^[26-27].在HBV转基因鼠的研究中表明,IL-12可能通过局部诱导淋巴细胞分泌IFN γ , IFN α/β 和TNF α 而发挥间接抗病毒作用,下调了肝内、外病毒的复制.在应用IFN α 治疗患者中的观察表明,在IFN- α 应答者中,IL-12以及IL-2, IFN- γ 的水平明显高于无应答者^[28].最近,IL-12在CHB中的I/II期研究表明,剂量0.25与0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,治疗12 wk,血清HBV DNA显著降低,但是其总的抗病毒作用低于IFN α 或LMV.研究表明,短期的IL-12治疗是安全的,副反应与IFN α 相似.在转基因鼠的研究中, Kimura et al^[27]表明IL-18通过IFN γ 、IFN α/β

介导的非细胞病理过程,抑制了肝内HBV复制,这些结果也说明IL-18能协同IL-12抑制HBV复制,表明联合给予IL-18和IL-12对CHB是有治疗作用的.

在病毒感染中,树突状细胞作为抗原递呈细胞,对于刺激调节性免疫方面发挥重要作用.他们刺激CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞,产生影响Th1/Th2免疫平衡的细胞因子^[29].除了抗原递呈功能,激活的成熟树突状细胞还能分泌许多Th1和Th2型细胞因子,如IFN α/β , TNF α , IL-1, IL-8和IL-12等. HBV感染时,树突状细胞在影响Th1、Th2反应中的有关资料还很有限,树突状细胞功能的损伤可能导致HBV慢性化^[28-30].有趣的是,树突状细胞虽然是免疫反应的刺激剂,但另一方面他又能通过T-细胞无反应性或T细胞排除诱导免疫耐受性,其介导的耐受性尚不完全了解,而且这些细胞是否能够导致新生儿耐受而引起HBV感染持续尚需进一步探讨.近年来,树突状细胞在处理免疫反应的效应方面已有临床研究:体外培养树突状细胞并用抗原(如重组肿瘤与病毒抗原)刺激,然后自体转输,作为几种临床实验的免疫治疗^[31],但树突状细胞在CHB免疫治疗中的作用尚不成熟,应用合适的HBV蛋白激活树突状细胞、克服免疫耐受、诱导多种对HBV的特异性免疫需要深入研究^[32-33].

目前,长期抗病毒治疗所致HBV耐药株的出现以及治疗后较低的持续/长期应答率,是HBV治疗中两个棘手问题,也给我们提出了新的挑战. HBV发病机制的深入研究以及新免疫治疗方法的发现,可能会提供一些有用的方法.另外,在CHB治疗中,目前还不清楚是单独应用核苷/核苷酸类似物治疗,还是应该在核苷/核苷酸类似物基础上加用免疫调节剂,这需要进行深入的临床研究.在将来的应用中,也有可能进行三联药物治疗,例如两种核苷/核苷酸类似物联合应用PEG-IFN等.同时,新的抗-HBV药物的产生,包括非核苷类似物,例如病毒包装抑制剂、免疫治疗(如树突状细胞疫苗),将来对CHB治疗可能会获得良效.

4 参考文献

- 1 Kane M. Global status of hepatitis B immunization. *Lancet* 1996;348:696
- 2 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003;23:47-58
- 3 Delaney WE 4th, Locarnini S, Shaw T. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antivir Chem Chemother* 2001;12:1-35
- 4 Delaney W 4th, Bartholomeusz A, Locarnini SA. Evolving therapies for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:169-187
- 5 Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:761-785
- 6 Hu J, Toft D, Seeger C. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J* 1997;16: 59-68
- 7 Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication-an update. *J Viral Hepatitis* 1996;3:217-226

- 8 Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825-829
- 9 Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91
- 10 Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2000;74:4165-4173
- 11 Wieland SF, Vega RG, Muller R, Evans CF, Hilbush B, Guidotti LG, Sutcliffe JG, Schultz PG, Chisari FV. Searching for interferon-induced genes that inhibit hepatitis B virus replication in transgenic mouse hepatocytes. *J Virol* 2003;77:1227-1236
- 12 Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Grner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999;116:650-657
- 13 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- 14 Guo JT, Zhou H, Liu C, Aldrich C, Saputelli J, Whitaker T, Barrasa MI, Mason WS, Seeger C. Apoptosis and regeneration of hepatocytes during recovery from transient hepadnavirus infections. *J Virol* 2000;74:1495-1505
- 15 Kajino K, Jilbert AR, Saputelli J, Aldrich CE, Cullen J, Mason WS. Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. *J Virol* 1994;68:5792-5803
- 16 Boni C, Bertolotti A, Penna A, Cavalli A, Pilli M, Urbani S, Scognamiglio P, Boehme R, Panbianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998;102:968-975
- 17 Lanford RE, Notvall L, Beames B. Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells. *J Virol* 1995;69:4431-4439
- 18 King RW, Ladner SK, Miller TJ, Zaifert K, Perni RB, Conway SC, Otto MJ. Inhibition of human hepatitis B virus replication by AT-61, a phenylpropenamide derivative, alone and in combination with (-) beta-L-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3179-3186
- 19 Delaney WE 4th, Edwards R, Colledge D, Shaw T, Furman P, Painter G, Locarnini S. Phenylpropenamide derivatives AT-61 and AT-130 inhibit replication of wild-type and lamivudine-resistant strains of hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3057-3060
- 20 Feid J, College D, Sozzi T. The phenylpropenamide derivative AT-130 inhibits HBV replication at viral encapsidation and packaging. *Hepatology* 2002;36:300A
- 21 Deres K, Schroder CH, Paessens A, Goldmann S, Hacker HJ, Weber O, Kramer T, Niewohner U, Pleiss U, Stoltefuss J, Graef E, Koletzki D, Masantschek RN, Reimann A, Jaeger R, Gross R, Beckermann B, Schlemmer KH, Haebich D, Rubsamen-Waigmann H. Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science* 2003;299:893-896
- 22 Kamiya N, Kubota A, Iwase Y, Sekiya K, Ubasawa M, Yuasa S. Antiviral activities of MCC-478, a novel and specific inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2872-2877
- 23 Branch AD. A hitchhiker's guide to antisense and nonantisense biochemical pathways. *Hepatology* 1996;24:1517-1529
- 24 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251
- 25 Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:235-240
- 26 Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001;19:423-474
- 27 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002;76:10702-10707
- 28 Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1997;99:3025-3033
- 29 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
- 30 Beckebaum S, Cicinnati VR, Dworacki G, Muller-Berghaus J, Stolz D, Harnaha J, Whiteside TL, Thomson AW, Lu L, Fung JJ, Bonham CA. Reduction in the circulating pDC1/pDC2 ratio and impaired function of ex vivo-generated DC1 in chronic hepatitis B infection. *Clin Immunol* 2002;104:138-150
- 31 Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 2001;7:761-765
- 32 Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, Chisari FV. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1998;161:4520-4529
- 33 You Z, Huang XF, Hester J, Rollins L, Rooney C, Chen SY. Induction of vigorous helper and cytotoxic T cell as well as B cell responses by dendritic cells expressing a modified antigen targeting receptor-mediated internalization pathway. *J Immunol* 2000;165:4581-4591

World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求。WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用。WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切。北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订。WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美。

拉米夫定在免疫受损慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗中的应用

纪冬, 成军, 董菁, 王建军

纪冬, 成军, 董菁, 王建军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

HBV 感染是重要的传染病, 对于抗 HBV 的治疗显得尤为重要, 但在慢性 HBV 感染患者当中, 有许多合并其他疾病, 对于需要运用免疫抑制剂或疾病本身就产生免疫抑制的免疫受损宿主来说, 在使用免疫抑制剂的同时, 有可能使得 HBV 再激活, 从而出现肝炎的症状, 治疗更加棘手。拉米夫定可以迅速降低血清中 HBV 水平, 无论免疫抑制的种类, 包括肿瘤、器官移植、AIDS 患者等, 且可以应用于对干扰素难以耐受的患者, 在免疫受损宿主慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗中具有非常重要的地位。

纪冬, 成军, 董菁, 王建军. 拉米夫定在免疫受损慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1667-1669
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1667.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染在中国为 5-18%, 明显高于其他地区。由于乙型肝炎疫苗的使用, 在儿童中明显降低了慢性 HBV 感染和肝癌(HCC)的发病率, 但由于存在着大量的 HBV 表面抗原(HBsAg)携带者, 他们发展为恶性肝脏疾病的可能性仍然非常的高, 因此通过有效的治疗来减少肝硬化、肝癌的发病率、死亡率尤为重要^[1-3]。在慢性乙型肝炎患者当中, 有许多都合并其他疾病, 如需要运用免疫抑制剂或疾病本身就产生免疫抑制的免疫受损宿主(immunocompromised host)来说, 在使用免疫抑制剂的同时, 有可能使得 HBV 再激活(reactivation of HBV), 从而出现肝炎的症状, 治疗显得更加棘手。拉米夫定(lamivudine)是第一个用于临床的抗 HBV 的核苷类似物药物, 在慢性乙型肝炎的抗病毒治疗过程中具有重要地位, 他可以抑制 HBV 逆转录酶, 有效的减少急、慢性乙型肝炎的 HBV 病毒血症, 使

用拉米夫定治疗 1 a 后, HBeAg 血清转换率可以达到 18%^[4-5]。现就拉米夫定在免疫受损慢性乙型肝炎治疗中的应用作一综述。

1 免疫受损宿主及 HBV 再激活

免疫受损宿主概念的提出是在 20 世纪后期, 指的是患有免疫缺陷性疾病的患者或使用细胞毒性或免疫抑制剂药物的患者。一般包括: 肿瘤、器官或组织移植而需使用免疫抑制剂治疗的患者以及人类免疫缺陷性病毒(HIV)感染者^[6]。免疫受损宿主的免疫功能发生慢性损害, 使他们具有高风险的机会性或非机会性感染。

HBV 再激活指的是慢性 HBV 感染患者合并其他疾病而使用细胞毒性或免疫抑制剂治疗期间出现的 HBV 复制, 可以导致肝细胞连续性坏死及肝功能进行性的下降, 最终产生程度不一的损害, 轻者表现为肝炎症状, 重者出现暴发性肝衰竭而死亡。HBV 再激活可分为两个阶段: 第一阶段: 发生在强烈的细胞毒性或免疫抑制剂化疗期间, 其特征是病毒复制的增加, 主要表现为血清 HBV DNA, HBeAg, HBV DNA 多聚酶的增加以及 HBV 感染正常肝细胞。第二阶段: 与细胞毒性或免疫抑制剂停药后免疫功能恢复相关, 从而产生迅速的免疫介导的感染肝细胞的大量破坏。临床上可以导致肝炎, 肝衰竭甚至死亡^[7]。这类患者由于高水平的病毒载量及细胞介导的免疫受到抑制, 对于干扰素 α 的治疗反应较差, 而且免疫抑制剂的应用也阻断了干扰素 α 的抗病毒作用^[8-9], 而拉米夫定在临床的应用此类患者的治疗效果得到了很大的改善。

2 使用免疫抑制剂的慢性乙型肝炎患者的治疗

在慢性乙型肝炎患者接受免疫抑制剂或细胞毒性药物治疗时, HBV 再激活是一个常见的合并症。此类患者通常可再分为两类。一类为接受化疗的肿瘤患者, 另一类为器官移植后接受免疫抑制治疗的患者, 虽然他们使用免疫抑制疗法的原因不同, 但其目的都是相同的, 就是抑制免疫反应。如果没有太多关注于患者的慢性 HBV 感染的背景, 就会导致在治疗中引起 HBV 再激活, 出现转氨酶升高等一系列肝炎、甚至是暴发性肝炎的表现, 增加死亡率。

HBV 感染合并肿瘤患者中, 非霍奇金淋巴瘤(NHL)化疗介导的 HBV 再激活已引起国内外专家的注意。

Lok et al^[10]报道的化疗后HBV再激活发生率: HBsAg阳性患者发生黄疸型肝炎、非致死性肝衰竭、死亡率分别为22.2%, 3.7%, 3.7%; 抗-HBs阳性(伴/不伴抗-HBc阳性)患者分别为2%, 2%, 0; 血清学阴性患者均为0. Faggioli et al^[11]报道在98例接受化疗的NHL患者中, 其中12例(12.2%)出现急性肝炎的症状, 8例为HBsAg阳性患者, 提示HBV再激活是产生肝炎的主要因素. 说明HBV再激活可以在合并慢性HBV感染的NHL患者化疗期间发生, 并可产生极其严重的后果. Ahmed et al^[12]报道, 1例54岁NHL的患者化疗出现HBV再激活从而引起急性肝炎(ALT>16.67 μ Kat), 使用拉米夫定(150 mg/d)治疗, ALT迅速下降且HBeAg, HBsAg先后阴转, 强烈建议使用拉米夫定治疗化疗后HBV再激活所致的肝炎.

原位肝移植(OLT)是治疗终末期肝脏疾病的最后手段, 肝炎病毒感染所致疾病是肝移植的主要原因之一, 因此抗病毒治疗与免疫抑制抗排斥治疗之间的平衡就显得至关重要. 拉米夫定副作用小, 与免疫抑制剂无互相影响, 在器官移植前后均可以抑制HBV复制, 比干扰素 α 具有更多的优点. Andreone et al^[13]使用拉米夫定治疗(100 mg/d)25例等待OLT的患者, 所有患者血清HBV DNA经聚合酶链反应(PCR)法均为阳性, Child-Pugh评分不低于7分. 结果显示拉米夫定在治疗前核心突变HBV病毒株时的作用是非常重要的, 不仅抑制病毒复制, 允许患者耐受OLT手术, 而且可以在器官短缺时, 改善患者临床状态而延长等待OLT手术的时间. Chan et al^[14]使用拉米夫定治疗10例OLT术后患者, 其中3例为HBV所致暴发性肝炎, 7例为终末期肝硬化. 4例肝硬化患者(术后HBV DNA阳性)术后10.5 mo出现YMDD变异, 3例暴发性肝炎患者和另外3例肝硬化患者(术前HBV DNA阴性)没有出现YMDD变异. 从而得出结论为OLT术前若HBV DNA为阴性, 术后使用拉米夫定治疗不易出现YMDD变异. Ben-Ari et al^[15]使用拉米夫定治疗肝移植术后患者, 得出以下结论: 肝移植患者术后使用拉米夫定治疗引起HBV再激活主要感染了基因型D型的HBV; 使用拉米夫定治疗期间可以出现野生型HBV再现; 基因型耐药先于表型耐药出现; 在此类患者治疗时建议进行病毒载量监测. 因此, 可以使用拉米夫定联合高效价免疫球蛋白进行抗病毒治疗, 以减少HBV耐药^[16].

3 合并HIV感染的慢性乙型肝炎患者的治疗

由于高效抗逆转录病毒疗法(HAART)方案的引入, 人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)感染从一个致死性疾病转换为慢性疾病, 为获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者带来福音. 在同性恋人群中, 20%的HIV-1感染者同时具有HBV感染, 因为他们具有相同的传播途径^[17]. HBV感染并没有改变AIDS的进程, 但是在HIV感染患者中, HBV感染更易转变为慢性过程, 有更高的HBV复制水平, 更低的ALT水平和HBeAg血清转换率^[18], 使得HBV的

感染更加的频繁、严重, 从而最终导致了肝脏并发症的发生, 缩短了存活时间. 拉米夫定可以有效的减少HIV和HBV病毒复制, 对于同时感染了HIV, HBV的患者都有效^[19].

Nagai et al^[20]使用HAART(叠氮胸苷、拉米夫定、印地那韦)治疗1例同时感染了HIV, HBV的同性恋患者, 4 wk后HBV DNA多聚酶明显下降, HIV-1 RNA阴转, 说明了治疗有效的抑制了这些病毒的复制. Hoff et al^[21]对于拉米夫定治疗此类患者的疗效进行了评价. 19例感染了HBV, HIV的患者接受了抗HIV治疗, 包括拉米夫定(150 mg, 2次/d), 其中12例患者的治疗中包括了蛋白酶抑制剂. 14例患者血清HBV DNA转阴(分子杂交法), 17例患者中有6例出现了HBeAg血清学转换, 19例中有1例出现了HBsAg的血清学转换, 在治疗结束时, 血清ALT中位数下降. 19例患者中有10例患者的CD4⁺细胞计数中位数上升, HIV RNA阴转. Benhamou et al^[22]对于40例HBV, HIV感染的患者进行了研究, 因为他们都处于HIV疾病进展期, 并且不能耐受除拉米夫定以外的其他治疗, 因此均使用拉米夫定进行治疗. 结果显示在27例治疗初期具有HBV高病毒载量(血清HBV DNA浓度>5 ng/L)的患者中, 26例患者(96.3%)病毒载量下降到5 ng/L以下, 但11.5%的患者仍可使用PCR法检测到HBV DNA; 在13例治疗初期低病毒载量(血清HBV DNA浓度<5 ng/L)的患者中, 有6例患者PCR法测不到HBV DNA. 没有严重的不良反应发生. 尽管这并不是随机双盲的试验, 但仍可以说明拉米夫定确实可以抑制HBV, HIV感染.

虽然拉米夫定在治疗此类患者时取得了一定的效果, 但仍然存在着不足. 那就是YMDD变异所致HBV耐药株的出现以及拉米夫定停药后HBV再激活所致的肝炎表现. Wolters et al^[23]使用拉米夫定治疗了2例患者, 1例在停用拉米夫定后出现了严重的HBV反跳, 另1例在治疗18 mo后出现了HBV耐药性突变. Altfeld et al^[24]报道了1例AIDS患者, 既往曾感染过HBV, 使用不含拉米夫定的HARRT治疗后, 出现了HBV再激活的临床和血清学表现, 当再加入拉米夫定治疗后, HIV RNA滴度下降, CD4⁺T细胞计数上升, HBV DNA阴转并出现了HBsAg的血清学转换. 这很好的说明了HBV再激活很有可能是由于抗-HBs抗体滴度下降引起的, 因为HIV感染引起了CD4⁺T淋巴细胞数量减少和B细胞功能不良. 拉米夫定停药后出现的HBV再激活值得特别注意, 因此治疗此类患者时, 在停用、使用拉米夫定时一定要严密监测HBV感染的血清学指标. 类似的报道还有很多^[25-27], 为了解决这个问题, 研究者们开始寻求更加有效的治疗方案. Matthews et al^[28]研究了序贯与联合抗病毒治疗此类患者的效果. 最后得出结论认为序贯治疗很难取得长期的抑制HBV复制的效果, 而联合治疗却可以使得两个或多个抗病毒药物互相补充, 达到较满意的疗效. Nelson et al^[29]使用泰诺福韦(Tenofovir)、

拉米夫定进行联合抗病毒治疗 HIV, HBV 感染 20 例患者(其中 5 例此前未经过拉米夫定治疗, 15 例已经过拉米夫定治疗), 治疗结束时所有患者的 HBV DNA 病毒载量及 ALT 均下降, 5 例患者出现 HBeAg 血清学转换, 15 例既往使用过拉米夫定的患者中有 10 例出现了 YMDD 变异, 1 例 YIDD 变异, 再一次证明了联合其他核苷类似物可以克服拉米夫定耐药问题。

总之, 拉米夫定可以迅速降低血清中 HBV 水平, 无论免疫抑制的种类, 包括肿瘤、器官移植、AIDS 患者等, 且可以应用于对干扰素难以耐受的患者, 以抑制 HBV 复制, 延长患者生存期, 提高生活质量, 在免疫受损宿主慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗中具有非常重要的地位, 成为临床医生的有力武器。但他也有不足之处, 停药后易出现 HBV 再现, 而较长期应用易出现 YMDD 变异, 引起 HBV 耐药, 所以在应用过程当中, 应严密监测 HBV 复制指标, 并权衡利弊, 根据需要调整用药剂量、时间, 必要时辅以其他抗病毒药物联合治疗, 以加强疗效, 避免不良反应的出现。

4 参考文献

- Chen CJ, Wang LY, Yu MW. Epidemiology of hepatitis B virus infection in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl): E3-E6
- 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
- 成军, 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
- Leung N. Nucleoside analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):E53-E60
- Merican I. Treatment of chronic hepatitis B virus infection in special groups of patients: decompensated cirrhosis, immunosuppressed and paediatric patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):E71-E78
- Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:262-274
- Xunrong L, Yan AW, Liang R, Lau GK. Hepatitis B virus (HBV) reactivation after cytotoxic or immunosuppressive therapy-pathogenesis and management. *Rev Med Virol* 2001; 11:287-299
- Carr A, Cooper DA. Restoration of immunity to chronic hepatitis B infection in HIV-infected patient on protease inhibitor. *Lancet* 1997;349:995-996
- Schnittman SM, Pierce PF. Potential role of lamivudine (3TC) in the clearance of chronic hepatitis B virus infection in a patient coinfecting with human immunodeficiency virus type. *Clin Infect Dis* 1996;23:638-639
- Lok AS, Liang RH, Chiu EK, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. *Gastroenterology* 1991;100:182-188
- Faggioli P, De Paschale M, Tocci A, Luoni M, Fava S, De Paoli A, Tosi A, Cassi E. Acute hepatic toxicity during cyclic chemotherapy in non Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 1997; 82:38-42
- Ahmed A, Keffe EB. Lamivudine therapy for chemotherapy-induced reactivation of hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol* 1999;94:249-251
- Andreone P, Biselli M, Gramenzi A, Cursaro C, Morelli MC, Sama C, Lorenzini S, Spinucci G, Porzio F, Feline F, Di Giammarino L, Bernardi M. Efficacy of lamivudine therapy for advanced liver disease in patients with precore mutant hepatitis B virus infection awaiting liver transplantation. *Transplantation* 2002;74:1119-1124
- Chan HL, Chui AK, Lau WY, Chan FK, Wong ML, Tse CH, Rao AR, Wong J, Sung JJ. Factors associated with viral breakthrough in lamivudine monophylaxis of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *J Med Virol* 2002;68: 182-187
- Ben-Ari Z, Daudi N, Klein A, Sulkes J, Papo O, Mor E, Samra Z, Gadba R, Shouval D, Tur-Kaspa R. Genotypic and phenotypic resistance: longitudinal and sequential analysis of hepatitis B virus polymerase mutations in patients with lamivudine resistance after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:151-159
- Ben-Ari Z, Mor E, Tur-Kaspa R. Experience with lamivudine therapy for hepatitis B virus infection before and after liver transplantation, and review of the literature. *J Intern Med* 2003;253:544-552
- Thio CL. Hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: epidemiology, natural history, and treatment. *Semin Liver Dis* 2003;23:125-136
- Puoti M, Airolidi M, Bruno R, Zanini B, Spinetti A, Pezzoli C, Patroni A, Castelli F, Sacchi P, Filice G, Carosi G. Hepatitis B virus co-infection in human immunodeficiency virus-infected subjects. *AIDS Rev* 2002;4:27-35
- Prescott LM. Lamivudine useful against hepatitis B-HIV co-infection. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 1995;1:34
- Nagai K, Hosaka H, Kubo S, Nakamura N, Shinohara M, Nonaka H. Highly active antiretroviral therapy used to treat concurrent hepatitis B and human immunodeficiency virus infections. *J Gastroenterol* 1999;34:275-281
- Hoff J, Bani-Sadr F, Gassin M, Raffi F. Evaluation of chronic hepatitis B virus (HBV) infection in coinfecting patients receiving lamivudine as a component of anti-human immunodeficiency virus regimens. *Clin Infect Dis* 2001;32:963-969
- Benhamou Y, Katlama C, Lunel F, Coutellier A, Dohin E, Hamm N, Tubiana R, Herson S, Poynard T, Opolon P. Effects of lamivudine on replication of hepatitis B virus in HIV-infected men. *Ann Intern Med* 1996;125:705-712
- Wolters LM, Niesters HG, de Man RA, Schalm SW. Antiviral treatment for human immunodeficiency virus patients coinfected with hepatitis B virus: combined effect for both infections, an obtainable goal? *Antiviral Res* 1999;42:71-76
- Altfeld M, Rockstroh JK, Addo M, Kupfer B, Pult I, Will H, Spengler U. Reactivation of hepatitis B in a long-term anti-HBs-positive patient with AIDS following lamivudine withdrawal. *J Hepatol* 1998;29:306-309
- Thibault V, Benhamou Y, Seguret C, Bochet M, Katlama C, Bricaire F, Opolon P, Poynard T, Agut H. Hepatitis B virus (HBV) mutations associated with resistance to lamivudine in patients coinfecting with HBV and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1999;37:3013-3016
- Pillay D, Cane PA, Ratcliffe D, Atkins M, Cooper D. Evolution of lamivudine-resistant hepatitis B virus and HIV-1 in co-infected individuals: an analysis of the CAESAR study. CAESAR co-ordinating committee. *AIDS* 2000;14:1111-1116
- Manegold C, Hannoun C, Wywiol A, Dietrich M, Polywka S, Chiwakata CB, Gunther S. Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32:144-148
- Matthews GV, Pillay D, Cane P, Ratcliffe D, Gazzard B, Nelson M. Failure of combination therapy with lamivudine and famciclovir following lamivudine monotherapy for hepatitis B virus infection in patients coinfecting with human immunodeficiency virus-1. *Clin Infect Dis* 2001;33:2049-2054
- Nelson M, Portsmouth S, Stebbing J, Atkins M, Barr A, Matthews G, Pillay D, Fisher M, Bower M, Gazzard B. An open-label study of tenofovir in HIV-1 and Hepatitis B virus co-infected individuals. *AIDS* 2003;17:F7-F10

乙型肝炎病毒基因分型的临床意义

杨艳杰, 成军, 陈东风, 吴煜, 黄燕萍, 钟彦伟, 王春花, 刘敏

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

虽然近年来对乙型肝炎病毒(HBV)基因组变异已进行了较为系统的研究,但仍有许多问题尚未解决.目前研究的热点集中在HBV基因型的特点及临床意义和HBV聚合酶基因变异与核苷类似物耐药性的研究.根据聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)基因型分型法,目前已将前-S基因分为A, B, C, D, E, F, G, H八种基因型.现就HBV基因型分型方法,基因型与肝炎疾病的关系、预后以及与干扰素、拉米夫定等抗病毒疗效相关性的研究作一综述.

杨艳杰, 成军, 陈东风, 吴煜, 黄燕萍, 钟彦伟, 王春花, 刘敏. 乙型肝炎病毒基因分型的临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1670-1673

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1670.asp>

0 引言

我国是乙型肝炎发病大国,全球有3.5亿乙型肝炎病毒(HBV)携带者,我国占三分之一,每年发病率在6000万人次以上.相关研究表明,HBV基因有着多种类型,不同的基因型之间存在着致病性上的差异,同时病毒基因变异可引起抗药性等不同的后果.据了解,目前国内外传统的临床诊断方法无法检测病毒的基因型,以致于难以全面快速地反映HBV在患者体内的感染状况,在临床上会表现为漏诊、盲目用药和延误治疗.同时,目前一些实验室采用的基因检测方法由于周期长、手段复杂、费用高,无法做到临床推广.HBV基因型概念提出10a来,国内外学者从流行病学、分子生物学、临床医学等方面对HBV基因型进行了大量的研究.

1 HBV基因型及分型的方法

HBsAg是HBV包膜的主要蛋白,根据其抗原性的不同,将其分为9个主要的血清型(HBsAg的亚型),即adw2, adw4, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adrq+, adrq-和ayr. Okamoto et al^[1]通过对HBV全基因序列比较后发现,血清亚型的区分并不能真正反应HBV基因组的差异.认为HBV核苷酸序列差异8%可定为不同

的基因型.将18株不同血清型的病毒株分为4种基因型:A型(adw), B型(adw), C型(adw, adr, ayr), D型(ayw).其中adw血清型核酸序列变异程度最大.1992年Norder et al依据S基因序列的异质性发现了两种的基因型:E型和F型,补充并完善了HBV基因分型,将HBV分为6种.经研究发现HBV基因型与血清型间的关系为A型(adw1, ayw2)、B型(adw1, ayw2)、C型(adr, ayr, adw2)、D型(ayw2, ayw3)、E型(ayw4)、F型(adw4).不同的血清型可属同一基因型,而同一血清型可分布于不同的基因型.因此,血清型并不能反映基因组的差异.随后的研究证明,基因分型的方法较为正确^[2-3].

目前认为,HBV基因型比HBV基因组的概念更具有广泛的应用性,他可以更好的理解不同HBV株之间的关系.由于基因型概念的提出是建立在测序的基础上,因而测序已成为主要鉴定基因型的方法.目前用于HBV基因型分型的方法有多种,如全基因序列测定,S基因序列测定,克隆抗体酶联免疫黏附法(ELISA)基因型分型法,聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)基因型分型法等.由Lindh et al^[4]最初建立的S基因PCR-RFLP基因分型方法首次可区分A-F等6种不同的基因型.由于前-S是HBV基因变异最大的区域,而每一种基因型的变异是有限的,提示前-S区最适于基因分型^[5].随后Lindh et al^[6],又建立了前-S基因PCR-RFLP基因分型法.经过比较,用S基因PCR-RFLP基因分型法不能够分型的样本而使用前-S基因PCR-RFLP基因分型法可以明确分型,表明随后建立的前-S基因PCR-RFLP基因分型法是一种简明和完善的基因分型方法.Mizokami et al^[7]建立的S基因PCR-RFLP基因分型法,用分子进化的方法将68例HBV已知基因型的全基因序列及S基因序列排列后,发现了每一种基因型独特的酶切位点,用HphI, NciI, AluI, EarI和NlaIV等5种限制性内切酶,酶切可区分A, B, C, D, E和F基因型.酶切图谱简明直观.目前根据HBV全基因核苷酸序列异源性8%或者S基因区核苷酸序列异源性4%,将不同病毒株分为不同的基因型,迄今为止,HBV可以分为8个基因型,即A, B, C, D, E, F, G和H型.

2 HBV基因型的地域分布与致病性

随着HBV基因型分型方法的日趋完善,将有助于发现新的HBV基因型及开展流行病学调查,了解HBV各基因型毒力的强弱和致病性的关系,同时也可用基因

型与疗效相关性的研究. 当前, 按 HBV 基因组核苷酸序列将 HBV 分为 A-F6 型, 其中 A 型主要见于北欧, B 型和 C 型见于东亚和远东, D 型见于世界各地, 但以地中海区域、近东、中东和南亚多见, E 型主要见于撒哈拉沙漠以南的西部地区, F 型主要见于美洲人, G 型发现于法国和美国^[8], 目前认为, 不同地区的优势基因型反映了 HBV 自然感染史发生的变异特点, 是病毒变异后进化的后果. 除地理分布上的差异外, 不同基因型在发病机制上有什么差异仍不得而知. 人类感染 HBV 基因的类别可能与疾病的感染谱及疾病的进展有一定的相关性.

我国 A, B, C, D 等 4 个基因型都存在, 北方城市以基因 C 型流行为主, 由北方至南方, 基因 B 型感染率逐渐增高, 深圳基因 B 型和 C 型感染率比例相当, 少数民族地区基因 D 型有较高的感染率, 西藏则以 D 型为主. 我国南方地区采用微板核酸分子杂交 ELISA 技术, 对 152 例不同临床表现的肝炎患者血清中的 HBV DNA 进行了基因分型. 研究表明: 19 例急性重型肝炎的 HBV 基因型分别为 B 型 3 例, C 型 8 例, D 型 8 例; 14 例急性轻型肝炎的 HBV 基因型的分别为 B 型 6 例, C 型 8 例; 20 例轻型慢性肝炎的 HBV 基因型分别为 B 型 9 例, C 型 11 例; 48 例中度慢性肝炎的 HBV 基因型分别为 A 型 2 例, B 型 14 例, C 型 18 例, D 型 7 例, E 型 2 例, F 型 1 例; 51 例重度慢性肝炎的 HBV 基因型分别为 B 型 11 例, C 型 12 例, D 型 14 例, E 型 1 例, F 型 1 例. 可见 152 例不同临床表现的肝炎患者血清中的 HBV DNA 基因型大多数集中在 B, C 和 D 型这 3 种基因型, 其所占比例分别为 B 型 28.3%(43/152), C 型 37.5%(57/152), D 型 18.4%(28/152), 其中 C 型为最多. 说明我国乙型肝炎患者的 HBV 基因型主要是 B、C 和 D 这 3 型, 并以 C 型最多. 重度肝炎 D 型较为多见. 急性重度肝炎和慢性重度肝炎 D 基因型分别为 42.1% 和 27.5%, 明显高于轻型肝炎, 提示 D 基因型与疾病的严重程度有关.

Mayerat et al^[9]在研究以 A, D 型为优势基因型的西欧国家 HBV 基因型与疾病的关系时发现, 35 例慢性乙型肝炎组中 28 例为 A 型, 仅 4 例为 D 型; 30 例急性自限性肝炎组中 24 例为 D 型, 仅 3 例为 A 型. 尚无法解释 A 型与慢性活动性肝炎, D 型与自限性肝炎相关性的机制, 可能是基因型在病毒与宿主关系上起一定的作用. 提示感染 HBV 后的病情与病毒基因型有一定的相关性. Mbayed et al^[10]报道, 在北美地区, HBV 基因型以 A, F, D 型为主; 基因型与肝癌重度肝炎的关系在某些地区有相关性.

3 HBV 基因型与肝脏疾病预后

人类感染 HBV 基因型的型别可能与感染途径有一定的相关性. 东方国家以母婴传播为主, 而西方国家则以性传播及静脉注射毒品传播为主. Michielsen et al^[11]认为, 母婴传播的危险性取决于 HBV 复制水平. HBsAg 和 HBeAg 均阳性的母亲有 80-90% 的母婴传播危险性, 约有 85% 的婴儿日后成为慢性 HBV 携带者; HBsAg 阳性和

HBeAg 阴性的母亲仅有 2-15% 的母婴传播危险性, 且后代很少成为慢性 HBV 携带者. 这可能与东亚地区以 B, C 型为优势基因型, 其 HBV 呈高复制水平有关.

不同基因组可能有不同的致病性. 在台湾的 1 个调查中检测了 100 例无症状 HBV 携带者和 170 例组织学证实为慢性乙型肝炎的肝细胞癌患者, 结果表明, 台湾除 E 型外, 其他所有基因组都有, B 和 C 型占优势. HBV (HBV) 感染的结局与所感染的病毒基因型有关, C 型 HBV 感染者肝脏受损较严重, 而 B 型感染者中年以前容易发展成肝细胞肝癌. 这份台湾的研究表明, C 型 HBV 在肝硬化患者中的比例要比年龄相当的无症状携带者高得多, 而且 C 型 HBV 感染者发展至晚期肝病者显著多于 B 型感染者. 另外, 还观察到 C 型在年长人群中的感染率比较低, 而 B 型在各年龄组的患病率相对恒定. 这些都提示, C 型在迁延性 HBV 感染的免疫清除阶段滞留较长时间, 并且导致较重的肝脏炎症损害; 而 B 型则可能从免疫反应阶段迅速转入休眠相, 这时血清中几乎测不到 HBV DNA. 另一个值得注意的发现是, B 型病毒感染和 <50 岁患者较早发生肝癌显著相关, 而 C 型病毒感染则和 >50 岁患者肝癌的发病显著相关. 总之, 大多数已知的 HBV 基因型都存在于台湾, 并且以 B 型和 C 型为主, C 型可造成较严重的肝病, 而 B 型可能与年轻台湾人肝细胞肝癌的发生有关. 这些发现表明, 不同 HBV 基因型可能具有不同的致病性. Mayerat et al^[12]在研究以 A, D 型为优势基因型的西欧国家 HBV 基因型与疾病谱的关系时发现, 35 例慢性活动性肝炎组中 28 例为 A 型, 仅 4 例为 D 型; 30 例急性自限性肝炎组中 24 例为 D 型, 仅 3 例为 A 型. 尚无法解释 A 型与慢性活动性肝炎、DB 与急性自限性肝炎相关性的机制, 可能基因型在病毒与宿主关系上起一定作用. A 型与 D 型相比, A 型可能抗原性较弱, 免疫清除能力弱. 此假说尚需进一步研究. Lindh et al^[13]研究了东亚 HBV 感染者中, HBV CP 变异与基因型的关系及其对 HBV 复制和肝损害的相关性. 发现 CP 变异多发生于 C 型, 可引起更严重的肝脏炎症和纤维化, 与 HBV 载量、HBeAg 状态无关, 而前 -C 变异异常与较轻的炎症、HBeAg 阴性和较低水平的 HBV 复制相关. 他们认为, CP 变异是进展性肝损害的一个标志. 临床资料显示, HBsAg 的清除可能与 HBV 基因型有关. 与 B 基因型相比, C 基因型有更高的 HBeAg 阳性率, 分别为 16% 与 53%, 即使按性别、年龄、肝脏疾病进行配对, 同样有显著差异. 甚至认为 B 基因型的自发性 HBeAg 清除要比 (基因型) 早 10 a, 并且在 HBeAg 清除后, 肝脏生物化学指标持续正常. 这一差别可能是导致基因 B 型感染与基因 C 型感染后临床结局不同的原因之一.

据西班牙学者报道, 感染 A, D, F 基因型 HBV 的慢性乙型肝炎患者的长期预后不同. 巴塞罗那大学消化病研究所的 Sanchez-Tapias et al^[14]长期随访 258 例感染不同基因型 HBV 的西班牙慢性乙型肝炎患者, 观察

并比较其临床与病毒学后果,以探讨慢性乙型肝炎的预后是否与HBV基因型有关.结果发现,A,D,F基因型的发病率分别为52%,35%和7%.A基因型感染患者的持续生化缓解与HBV DNA清除率高于D基因型(log-rank: 14.2; P=0.002)和F基因型(log-rank: 4.2; P=0.03).A基因型患者的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)清除率高于D基因型(log-rank: 4.6; P=0.03).Cox回归分析显示,持续缓解和HBsAg清除与A基因型感染相关.乙型肝炎e抗体(抗-HBe)的血清转化与HBV基因型无关,但随访产生抗HBe的患者(log-rank: 4.5; P=0.03)或基线时呈抗-HBe阳性的患者(log-rank: 6.66; P=0.009)发现,A基因型患者在血清转化后的持续缓解率高于D基因型.F基因型患者的肝病相关性死亡多于A基因型(P=0.02)和D基因型(P=0.002).根据上述发现,Sánchez-Tapias et al认为,感染A,D,F基因型HBV的慢性乙型肝炎患者的长期预后是不同的.

为了探讨HBV基因型对肝脏疾病进展的影响,日本千叶大学的Sumi et al调查了585例慢性乙型肝炎感染患者,包括258例经组织学证实的慢性肝病(CLD)患者和74例肝细胞癌(HCC)患者.其中,B基因型的晚期纤维化(F3或F4期)和HCC患者的平均年龄显著大于C基因型患者(P分别为0.018和0.024).结果发现,B基因型CLD患者的活检乙型肝炎e抗原(HBeAg)阴性率和累积HBe血清转化率显著高于C基因型患者(P分别为<0.01和0.022).多变量分析发现,B基因型、前-核心突变、ALT水平高和重度组织学活性是HBe血清转化的独立相关因素.所有经活检证实CLD的患者中,B基因型晚期纤维化患者的比例显著低于C基因型(分别为4/30例和74/224例;P=0.034),而且,年轻患者(<45岁)的差异更为明显(分别为1/25例和47/180例;P=0.020),但老年患者(>45岁)未见显著差异.另外,在CLD和HCC患者中,各基因型的比例相同(B和C基因型分别占11.2%和87.0%、10.8%和89.2%).Sumi et al认为,虽然B基因型患者出现HBe血清转化较早、肝脏纤维化进展较慢、发生HCC较晚,但B和C基因型慢性肝病进展为晚期纤维化、发生HCC的终生危险性没有差异.

4 乙型肝炎病毒基因分型与抗病毒的疗效

乙型病毒性肝炎是一类严重危害人类身体健康的感染性疾病,全球有3.5亿人感染乙型肝炎(HBV)其中近10%的患者可因持续HBV感染而导致肝硬化或肝细胞癌^[15].虽然HBV的致病机制十分复杂,但HBV在体内持续存在是引起多种免疫紊乱的始动因子,只有有效地阻断HBV在体内的复制,直至根除HBV,才能最终控制肝脏进行性炎症反应,从而消除各种严重的并发症.但是到目前为止,临床上仍然缺乏理想的抗HBV药物;尽管干扰素被认为是目前最有价值的抗HBV制剂,但其总显效率也不超过40%^[16],并且对“母婴垂直传播”引起的HBV感染显效率更低甚至无效.因此,寻

找更有效的抗HBV药物就显得十分必要.虽然近年来科学家对HBV基因组变异已进行了较为系统的研究,但仍有许多问题尚未解决.目前研究的热点集中在HBV基因型的特点及临床意义和HBV聚合酶基因变异与核苷类似物耐药性的研究.

随着长效干扰素的临床应用和不同抗病毒联合治疗方案的推出和优化,HBV分子病毒学的特点与抗病毒治疗的关系可能越来越引起临床医师的关注.对148例接受干扰素治疗的e抗原阳性的慢性乙型肝炎患者进行分析.结果显示,与非A基因型患者相比,A基因型患者对标准干扰素治疗应答较好(P=0.014).多因素回归分析显示,与基线HBV DNA和ALT水平相比,基因型A可作为更好的治疗应答预测指标(P=0.001;相对危险(RR)为6.19,95%CI为1.94-19.8).相反,不同的基因型对长疗程干扰素治疗应答率没有差别.对基线和治疗结束时HBV序列研究发现,只有A基因型在治疗结束时CP变异率增高(P<0.001).此外,与B,C或D基因型相比,C基因的氨基酸突变率在A基因型中发生率最低.HBV基因型A对标准干扰素治疗应答率较其他基因型高,这与不同基因型的分子病毒学特点有关.感染不同基因型的HBV患者,接受干扰素治疗的合理疗程也应不同.

不同的基因型与某些变异相关,比如前-C区1896变异是基因型依赖的,在B,C,D和E型的G1896与T1858配对的干攀结构不稳定,1896的G-A变异使干攀结构趋于稳定,故前-C终码变异率较高.而A和F型的1858位核苷酸为C,能与1896位核苷酸G形成稳定的结构,较少发生变异.所以,前-C区1896变异的流行率与基因型相关,这就造成HBeAg阴性HBV感染流行率与地区优势基因型相关的现象.这一观点已被广泛证实.不同基因型HBV感染后的临床病情轻重、对治疗的反应可能是不同的.国内外均有研究发现,在中重度慢性肝炎、肝硬化、肝癌人群中,基因C型的检出率高于基因B型的检出率.基因A型和基因B型患者接受干扰素、拉米夫定治疗后,HBeAg血清转换率较高;而基因D/E型和基因C型的HBeAg血清转换率较低.而且,基因B型感染者发生肝癌后,对栓塞治疗的反应优于基因C型,栓塞治疗后预后好,无再发;而对照组中的C基因型患者发生肝癌后,在栓塞治疗后仍继续发展,最终死于肝衰竭.因HBV感染导致终末期肝病接受肝移植患者中,基因C型和基因B型移植后感染再发率较高.

拉米夫定(Lamivudine)是新一代核苷类抗病毒药.开始用于治疗艾滋病.1995年后逐渐发现其对HBV DNA的抑制作用,并在全球多中心先后进行了拉米夫定治疗乙型肝炎的I期和II期临床试验,是迄今为止唯一经历长期慢性乙型肝炎治疗试验的核苷类药物.所有临床研究均证实,拉米夫定有较强的抑制HBV的作用,而且不良反应较轻微,发生率也不高,患者的耐受性较好,他的出现给乙型肝炎治疗带来了新的希望^[17].在美国, α -干扰素(IFN α)和拉米夫定是目前唯一批准的治

疗慢性乙型肝炎的药物^[18]。干扰素除具有直接抑制病毒复制作用外, 还对患者的免疫应答机制的调节及激活发挥作用。 α -干扰素抗病毒作用的重要机制在于启动激活机体的免疫功能。但在实际应用中, 除干扰素的毒副作用外, 他还有可能诱导机体产生 α -干扰素抗体和HBV前-C期基因突变, 不能够长期使用, 其有效率仅在30-40%^[19]。新的逆转录酶抑制剂-核苷类的发现为乙型肝炎患者的治疗带来希望。拉米夫定在临床实验中显示出持续抑制病毒复制的抗病毒作用。拉米夫定作为一种双脱氧胞嘧啶核苷类似物, 他可与DNA聚合酶结合后, 抑制多聚酶活性, 同时与dCTP掺入DNA链, 造成HBV DNA链合成终止, 抑制HBV的复制^[20]。用药后相当数量的患者可在较短的时间内使HBeAg抗原阴转和HBV DNA降为 $<1 \times 10^6$ copy/L。但是, 长期服用易耐药或停药后易出现反跳。目前认为, 其主要原因是位于多聚酶结构区域的酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)是该酶的活性区域, 编码多聚酶的P基因的个别核苷酸变异可以使之发生改变^[21]。在中国地区进行的拉米夫定临床实验结果显示YMDD变异株的出现可引起病毒对拉米夫定的耐药。另外, 多聚酶其他部位的变异可能导致拉米夫定与病毒结合力降低, 因而治疗反应差, 需要进一步证实^[22]。

已有的研究表明, 拉米夫定耐药性的产生与HBV P基因突变有关, 耐药株中多见P基因变异且相对集中于YMDD基序。YMDD变异分为两种, 一种是HBV P基因第550位氨基酸由M突变为V, 另一种是HBV P基因第550位氨基酸由M突变为, 此两种变异分别由HBV第739位碱基A突变为G和741位G突变为T所引起。Tassopoulos et al^[23]发现, 治疗基线时血清HBV DNA滴度的中位数较高者发生变异的可能性增高, 前-C区变异株产生耐药性的机会高于野毒株。Allen et al报道在20例发生治疗耐药的患者中, YVDD/L528M变异株为18例, 而YIDD变异株仅为2例。提示YVDD变异株较YIDD常见, 而Pessoa et al认为YIDD变异株发生率高于YVDD发生率。

以上资料提示, 对于拉米夫定治疗无效或反跳的患者, 不一定仅仅由于YMDD变异而产生耐药。HBV多聚酶区其他部位的变异以及基因型的不同可影响其拉米夫定的治疗效果。随着人们对基因型不断深入的研究, 将对临床合理使用拉米夫定提供有益的启示。

总之, 今后还需进行更多的临床研究和实验, 以确定是否需要将基因型列为临床监测指标, 指导乙型肝炎临床治疗和预后判断。

5 参考文献

- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayum M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988;69:2575-2583
- Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 1993;74:1627-1632

- Sastrosoewignjo RI, Sandjaja B, Okamoto H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Indonesia. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:491-498
- Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997;175:1285-1293
- Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnus LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992;73:1201-1208
- Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of pre-Samplicon. *J Virol Methods* 1998;72:163-174
- Cao K, Mizokami M, Orito E, Ding X, Ge XM, Huang GY, Ueda R. TT virus infection among IVDUs in south western China. *Scand J Infect Dis* 1999;31:21-25
- Karthigesu VD, Allison LM, Fortuin M, Mendy M, Whittle HC, Howard CR. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. *J Gen Virol* 1994;75:443-448
- Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999;6:299-304
- Mbaye VA, Lopez JL, Telenta PF, Palacios G, Badia I, Ferro A, Galoppo C, Campos R. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *J Clin Microbiol* 1998;36:3362-3365
- De Groote K, Van Damme P, Deprettere A, Michielsens P. Prevention of vertical transmission of hepatitis B virus infection. Is there a standard policy in Flanders (Belgium)? *Acta Gastroenterol Belg* 1997;60:255-258
- Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999;6:299-304
- Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2000;7:258-267
- Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856
- 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
- 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
- 姚桢. 分子乙型肝炎病毒相关病学. 第1版, 北京: 中国医药科技出版社, 1998:138
- Hollinger FB. Factors contributing to the evolution and outcome of cirrhosis in hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1999;3:741-755
- Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, Osterhaus AD, Schalm SW. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol* 1997;26:1393-1395
- 孙正伟, 张源潮. HBV基因型与拉米夫定疗效相关性的研究. 国外医学·病毒学分册 2002;3:96-98
- Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condeary LD, Tzakis AG, Schiff ER, Brown NA. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997;349:20-22
- Rodriguez-Novoa S, Gomez-Tato A, Aguilera-Guirao A, Castroagudin J, Gonzalez-Quintela A, Garcia-Riestra C, Regueiro BJ. Hepatitis B virus genotyping based on cluster analysis of the region involved in lamivudine resistance. *J Virol Methods* 2004;115:9-17
- Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, Hawley S, Barber J, Condeary L, Gray DF. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis Be antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precure mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine precure mutant study group. *Hepatology* 1999;29:889-896

乙型肝炎病毒 DNA YMDD 变异的检测技术

蔺淑梅, 成军, 张树林

蔺淑梅, 成军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

拉米夫定治疗乙型肝炎耐药性的产生主要与 HBV P 基因突变有关, 耐药株中多见 P 基因变异且相对集中于 YMDD 基序. YMDD 变异的检测技术包括核苷酸序列测定法、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析、基因芯片技术、聚合酶链反应微板核酸杂交-酶联免疫黏附法等. 本文就乙型肝炎病毒 DNA YMDD 变异的检测技术作一综述.

蔺淑梅, 成军, 张树林. 乙型肝炎病毒 DNA YMDD 变异的检测技术. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1674-1677

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1674.asp>

0 引言

核苷类似物拉米夫定治疗乙型肝炎的主要机制为抑制乙型肝炎病毒(HBV)DNA多聚酶(P)基因,从而干扰病毒逆转录过程,阻碍病毒DNA的合成和转录.拉米夫定可迅速抑制慢性乙型肝炎患者体内的HBV复制,使患者血清HBV DNA转阴,在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中显示了令人鼓舞的效应.但临床应用中发现,拉米夫定用药过程中部分患者可出现耐药现象,导致患者HBV DNA反跳,病情反复,极少数患者还会出现病情恶化.已有的研究表明,拉米夫定耐药性的产生主要与HBV P基因突变有关,耐药株中多见P基因变异且相对集中于YMDD基序^[1].YMDD变异通常有2种形式:一种为P区741位鸟嘌呤被胸腺嘧啶取代(G→T),则其编码的550位的蛋氨酸变为亮氨酸(YMDD→YIDD);另一种为第739位腺嘌呤被鸟嘌呤取代(A→G),则其编码的550位的蛋氨酸变为缬氨酸(YMDD→YVDD)^[2].YMDD结构域是HBV进行逆转录的生物活性部位^[3],也恰恰是拉米夫定干扰HBV复制的药物结合位点,这2种变异均导致了拉米夫定与多聚酶合力的下降或消失,体外实验也得到证实,YMDD变异株对拉米夫定的敏感性降低为野生株的万分之一^[4-5].最近不少学者还发现在未

经抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者也存在YMDD变异,即这类患者对拉米夫定存在先天性耐药^[6-11].因此,拉米夫定治疗前及治疗期间监测YMDD的变化对选择治疗方案及调整治疗用药,提高疗效都具有十分重要的意义.现就目前YMDD变异的实验室检测方法综述如下.

1 检测方法

1.1 核苷酸序列测定法 YMDD突变的经典检测方法为DNA测序法,测序法也是检测HBV DNA多聚酶基因YMDD突变的金标准,包括聚合酶链反应(PCR)产物直接测序和重组克隆测序检测P基因YMDD变异.有人^[12-14]分别采用聚合酶链式反应及限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)、PCR产物直接测序和重组克隆测序检测P基因YMDD变异,认为克隆后测序的结果最精确.Honkoop et al^[15]采用测序法检测在拉米夫定治疗过程中HBV DNA再次出现阳性的5例慢性乙型肝炎患者血清,发现4例存在YMDD基序的变异.张永忠 et al^[16]采用PCR产物直接测序技术检测了拉米夫定治疗48 wk后血清HBV DNA仍阳性的38例患者血清中HBV DNA P基因序列,并推为相对应的氨基酸序列,同时和GenBank中标准株序列相比较,结果有20例患者检出YMDD变异,其中YVDD型8例,都伴有L526-M变异,YIDD型12例,其中2例伴有L526-M变异.

目前国外报道的HBV拉米夫定耐药株的检测多采用DNA测序的方法,测序法虽然可靠,也可检测出多位点的变异,但只能检测血清中的一种优势株,对于混合型感染通常不能识别,而且由于技术难度及实验成本等诸多因素,限制了他的临床应用,不适合开展大规模标本的临床检测.

1.2 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析方法 错配聚合酶链反应(PCR)和限制性片段长度多态性分析(RFLP)技术检测HBV YMDD变异株的结果均显示,错配PCR结合RFLP分析技术能有效地鉴别HBV YMDD野生株和变异株,与测序同样灵敏、特异^[13-14,17-19],但实验简便、快速,无需特殊仪器,适合于一般实验室应用及大规模临床检验使用.限制性片段长度多态性分析是用某一限制性内切酶对目的DNA进行酶切后所产生的酶切图谱进行多态性分析的方法.由于核酸限制性内切酶对DNA特定序列识别切割的专一性,不同序列的DNA切割后产生长短不一的DNA片段,在凝胶电泳产生不同的酶切图谱,分析这些不同的图谱就可以区分

不同序列的 DNA. 错配 PCR 实验的目的就是在 PCR 扩增片段中引进一个限制性内切酶识别序列, 从而改变目的 DNA 的酶切图谱, 区别变异株与野生株. 方法是利用野生株设计错配引物对 HBV DNA 进行扩增, 使得到的 P 基因片段扩增产物的第 736 位碱基由 T 变为 C, 从而在 HBV 野生株 P 基因 C 区引进一个 Nde I(CA TATG)酶切位点, 而此酶切位点附近任一碱基变异均将导致此酶切位点消失(YMDD 变异株无此酶切位点, 不能切开), 最后通过酶切后电泳区分野生株和变异株. 由于 P 基因 YMDD 区域高度保守, 减少了 YMDD 周边区域点突变影响酶切结果的可能性.

张伟三 et al^[17]根据已公布的 HBV DNA 序列, 在 HBV 多聚酶基因区设计并合成了两对寡核苷酸引物, 其中一只为错配引物, 建立了巢式错配 PCR- 限制性片段长度多态性分析技术. 应用巢式错配聚合酶链反应特异性扩增含有 HBV 多聚酶基因 YMDD 基序的片段, 扩增产物用限制性内切酶(Nde I)酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切后的目的片段限制性片段长度多态性图谱, 并与 DNA 测序结果进行比较. 应用该方法对 20 例长期服用拉米夫定的慢性乙型肝炎患者的系列血清进行了检测, 发现 YMDD 变异者 9 例(45%), YMDD 野毒株者 11 例(55%), 表明该方法可有效地鉴别 HBV YMDD 野毒株与变异株且灵敏度高, 可以检出已知 HBV DNA 定量 10⁶ 拷贝/L 的血清标本, 特异性强, 检测结果与测序结果相吻合. 唐漾波 et al^[18]采用套式 / 错配 PCR 结合 RFLP 分析技术检测了经过拉米夫定抗病毒治疗后 HBV DNA 仍为阳性的 45 例慢性乙型肝炎患者血清, 结果检出 HBV YMDD 野生株 23 例和变异株 22 例. 作者认为从理论上来说, 此方法能有效地检测出混合株的感染, 但在实验中, 未检出任何混合株的感染, 可能因为体内的感染任何时候都存在优势株, 这种优势株能被检测到, 而非优势株可能由于在体内感染量有限而不被检测到. 因此, 作者建议先用该方法对临床可疑病例进行筛查, 然后用 PCR 产物克隆后测序的方法进行进一步的 HBV YMDD 变异的检测, 这样可以进一步提高敏感性及混合株的检出率.

为进一步区分 YMDD 变异的类型, 有学者^[12, 20-22]将限制性内切酶切点带入变异型特异性引物内, 扩增产物经酶切分析可准确地检出 YMDD 变异. Yang et al^[12]应用 PCR-RFLP 检测了拉米夫定治疗过程中 HBV DNA 反跳的 33 例及拉米夫定治疗过程中 HBV DNA 持续阳性 1 a 以上的 2 例慢性乙型肝炎患者血清, 结果检出 YIDD 变异株 4 例, YVDD 变异株 6 例, 1 例为 YIDD/MDD 混合感染, 所有检测结果与直接测序结果一致. 杜绍财 et al^[21]采用限制性内切酶酶切位点引入法设计引物(在合成引物时带入酶切位点)检测 YIDD, YVDD, 内切酶分析, PAGE 电泳法检测基因变异. YMDD、YIDD、YVDD 的判断: 有 Ssp 切点为 YIDD, 有 ApaI 切点为 YVDD, 无切点为 YMDD, 结果显示应用 Ssp 及 ApaI 内切酶

可准确地检测出 YIDD 和 YVDD. 裴斐 et al^[22]对肝移植术后出现乙型肝炎复发的 5 例患者进行 HBV DNA 多聚酶基因片段(包含 YMDD 结构域)的扩增和测序, 以及采用 PCR-RFLP 法检测 HBV DNA 多聚酶基因的 YMDD 突变, 其中 4 例为野生型 YMDD, 1 例发生了 YIDD 突变, PCR-RFLP 检测 HBV YMDD 突变的结果与直接 DNA 测序结果完全吻合.

1.3 基因芯片技术 基因芯片(gene chip), 又称基因微矩阵(microarray) 其原理是将大量特定的基因片段或寡核苷酸片段作为探针有序地和高密度地排列固定于玻璃或硅等载体上, 然后与待测的有荧光标记的样品核酸按碱基配对的原则进行杂交, 通过激光共聚焦系统检测杂交信号强度, 经计算机分析处理数据资料, 获取样品分子的数量和序列信息, 从而可对核酸序列进行大规模、高通量的研究. 基因芯片技术由于其具有大通量、快速、灵敏、平行检测基因的优势, 已在生物学的各个领域中得到广泛的应用. 国内外学者的多组研究显示, 用基因芯片检测基因突变, 检测准确率高达 99%, 有学者同时运用芯片检测技术和传统 DNA 序列分析法分别检测癌基因突变情况并进行比较, 结果表明芯片检测法敏感性达 92%, 特异性为 100%, 说明基因芯片有较高的特异性及灵敏度^[23-24], 且具有所需样本微量和操作简便等特点. 因此, 许多学者^[25-28]将基因芯片法用于 YMDD 变异的检测, 结果表明, 基因芯片法检测 YMDD 变异, 快速、准确、重复率高, 不仅能同时检测出多个点位的变异, 而且能检测出野生株和变异株共存即混合感染, 与其他检测方法相比有明显优势, 在临床上是一种可应用的方法.

张新华 et al^[25]用 PCR 方法扩增 HBV DNA P 区, 扩增产物与基因芯片上的寡核苷酸进行杂交, 杂交结果通过扫描仪扫描到计算机上, 经软件分析可得到 HBV YMDD 野生型及其 YVDD 和 / 或 YIDD 变异型结果, 并对部分阳性标本用基因序列测序证实. 结果 150 份 HBV DNA 阳性血清, 用基因芯片方法检出阳性标本(包括 YMDD 野生型和变异型)共 122 例, 单纯 YMDD 野生型有 90 例, YVDD 变异 28 例, YIDD 变异 2 例, YVDD 和 YIDD 混合变异 2 例, 而且变异株均与野生株共存, 对其中 8 份阳性标本进行基因序列测序, 证实与芯片检测结果完全一致. 计焱焱 et al^[27]用基因芯片法测定 20 份拉米夫定治疗 1 a 的血清, 14 例检出 YMDD 变异株. 14 例 YMDD 变异株中, YVDD 13 例(其中 5 例变异株和野生株同时存在, 2 例合并 YIDD, 1 例为 YVDD 合并 YIDD), 1 例为单独 YIDD 变异, 基因芯片法和 DNA 测序法检测结果比较, 显示 YMDD 变异检测率基本相符.

1.4 聚合酶链反应微板核酸杂交 - 酶联免疫黏附法 聚合酶链反应微板核酸杂交 - 酶联免疫黏附法(PCR-mnh-ELISA)法是一种将基因扩增、核酸杂交和酶联显色 3 种诊断技术为一体的检测技术, 他既解决了 PCR 产物的特异性检测, 又通过酶系统的放大作用提高了检测

的灵敏度. 有学者^[29-31]采用该方法检测慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗前及治疗过程中HBV YMDD变异, 结果显示YMDD变异检测率与DNA测序法检测结果一致. Zhou et al^[29]采用PCR微板核酸杂交ELISA技术检测47例慢性乙型肝炎患者服用拉米夫定治疗前及治疗后DNA含量及YMDD耐药突变株(包括YIDD及YVDD突变株), 结果显示有19%(9/47)的患者出现YMDD变异株, 作者将PCR微板核酸杂交检测的YMDD野生株、YIDD及YVDD耐药株与测序结果进行比较, 二者相吻合. 谢南et al^[31]应用该方法检测了90例服用拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎患者血清, 结果显示, 口服拉米夫定12 mo和24 mo后, YMDD耐药株的发生率分别为16%(14/90)和27%(24/90), 并且对YMDD野生株、YIDD及YVDD突变株各取2例及1例先天性YMDD耐药株进行测序, 测序结果与PCR微板核酸杂交ELISA结果相同, 作者认为PCR微板核酸杂交ELISA技术检测YMDD耐药突变株(YIDD/YVDD), 具有结果准确、成本低、操作方便、时间短的优点, 一次可检测数十个标本. 经初步比较与直接测序结果一致, 值得进一步试用. 胡盈盈 et al^[32]的研究则显示该方法虽敏感性高, 但特异性低, 实验中用该方该检测的13例突变株, 经测序证实仅一例为突变株, 其余均为野生株. 因此PCR-mnh-ELISA方法在检测YMDD变异中的应用价值值得进一步评价.

1.5 其他方法 有学者^[33-35]采用实时荧光聚合酶链反应结合lightcycler技术分析了拉米夫定治疗中的YMDD突变, 结果与PCR直接测序完全符合. 认为该方法灵敏、特异且快速简便, 可用于临床拉米夫定治疗中YMDD变异的检测. 刘传苗 et al^[33]根据寡核苷酸探针与模板结合时, 不匹配碱基显著影响溶解温度的原理, 设计合成2条荧光标记的特异性探针, 用实时荧光聚合酶链反应(PCR)方法对297例患者的354份血清标本进行扩增后溶解曲线分析(溶解曲线分析是在扩增循环完成后对扩增产物的分析, 突变株和野生株的核苷酸序列不同, 其T_m值不同, 用lightcycler软件对结果进行分析, 可实现完全的区分, 而达到突变检测的目的. 进行YMDD变异检测, 结果354份标本中, 检出YMDD变异株156份(44.1%), 其中混合株占34%(53/156), 有9份血清标本同时进行了DNA序列分析, 测序结果同本试验检测的结果完全一致. 作者认为该方法简便、快速、灵敏、经济. Cane et al^[34]采用荧光标记的探针利用快速的PCR法检测HBV的耐药变异株, 与直接测序的结果比较, 显示两种方法的灵敏度及特异性相差不多, 而前者更为经济快捷.

2 临床应用

随着拉米夫定的广泛应用, 其治疗乙型肝炎出现耐药的现像也日趋明显, 目前各地报道YMDD变异的百分比尚不一致, 可能与检测YMDD变异的方法不同有

关, 在临床应用中根据实际条件选择敏感、特异、快捷的检测YMDD变异的方法进行服药前及服药期间的监测则显得十分重要.

3 参考文献

- 1 Malik AH, Lee WM. Chronic hepatitis B virus infection: treatment strategies for the next millennium. *Ann Intern Med* 2000; 132:723-731
- 2 Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condreay LD, Tzakis AG, Schiff ER, Brown NA. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997;349:20-22
- 3 Locarnini SA. Hepatitis B virus surface antigen and polymerase gene variants: potential virological and clinical significance. *Hepatology* 1998;27:294-297
- 4 Honkoop P, de Man RA, Scholte HR, Zondervan PE, Van Den Berg JW, Rademakers LH, Schalm SW. Effect of lamivudine on morphology and function of mitochondria in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1997;26:211-215
- 5 Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Lamivudine Clinical Investigation Group* 1998;27: 1670-1677
- 6 Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001;34:584-586
- 7 Shin YM, Cho M, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Yang US, Kim CM, Park HK, Jang HJ. Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003;9:1-9
- 8 王陆军. 拉米夫定治疗过程中乙型肝炎病毒变异的分析. *交通医学* 2001;15:503-504
- 9 叶晓光, 王若伦, 郭海波. 未经抗病毒治疗的慢乙型肝炎患者YMDD变异基因的检测及分析. *广州医学院学报* 2002;30:30-32
- 10 秦刚, 朱勇根, 吴月. HBV YMDD变异检测及其临床意义. *中华医学丛刊* 2003;3:31-32
- 11 钱健帮, 孙南雄, 杜绍才, 范晓峰, 张永祥. 使用/未用拉米夫定HBV慢性感染者中YMDD基序变异的检测. *江苏医药杂志* 2002;28:408-501
- 12 Yang DH, Liang WF, Xie YJ, Zhao NF, Fan J. PCR restriction fragment length polymorphism in detection of YMDD variants of viral polymerase in hepatitis B virus patients treated with lamivudine. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2002;1:232-237
- 13 Zhou ZY, Sun J, Chen JJ, Hou JL, Luo KX. Detection of the YMDD motif mutation of P gene of hepatitis B virus using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2001;21:885-887
- 14 孙剑, 侯金林, 王战会, 肖蕾, 章廉. 耐拉米夫定乙型肝炎病毒变异株的人工构建及其限制性片段长度多态性分析. *第一军医大学学报* 1999;16:489-492
- 15 Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, Osterhaus AD, Schalm SW. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997;26:1393-1395
- 16 张永忠, 李夏亭, 周志武, 周国平, 周胜生. 乙型肝炎病毒聚合酶基因变异检测及临床应用. *现代检验医学杂志* 2002;17:18-19
- 17 张伟三, 丁静娟. HBV耐拉米夫定多聚酶基因变异检测方法的建立. *医学文选* 2002;21:270-273
- 18 唐漾波, 黄梅芳, 孙剑, 唐小平, 骆抗先, 魏绍静. 应用错配PCR和限制性片段长度多态性分析技术检测HBV YMDD变异株. *广东医学* 2002;23:469-470
- 19 Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, Cotrina M, Costa X, Pascual C, Esteban R, Guardia J. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods* 1999;83:181-187
- 20 侯金林, 孙剑. 乙型肝炎病毒核苷类似物耐药性监测和预防及其处理. *中华医学杂志* 1999;79:806-809

- 21 杜绍财, 刘峰, 魏来, 王剑, 王豪, 孙炎, 孙怀森, 陈卫. HBV P 区聚合酶基因变异株的检测及限制性内切酶分析. 临床检验杂志 2002;20:269-272
- 22 裴斐, 郑杰, 宁宇, 由江峰, 杨京平. 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶基因 YMDD 突变的快速检测. 中华病理学杂志 2003;32:75-78
- 23 Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvanen AC. A system for specific, high throughput genotyping by allele specific primer extension on microarrays. *Genome Res* 2000;10:1031-1042
- 24 Marx J. DNA arrays reveal cancer in its many forms. *Science* 2000;289:1670-1672
- 25 张新华, 张跃新, 孙立茹, 文倩, 周礼全, 樊国霞, 张新, 杨德刚. 基因芯片技术在检测乙型肝炎病毒 P 区 YMDD 变异中的研究. 中华医学杂志 2003;83:459-462
- 26 杨守平, 胡德昌, 郑可飞, 孙小兵, 陶维玉, 马宁. 基因芯片检测拉米夫定治疗慢性乙型肝炎中的 HBV YMDD 变异. 肝脏 2003;8:66-68
- 27 计焱焱, 徐蓓, 姚光弼, 倪晓龙, 吴亦栋, 马宁. 基因芯片检测乙型肝炎病毒 YMDD 变异的临床应用. 肝脏 2002;7:171-173
- 28 赵伟, 刘全俊, 刘伟, 张林, 张汉荣, 刘新珏, 周镇先. 基因芯片检测拉米夫定治疗慢性乙型肝炎后引起的 HBV YMDD 变异. 江苏医药杂志 2003;29:406-409
- 29 Zhou DY, Cao YJ, Lin LY, Wang H, Huang JS. HBV resistant to lamivudine: experimental and clinical studies. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:519-522
- 30 王虹, 熊梦辉, 吴志华, 万成松, 周东耀, 王省良, 曾位森, 彭华国. 拉米夫定耐药与 HBV 基因型及基本核心启动子突变的关系. 中华微生物学和免疫学杂志 2001;21(增刊):119-122
- 31 谢南, 朱小诚. 90 例 HBV 基因型与拉米夫定疗效的研究. 实用临床医学 2003;4:5-8
- 32 胡莹莹, 江家骥, 李丹, 林彩文, 李勤光, 陈怡. 不同实验方法在监测拉米夫定耐药突变中的应用价值. 中华肝脏病杂志 2003;11:427-430
- 33 刘传苗, 张欣欣, 张东华, 陆志檬. 实时荧光聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒聚合酶基因变异. 中华检验医学杂志 2003;26:37-39
- 34 Cane PA, Cook P, Ratcliffe D, Mutimer D, Pillay D. Use of real-time PCR and fluo rrimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1600-1608
- 35 Whalley SA, Brown D, Teo CG, Dusheiko GM, Saunders NA. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the LightCycler. *J Clin Microbiol* 2001;39:1456-1459

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

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 1998-2004 年的现状

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology*® (*World J Gastroenterol*, *WJG*) 是发表原创性胃肠病学和肝病学的国际性学术杂志. *WJG* 创刊于 1995 年, 原名 *China National Journal of New Gastroenterology*, 1998 年更名为 *WJG*, 由世界胃肠病学杂志社出版. *WJG* 国际标准刊号 ISSN 1007-9327, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行.

1 *WJG* 1998-2004 年自引和他引

WJG 出版的原始创新性的论文被 SCI 收录的 361 种期刊和 589 个机构引用, 其中美国期刊占 44.59%, 机构占 22.58%, 中国期刊占 3.60%, 机构占 18.84%. 最高影响因子为 28.740(Nature Medicine), 影响因子 2.0 以上的期刊有 170 种, 占 52.95%. *WJG* 2004 年 1-2 月总引次数 560, 自引次数 435(77.67%);2003 年总引次数 2387, 自引次数 1991(83.41%);2002 年总引次数 1486, 自引次数 1401(94.27%);2001 年总引次数 537, 自引次数 499(92.92%);2000 年总引次数 238, 自引次数 220(92.43%);1999 年总引次数 24, 自引次数 8(33.33%);1998 年无总引次数. *WJG* 2002 年被他刊引用的篇数和次数分别为 82, 85;2003 年分别为 332, 372;分别上升了 250(304.87%), 287(337.64%). 引用作者分布 38 个国家, 引用期刊分布 21 个国家. 各项国际及国家自然科学基金资助论文 1020 篇, 占 57.46%. 论文作者分布 40 个国家. 2003 年 5-12 期 436 篇论文被下载次数为 53476, 最高下载次数为 2255. *WJG* 2003 年自引次数的百分点由 2002 年 94.27%, 下降到 73.24%, 他刊引用的篇数和次数分别上升了 250 (304.87%), 287(337.64%). 2004 年 1-3 月他引用的次数 223, 平均 73.3 次. 根据以上数字可以看出, 从 2003 年开始 *WJG* 正在快速发展, 他刊引用的篇数和次数显著增长.

2 *WJG* 的进展情况, 请阅读以下文章

Articles published in *World Journal of Gastroenterology* are cited by 361 ISI-SCI covered journals during January 1998- February 2004. *World J Gastroenterol* 2004 ;10(11):1690-1693. 全文见 :<http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/1690.asp>

Ma LS, Pan BR. A total of 484 articles published in *World Journal of Gastroenterology* are cited by 361 ISI-SCI covered journals distributed in 38 countries during 1998-2003. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9): 1233-1237. 全文见 :<http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/1233.asp>

Ma LS, Pan BR, Ma JY, Xu JY, Wu XN, Wang XL, Lu HM, Xia HHX, Liu HX, Zhang JZ, Su Q, Ren SY, Zhu L, Zhu LH, Lu YY. Towards a higher international standard - *World Journal of Gastroenterology* will be published semimonthly in 2004. *World J Gastroenterol* 2004; 10(1): 1-4. 全文见 :<http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/1.asp>

马连生, 潘伯荣, 马景云, 徐家裕, 巫协宁, 王先林, 陆汉明, 夏华向, 张建中, 苏勤, 任师颜, 朱立, 朱丽虹, 吕有勇. 创办具有中国特色的国际先进水平的 *WJG*: 2004 年由月刊改为半月刊. *世界华人消化杂志* 2003;11(11):1661-1664. 全文见 :<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1661.asp>

3 期刊荣誉

ISI JCR 2000-2002 Impact Factor of *WJG* was 0.993, 1.445 and 2.532 respectively. A total of 687 articles published in *WJG* were cited by 389 ISI-SCI covered journals distributed in 39 countries during January 1998 - March 2004. The *WJG* is supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30224801) and holds certificates of the 100 Outstanding Academic Journals of China 2002, National Journal Award, Journal of the Statistic Source of Papers on Science and Technology of China and Key Journals of China Science and Technology, and covered by Index Medicus, MEDLINE, PubMed, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstracts Journals, Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology, CAB Abstracts and Global Health.

总之, 为适应胃肠病学和肝病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, *WJG* 将从 2005 年开始, 由半月刊改为周刊, 大 16 开, 160 页, 每月 7, 14, 21, 28 日出版. *WJG* 将完全按照国际标准办刊, 从收稿到出版的管理, 已完全实现市场化, 以质量为本. 从收稿到出版或退稿, 以公正科学的态度处理每一份稿件. 在学术水平和编辑质量方面以国际最优秀的期刊为目标. *WJG* 争取在国家、作者、读者, 全体编委和社会的大力支持下, 办成一份国际本专业具有突出影响的学术期刊.

拉米夫定治疗儿童乙型肝炎

黄燕萍, 成军, 杨 媛, 白桂芹, 杨艳杰, 张树林

黄燕萍, 成军, 杨媛, 白桂芹, 杨艳杰, 张树林, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

慢性HBV感染可引起小儿慢性肝损害甚至发生肝细胞癌,严重影响小儿身体健康.拉米夫定是治疗成人HBV感染的有效药物之一,在儿童乙型肝炎中应用较少,本文讨论了拉米夫定的药理学作用和治疗儿童HBV感染的依据,并重点探讨了儿童HBV感染后应用拉米夫定在不同剂量、不同疗程、与干扰素不同联合等治疗方法中,他们的安全性和疗效,并分析了影响拉米夫定疗效的可能因素.

黄燕萍, 成军, 杨媛, 白桂芹, 杨艳杰, 张树林. 拉米夫定治疗儿童乙型肝炎. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1678-1681

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1678.asp>

0 引言

儿童较成人和青少年更易感染慢性HBV,围产期HBV感染的婴儿有90%发展为慢性HBV感染的危险^[1],儿童期感染HBV后,易成为慢性带毒状态或致慢性肝损害或肝细胞癌(HCC)^[2-3],治疗困难.针对慢性乙型肝炎两种主要的治疗是免疫调节剂和抗病毒药物.基因工程IFN α 是公认的治疗慢性HBV感染的有效药物之一,但因其有效适应证少,远期有效率低和有一定的不良反应,而无法成为治疗HBV感染的主要药物.拉米夫定是目前惟一可用的口服治疗并且安全、高效、直接抗HBV感染的药物,已在我国用于慢性HBV感染的治疗,在成人HBV感染中取得了很好的临床效果,但在小儿慢性HBV感染的患者中应用较少,正处于研究中.

1 拉米夫定的药理学作用和治疗儿童慢性乙型肝炎的依据

拉米夫定全称 2', 3' - 双脱氧 - 3 - 硫代胞嘧啶核苷,简称 3TC,是一种新一代的核苷类抗病毒药物^[4].其抑制HBV复制的作用主要是药物在细胞内经磷酸化后,与脱氧胞嘧啶核苷竞争,进入合成中的病毒DNA

链,使其不能继续延伸而终止复制,拉米夫定可明显降低病毒和抗原的数量,同时能恢复长期处于对HBV低反应状态的T细胞功能,加强了机体对HBV的清除作用,终止HBV在肝内循环感染过程.靶抗原的合成和表达减少,使肝脏内的炎症坏死反应日趋好转,肝组织损害得以改善.拉米夫定在治疗剂量下,对正常的细胞分裂无影响,对线粒体DNA合成无抑制作用,因而具有极好的安全性和耐受性,由于其无明显毒副反应,以及服用方便等优势使该药在抗HBV治疗中占领了重要的一席之地.拉米夫定的作用机制是抑制HBV复制,而不是杀灭HBV,对整合于肝细胞中的HBVDNA却无效,停药后病毒复制仍可恢复.

拉米夫定治疗成人慢性乙型肝炎的疗效已得到证明,但对于小儿慢性乙型肝炎的报道较少.国内“拉米夫定临床应用指导意见”未将小儿列入治疗对象或研究观察对象.HBV感染后的病毒清除最常发生于青年人, Lee et al^[5]发现儿童HBsAg携带者,通常大于7岁.一般8岁以前早期感染的慢性乙型肝炎病毒患者,尚无HBVDNA整合进入宿主DNA,在理论上为可治愈期^[6].对于HBV感染不久的儿童慢性乙型肝炎患者,能在发生基因整合之前,尤其是已发生病毒清除反应(肝炎活动)者中,给予及时、有效的抗病毒治疗,可能会收到事半功倍的效果.美国FDA已批准拉米夫定治疗儿童慢性乙型肝炎.拉米夫定治疗的目标是:(1)临床症状体征改善;(2)病毒学标志改善,HBVDNA和HBeAg的阴转以及HBeAg/抗-HBe的血清转换;(3)肝脏生化功能指标明显(ALT、胆红素、白蛋白和凝血酶原时间等)恢复正常;(4)肝脏组织病理学改善;(5)提高患者生活质量及改善远期预后,降低肝硬化和原发性肝癌的发生率.

2 用药方法及疗效

儿童HBV感染应用的两种抗病毒药物已经得到美国FDA的认可:IFN α , 6 MU/m², 3次/wk, sc, 共6mo;拉米夫定每天3 mg/kg,口服,共12mo.用拉米夫定治疗的儿童中,有50-65%的儿童在治疗12mo后,清除了HBVDNA,但复发率不明确^[7].拉米夫定的临床药代动力学研究^[8]显示,在成人和儿童其绝对生物利用度分别约为82%和68%,儿童低于成人. Keam et al^[9]对剂量范围研究明确了口服拉米夫定为每天3 mg/kg到最大剂量100 mg/d,有最佳效果,及对慢性HBV感染和有效病毒复制(慢性乙型肝炎)的、年龄为2-12岁儿童和13-17岁青少年的血清HBVDNA水平最大程度降低

有较好的耐受性,证实了部分患者有病毒学反应(血清HBeAg消失和检测不到HBV DNA水平).拉米夫定治疗的儿童及青少年中有19%酪氨酸-蛋氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸(YMDD)变异的HBV出现,但这些患者血清谷丙转氨酶(ALT)和HBV DNA水平保持在基线以下.大多数慢性乙型肝炎的儿童及青少年对口服拉米夫定有较好的耐受性.

Jonas et al^[10]对403例慢性乙型肝炎儿童进行筛选后按2:1比例随机分组,191例接受口服拉米夫定(3 mg/kg,最大100 mg),97例接受安慰剂,1次/d,治疗52 wk.治疗结束时,接受拉米夫定的儿童病毒学反应率高于接受安慰剂者(23%和13%, $P=0.04$).拉米夫定治疗有较好的耐受性及与HBeAg到抗-HBe的血清转化率、ALT水平正常化和HBV DNA的抑制相关.结果提示用拉米夫定52 wk的治疗比安慰剂有更高的病毒学反应率.Sokal et al^[11]认为拉米夫定对转氨酶较高的乙型肝炎患者最有效,而对静止期的患者无效.对失代偿的患者,拉米夫定能稳定和改善肝功能,使患者能安全、且有机会等待移植.结合乙型肝炎免疫球蛋白,拉米夫定可大大降低移植后移植物再感染风险,他对慢性HBeAg阴性的肝炎患者、IFN α 效果不佳的患者也有一定的疗效.但拉米夫定可引起YMDD变异的出现,阻碍药物进一步的疗效,可导致肝炎的突发.Sokal et al^[12]针对儿童及青少年慢性乙型肝炎研究了拉米夫定药代动力学、安全性、疗效与剂量的相关性.对53例有病毒复制的慢性乙型肝炎儿童进行了拉米夫定4 wk治疗和停药12 wk的观察研究.年龄为2-12岁的儿童随机接受拉米夫定口服0.35, 1.5或4 mg/kg, 2次/d,或3 mg/kg 1次/d的治疗,年龄为青少年3-17岁每日接受拉米夫定100 mg(片剂)的治疗.治疗后1 d和28 d采血进行拉米夫定药代动力学分析,结果显示拉米夫定口服后迅速被吸收,于30 min-1 h可获得最大血清浓度.年龄越小口服后清除率越高,青少年与成人相似.各种剂量均可降低血清HBV DNA水平,治疗4 wk后HBV DNA下降的中位数>99.5%.通过Chiron Quantiplex方法进行抗HBV DNA作用的血清药物浓度-时间曲线下(AUC)区域测量分析,显示了每天3 mg/kg有最大抗病毒的效果,无论给予药物4 mg/kg, 2次/d,还是1次/d,效果无明显增加.HBV DNA水平下降,青少年组与儿童组相似.研究结果表明慢性乙型肝炎的儿童和青少年用拉米夫定治疗时对各种剂量均有较好的耐受性,没有显著的不良作用或实验室数据的变化.在药代动力学和药效学数据的基础上,2-12岁的慢性乙型肝炎儿童每天3 mg/kg剂量可达到与成人100 mg/d相似的血清浓度和疗效.

Zollner et al^[13]对43例慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗HBV亚型依赖反应12 mo纵向调查.结果发现HBV亚型ayw较HBV亚型adw单用拉米夫定治疗出现更好地反应($P=0.005$).在随访中发现HBV亚型ayw感染的患者有较低的拉米夫定耐药株的发生.Kocak et al^[14]报告了对

IFN α 无效的55例儿童慢性乙型肝炎患者用拉米夫定治疗6 mo的研究结果及报告了^[15]54例儿童慢性乙型肝炎患者应用拉米夫定治疗52 wk的结果,患儿的HBV DNA阴转率分别为56.4%和64.8%,HBeAg阴转分别为12.7%和7.5%,抗-HBe血清转化分别为12.7%和5.5%.治疗前ALT异常的患儿疗效优于ALT正常的患儿.研究结果显示拉米夫定对儿童HBV DNA和HBeAg的疗效无年龄和性别的差异,与成人的结果相似,拉米夫定对儿童患者长期应用较为安全.Hartman et al^[16]用拉米夫定治疗对IFN α 治疗无效的儿童慢性乙型肝炎感染,选择了20名年龄8.5-19岁的儿童和青少年,经IFN α 2-5 a治疗的儿童慢性乙型肝炎,给予拉米夫定每天3 mg/kg(最大量100 mg/d),52 wk.1 a治疗结束后,95%的患者HBV DNA降低,44%的患者通过杂交方法始终未测到HBV DNA,ALT中位数从正常值上限 $\times 1.5$,降至 $\times 0.9$,1例儿童HBeAg为阴性,但17例儿童中有11(65%)例测到YMDD变异.没有观察到副作用.研究结果提示对IFN α 耐药的慢性乙型肝炎儿童,用拉米夫定治疗能降低HBV复制和ALT,且较安全,但拉米夫定可导致较高的耐药变异率和较低的血清转化率.Broderick et al^[17]认为拉米夫定和IFN α 对儿童慢性乙型肝炎治疗是有用的,但其对儿童慢性HBV感染的最佳治疗方案还正在研究中,将更好地了解血化指标的变化、药物应用时间及疗效、治疗的不良作用等.

Dikici et al^[17]对儿童慢性乙型肝炎感染用IFN α 治疗与拉米夫定和IFN α 联合治疗进行比较.第1组27例患者给予 α -2b干扰素,10 MU/m², 3 d/wk, sc,同时拉米夫定每天4 mg/kg(最大量100 mg),共12 mo;第2组13例患者仅接受相同剂量的 α -2b干扰素治疗,在治疗结束时,组1所有的患者及组2中有6例HBV DNA清除($P<0.001$).HBeAg清除率和HBeAb血清转化率在组1分别是59%和37%,在组2分别是46%和30.7%($P>0.05$).组1中ALT从初始的平均值 121 ± 66 nkat/L降低至 27.8 ± 11.5 nkat/L,组2中ALT从初始的平均值 129 ± 46 nkat/L降低至 60 ± 6 nkat/L($P<0.05$).研究结果提示IFN α 和拉米夫定联合治疗其ALT正常化和HBV DNA清除效果较IFN α 单项治疗更好.Lagget et al^[18]也证实拉米夫定和IFN α 联合治疗效果优于单用拉米夫定或单用IFN α 治疗效果.Dikici et al^[19]又对IFN α 和拉米夫定不同联合方案治疗进行了比较,第1组患者接受IFN α 10 MU/m²和拉米夫定4 mg/kg(max 100 mg)同时用6 mo,继之单用拉米夫定6 mo;第2组初始单用拉米夫定2 mo后,加用IFN α 6 mo,停用IFN α 后再单用拉米夫定4 mo.两组的拉米夫定和IFN α 用量相同.研究结果表明两种不同的联合治疗的比较显示在ALT正常化、HBeAg和HBV DNA清除、抗-HBe血清转化率相似.但Lacaille et al^[20]认为许多感染HBV的儿童并无明显临床症状,是否积极选择药物治疗还有争议.拉米夫定实现

HBeAg血清转换率并不理想,且拉米夫定对儿童与成人均有相似的高耐药率,有学者研究结果显示,拉米夫定治疗1a后,在14-32%患者中检测到拉米夫定相关耐药的HBV株^[21-24],而治疗2,3,4a后则有38%,57%和66%患者中检测到拉米夫定相关耐药的HBV株^[25-27],故长期治疗的效果及安全性尚待进一步研究。

总之,拉米夫定儿童治疗剂量为每天3 mg/kg(最大量100 mg/d),疗程1a,被认为是安全、有效的;拉米夫定对ALT异常的患者疗效优于ALT正常的患者;拉米夫定与IFN α 联合治疗优于单用IFN α 疗效;拉米夫定对IFN α 治疗无效的慢性乙型肝炎患者仍有效,为此类患儿提供了希望。

3 影响拉米夫定疗效的因素

HBV产生耐药机制是因其多聚酶的酶活性区发生YMDD的变异.长期应用拉米夫定可诱导HBV变异而产生耐药性,使血清中已经阴转的HBV DNA重新阳转及水平升高,甚至病情复发. Zhou et al^[28]的研究结果显示HBV YMDD耐药的出现与一定的HBV基因型相关.拉米夫定的作用机制是抑制HBV而不是杀灭HBV,肝细胞内的HBV能否彻底清除主要取决于机体的免疫力,故停药后受到拉米夫定抑制的病毒又重新活动起来,恢复病毒复制,导致肝炎复发.未严格掌握适应证:拉米夫定适用于HBV复制的慢性乙型肝炎.拉米夫定对转氨酶较高的乙型肝炎患者有效,而对静止期的患者无效. HBeAg的清除可能与HBV基因型有关,与B基因型相比,C基因型有更高的HBeAg阳性率,分别为16%与53%. B基因型较C基因型对拉米夫定有更好的病毒学反应^[29],但Chan et al^[30]进行了拉米夫定治疗后HBV基因型与HBeAg血清转化相关性研究,结果表明HBV基因型B和C患者的HBeAg血清转化率分别为28%和18%($P=0.30$),故而认为拉米夫定治疗后HBeAg血清转化不受HBV基因型影响. Hagmann et al^[31]对16例HBV感染的儿童用拉米夫定治疗后回顾性研究发现,HBeAg清除与治疗前高ALT水平、低血清HBV DNA载量、病毒抑制水平及初治时的年龄相关. Chien et al^[32]研究结果也显示HBV基因型、年龄、附加治疗因素主要决定着对拉米夫定治疗的HBeAg持续反应。

总之,拉米夫定对慢性乙型肝炎的治疗是一种突破,用于儿童慢性乙型肝炎安全有效,使失代偿期肝硬化患者肝功能、肝组织学得到改善,对出现YMDD变异者继续服用拉米夫定仍有效,仍能获得HBeAg血清转换、继续抑制野生型HBV.医生要正确掌握拉米夫定治疗的时期,决定患儿是否应该使用拉米夫定治疗,是否结合免疫调节剂的应用.对长期服药的患儿,应进行随访和检测,观察远期疗效、免疫功能恢复情况等,减少病毒的变异和耐药的发生.提高和改善慢性乙型肝炎患者生活质量,对患者、家庭和社会均有益处。

4 参考文献

- 1 Broderick AL, Jonas MM. Hepatitis B in children. *Semin Liver Dis* 2003;23:59-68
- 2 Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:351-366
- 3 Hsieh CC, Tzonou A, Zavitsanos X, Kaklamani E, Lan SJ, Trichopoulos D. Age at first establishment of chronic hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma risk: a birth order study. *Am J Epidemiol* 1992;136:1115-1121
- 4 Doong SL, Tsai CH, Schinazi RF, Liotta DC, Cheng YC. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in viro by 2' 3' dideoxy 3' thicacytidine and related analogues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8495-8499
- 5 Lee PI, Chang MH, Lee CY, Hsu HY, Chen JS, Chen PJ, Chen DS. Changes of serum hepatitis B virus DNA and aminotransferase levels during the course of chronic hepatitis B virus infection in children. *Hepatology* 1990;12:657-660
- 6 姚桢著. 分子乙型肝炎病毒相关病学. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1998:40-46
- 7 Schwarz KB. Pediatric issues in new therapies for hepatitis B and C. *Curr Gastroenterol Rep* 2003;5:233-239
- 8 Johnson MA, Moore KH, Yuen GJ, Bye A, Pakes GE. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:41-66
- 9 Keam SJ, Scott LJ. Lamivudine: in children and adolescents with chronic hepatitis B virus infection. *Paediatr Drugs* 2002;4:687-696
- 10 Jonas MM, Kelley DA, Mizerski J, Badia IB, Areias JA, Schwarz KB, Little NR, Greensmith MJ, Gardner SD, Bell MS, Sokal EM. International Pediatric Lamivudine Investigator Group. Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002;346:1706-1713
- 11 Sokal E. Lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:329-339
- 12 Sokal EM, Roberts EA, Mieli-Vergani G, McPhillips P, Johnson M, Barber J, Dallow N, Boxall E, Kelly D. A dose ranging study of the pharmacokinetics, safety, and preliminary efficacy of lamivudine in children and adolescents with chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:590-597
- 13 Zollner B, Petersen J, Schafer P, Schroter M, Laufs R, Sterneck M, Feucht HH. Subtype-dependent response of hepatitis B virus during the early phase of lamivudine treatment. *Clin Infect Dis* 2002;34:1273-1277
- 14 Kocak N, Ozen H, Saltik IN, Gurakan F, Yuce A. Lamivudine for children with chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2989-2990
- 15 Kocak N, Saltik IN, Ozen H, Yuce, Gurakan F. Lamivudine treatment for children with interferon refractory chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000;31:545
- 16 Hartman C, Berkowitz D, Shouval D, Eshach-Adiv O, Hino B, Rimon N, Satinger I, Kra-Oz T, Daudi N, Shamir R. Lamivudine treatment for chronic hepatitis B infection in children unresponsive to interferon. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:224-229
- 17 Dikici B, Bosnak M, Bosnak V, Dagli A, Davutoglu M, Yagci RV, Haspolat K. Comparison of treatments of chronic hepatitis B in children with lamivudine and alpha-interferon combination and alpha-interferon alone. *Pediatr Int* 2002;44:517-521
- 18 Lagget M, Rizzetto M. Current pharmacotherapy for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:1821-1827
- 19 Dikici B, Bosnak M, Bosnak V, Dagli A, Ece A, Yagci RV, Haspolat K. Combination therapy for children with chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1087-1091
- 20 Lacaille F. Lamivudine treatment for children with interferon refractory chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000;32:1180-1180
- 21 Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A

- one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998;339:61-68
- 22 Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. The US Lamivudine Investigator Group. *N Engl J Med* 1999;341:1256-1263
- 23 Schalm SW, Heathcote J, Cianciara J, Farrell G, Sherman M, Willems B, Dhillon A, Moorat A, Barber J, Gray DF. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patient with chronic hepatitis B infection: a randomized trial. *Gut* 2000;46:562-568
- 24 Lau DT, Khokhar MF, Doo E, Ghany MG, Herion D, Park Y, Kleiner DE, Schmid P, Condreay LD, Gauthier J, Kuhns MC, Liang TJ, Hoofnagle JH. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 2000;32:828-834
- 25 Liaw YF, Leung NW, Chang TT. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;119:172-180
- 26 Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condreay LD, Chien RN. On behalf of the asia hepatitis lamivudine study group. Extended lamivudine treatment in patient with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: result after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001;33:1527-1532
- 27 Wong VW, Chan HL, Wong ML, Tam JS, Leung NW. Clinical course after stopping lamivudine in chronic hepatitis B patients with lamivudine-resistant mutants. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:323-329
- 28 Zhou DY, Lin LY, Wang H, Huang JS. The relationship between HBV lamivudine resistance and HBV genotypes or basic core promoter mutations. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:85-89
- 29 Kao JH. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Intervirology* 2003;46:400-407
- 30 Chan HLY, Wong ML, Hui AY, Chim AML, Tse AML, Hung LCT, Chan FKL, Sung JY. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:2695-2697
- 31 Hagmann S, Chung M, Rochford G, Jani M, Trinh-Shevrin C, Sitnitskaya Y, Neumann AU, Pollack H. Response to lamivudine treatment in children with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis* 2003;37:1434-1440
- 32 Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM, Liaw YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003;38:1267-1273

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

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 2005 年将改为周刊

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国消化病学领域中惟一以全英文发表原创性论文的国际性学术期刊。WJG 创刊于 1995 年,原名《China National Journal of New Gastroenterology》,1998 年更名为 WJG,由世界胃肠病学杂志社出版。WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327,国内统一刊号 CN 14-1219/R,月刊,大 16 开,256 页,邮发代号 82-261,北京报刊发行局发行。为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展,以及日益增多的国际科技交流的需要,从 2005 年开始,WJG 将由半月刊改为周刊,大 16 开,160 页,每月 7、14、21、28 日出版。

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

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

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

拉米夫定治疗乙型肝炎相关失代偿期肝硬化的进展

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 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 100038
张连峰, 郑州大学第一附属医院消化内科 郑州市 450052
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

乙型肝炎病毒在体内的复制引起肝炎、肝硬化, 拉米夫定是目前抗 HBV 的主要药物之一. 拉米夫定通过抑制或干扰 HBV 病毒复制过程中反转录酶的活性而发挥其抗 HBV 作用, 可以延缓慢性乙型病毒性肝炎患者进展为失代偿期肝硬化的进程. 对于失代偿期肝硬化患者, 拉米夫定可以改善肝脏储备功能和生存率, 降低原发性肝癌的发生率, 而且安全、有效.

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江. 拉米夫定治疗乙型肝炎相关失代偿期肝硬化的进展. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1682-1684
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1682.asp>

0 引言

乙型肝炎后肝硬化的发病机制主要为乙型肝炎病毒 (HBV) 在体内持续复制、不断表达和释放抗原, 持续引起肝内炎症活动, 使肝内纤维化不断加重, 最终导致肝硬化^[1]. 因此对有 HBV 复制的肝硬化患者, 给予抗病毒治疗, 消除引起肝细胞损伤的启动因素, 进而消除或减轻肝脏的免疫反应, 可以达到治疗的目的^[2]. 现在发现的大多数抗 HBV 的核苷类似物, 他们通过干扰或抑制 HBV 病毒的复制而起抗病毒作用, 更昔洛韦、阿昔洛韦与潘昔洛韦等是第一代用于抗 HBV 治疗的核苷类药物, 但他们在体内的抗病毒效果并不能令人满意. 新近, 以拉米夫定为代表的第二代核苷类药物, 已用于慢性 HBV 感染的治疗, 显示了较强的抗 HBV 活性. 从已发表的国内外资料看, 乙型肝炎病毒无症状携带者 (ASC)、慢性活动性肝炎及失代偿期肝硬化、肝移植患者中, 拉米夫定均显示了良好的抗 HBV 作用. 拉米夫定的 HBV DNA 转阴率在 90% 以上 (以斑点杂交法检测 HBV DNA), 且能使多数患者血中转氨酶转为正常, 对肝组织病理也有相当明显的改善作用. 最近研

究发现对干扰素 α (IFN α) 不敏感的具有前 -C 区变异的 HBV, 应用拉米夫定后亦取得了良好的治疗效果.

1 作用机制和用法

拉米夫定是一种脱氧胞嘧啶核苷类似物, 全称为双脱氧 -3 硫胞嘧啶核苷 (2', 3' dideoxy-3-thiacytidine, 3TC), 20 世纪 90 年代末问世. 他的作用机制在于作为核苷类似物, 其与天然胞嘧啶核苷起竞争抑制作用. 药代动力学表明, 拉米夫定口服迅速吸收, 生物利用率 82%, 吸收后的拉米夫定大部分以原形自尿中排泄. 拉米夫定通过抑制或干扰 HBV 病毒复制过程中反转录酶的活性而发挥其抗 HBV 作用; 其作用点位于 HBV 反转录酶的活性部位 - 酪氨酸 - 蛋氨酸 - 天门冬氨酸 - 天门冬氨酸 (YMDD 结构域). 拉米夫定先在细胞内磷酸化, 形成三磷酸拉米夫定 (3TC-TP), 与靶点结合后, 竞争性抑制靶点的天然胞嘧啶核苷, 从而抑制 HBV 多聚酶逆转录活性, 使病毒逆转录过程中止, 病毒不能伸展, 结果抑制 HBV 复制. 根据 2003 年拉米夫定临床应用专家共识, 拉米夫定适用于伴有丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 升高和病毒活动复制的、肝功能代偿的成年慢性乙型肝炎患者的治疗. 治疗疗程至少 1 a. 用法为 100 mg, 口服, 1 次 /d. 但对于有失代偿性肝病基础的患者, 如 ALT 大于正常值高限 5 倍, 或伴有胆红素等生化指标异常, 出现肝硬化失代偿迹象者不应轻易停药, 应进行积极对症保肝治疗, 并密切观察病情变化^[3].

服用拉米夫定会引起乏力、恶心、腹泻、皮疹、肌痛、病毒性上呼吸道感染等, 但均能耐受^[4]. 也有报道在 6 例 12-15 岁患者中, 拉米夫定致锥体外系反应, 停药后消失^[5]. 2 例发生肾结石^[6]. 长期使用拉米夫定是安全、有效的^[7]. 也有少数患者会出现无反应, 并非所用拉米夫定者血清 HBV DNA 都能转阴, 停药后可导致病毒血症复发^[8], 有些病例在长期用药过程中发生耐药性. 目前认为形成耐药性的机制是长期用药后诱导了 HBV 多聚酶 YMDD 定点突变的结果. 拉米夫定所致的定点突变最常见者是 HBV 多聚酶基因区第 741 位鸟嘌呤核苷 (G) 被胸嘧啶核苷 (T) 取代, 使原编码的第 550 位蛋氨酸 (M550) 变成异亮氨酸 (I550), 即 YMDD 基序变为 YIDD; 或第 739 位腺嘌呤核苷 (A) 被鸟嘌呤核苷 (G) 取代, 使原编码的第 550 位蛋氨酸 (M550) 变成缬氨酸 (V550), 即 YMDD 基序变为 YVDD. 这 2 种定点突变称作 M550I/V 或 TMDD 变异. 由于变异, 拉米夫定结合靶点失去了 YMDD 的正常, 对该药结合的敏感性则大大

降低, 使拉米夫定对 HBV 前基因组 RNA 逆转录的酶促过程不能抑制, 从而造成耐药. YMDD 变异发生后大多数患者出现 HBV DNA 阳性, ALT 升高, 甚至出现黄疸, 病情恶化^[9]. 但长期服用拉米夫定不发生 YMDD 变异者, 则可获得较长久疗效.

2 拉米夫定与失代偿期肝硬化

对于伴有或不伴肝硬化的慢性乙型肝炎患者, 拉米夫定都是一种有效的治疗药物^[10-11]. 首先, 拉米夫定可以延缓慢性乙型病毒性肝炎患者进展为失代偿期肝硬化的进程. 拉米夫定在有效抑制 HBV 的同时, 能够降低患者血清的透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、III 型前胶原(PCIII)、IV 型胶原(C-IV)的水平, 进而达到防治肝纤维化的目的^[12]. 使用拉米夫定3 a后的组织学变化表现为肝脏炎症坏死减轻, 肝纤维化、肝硬化得到一定程度逆转^[13]. 其次, 拉米夫定可以降低失代偿期肝硬化患者的死亡率, 延长生存期. 以年龄、性别、Child-Pugh-Turcotte (CPT)得分作为匹配条件, 对因 HBV 复制所致的严重的失代偿期肝硬化患者, 采用拉米夫定治疗, 60.9%的患者 CPT 得分得到显著改善. 对于未行肝移植术的患者, 与对照组相比, 死亡率明显降低. 生存期、以及至行肝移植的时间明显延长. 但经 9-12 mo 的治疗后, 也有 2 例患者出现拉米夫定耐药^[14]. 再次, 拉米夫定与肝脏再生的关系有待进一步研究. 有人报道 1 例晚期乙型肝炎肝硬化患者, 应用拉米夫定治疗 150 mg/d 治疗后 12 wk, 通过放射标记肝脏单光子发射计算机摄影(SPECT)和特异性肝脏结合蛋白及^{99m}Tc 半乳糖人血清白蛋白水平计算, 有功能的肝体积由 913 mL 增至 1 068 mL, 肝脏迅速再生, 同时临床状态和肝功能也显著改善^[15]. 此外, 拉米夫定有助于改善失代偿期肝硬化患者的并发症. 有人对慢性乙型肝炎所致的失代偿期肝硬化再发肝性脑病患者采用拉米夫定治疗, 发现肝性脑病在 2 a 内没有再发, 而且肝功能得到改善. 说明用拉米夫定改善肝功能后, 有助于预防肝性脑病的再发^[16]. 也有研究表明, 用拉米夫定治疗失代偿期肝硬化, 原发性肝癌发生率与对照组相比有显著降低^[17].

对于因乙型肝炎相关失代偿期肝硬化而行肝移植术的患者, 拉米夫定用于手术前后, 可以显著提高患者的生存率. HBV 相关终末期肝病是否可以作为肝移植的适应证曾有争论, 争论的焦点主要在于术后乙型肝炎复发问题, 故在 1990 年初期血清 HBV DNA 阳性者属于相对禁忌证. 拉米夫定为肝炎相关疾病的肝移植术开展提供了有力的保障. 拉米夫定应用于肝移植术前, 可引起病毒学改变如抗-HBs 转为阳性, 生化改变, 进而改善临床症状如腹水、肝功能等, 提高患者的 2 a 生存率^[18]. 那么, 拉米夫定对于肝移植术后的患者, 又有什么意义呢? 乙型肝炎病毒相关失代偿期肝硬化肝移植围手术期存活率与其他肝病相差无几, 但复发或再感染后病情进展迅速, 死亡率高^[19]. 有效的预防及治

疗复发或再感染, 可以改善肝移植的预后. 有人报道, 用拉米夫定可以将肝移植(乙型肝炎相关)后患者的乙型肝炎再发率降低^[20]. 由此可见, 在慢乙型肝炎^[21]所致的失代偿期肝硬化患者, 在行肝移植手术前后进行抗病毒治疗是必要、安全和有效的. 此外, 拉米夫定对 HBV 相关的急性暴发性肝坏死而行的原位肝移植患者, 也是安全、有效的^[22].

近来, 拉米夫定的停药反跳问题已引起人们的关注. 停用拉米夫定不但可以导致慢性乙型肝炎急性重度发作的报道^[23], 甚至可以使乙型肝炎肝硬化加重, 有作者报道, 一患者服拉米夫定 18 mo, 停药后病情进行性加重, 先后出现肝性脑病、原发性腹膜炎、肝肾综合征、电解质紊乱及上消化道出血, 于住院第 19 d 死亡^[24]. 日本也有突然停药致肝功能衰竭的报道^[25]. 有人对拉米夫定的停药问题进行了探讨, 发现在停用拉米夫定时采用综合措施, 如逐渐减量, 或使用某些保肝药及与拉米夫定有协同作用的药物, 可使患者在停药后病情“反跳”以及病情加重、恶化的发生率下降^[26].

总之, 在乙型病毒性肝炎所致的失代偿期肝硬化, 拉米夫定的作用表现为以下几方面: 通过抑制病毒复制而改善肝功能, 使血清 HBV DNA 减少至检测不出的水平; 使血清白蛋白升高, Child-Pugh 得分下降; 使血清 HBeAg 阳性患者转为抗-HBe^[27-29]; 对 HBeAg 阴性的乙型肝炎也有良好疗效^[30]. 此外, 拉米夫定有助于 HBV 相关肝细胞肝癌的切除^[31]. 对于非肝移植适应证的失代偿期肝硬化患者, 拉米夫定可以显著改善肝功能^[32]. 由此可见, 拉米夫定对失代偿的乙型肝炎肝硬化患者能改善肝脏储备功能和生存率, 降低原发性肝癌的发生率, 且应用安全. 因病毒变异出现的疗效下降, 则需寻找更有效的治疗措施如原位肝移植等.

3 参考文献

- 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床. 人民卫生出版社, 2002:87
- 郭庆英, 吕鹏, 曹建华. 拉米夫定治疗乙型肝炎后失代偿期肝硬化的临床研究. 中国新药杂志 2002;6:488-490
- 拉米夫定临床应用专家组. 2003 年拉米夫定临床应用专家共识. 现代实用医学 2003;8:524-527
- 林向飞, 韩清锡, 林秀英. 拉米夫定治疗失代偿期乙型肝炎肝硬化的随机对照研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;1:57-59
- 刘春安, 柴同海, 郝清华. 拉米夫定致锥体外系反应六例. 中华医学杂志 2003;2:95-97
- 蔡皓东, 马秀云. 拉米夫定治疗乙型肝炎期间发生肾结石 2 例. 药物不良反应杂志 2001;4:249-251
- Park TW, Park YM, Bae SH, Jang JW, Nam SW, Choi JY, Yoon SK, Cho SH, Yang JM, Han NI, Ahn BM, Lee YS, Lee CD, Park DH. Efficacy and safety of lLong-term lamivudine therapy in the patients with decompensated liver cirrhosis secondary to hepatitis B. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002;4:428-435
- 杜以真, 张琴冈, 刘峰, 费筠华, 王耀宗. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎停药后的复发病例分析. 肝脏 2004;1:5-7
- 梁伟峰, 杨丹红, 沈月洪. 拉米夫定抗乙型肝炎病毒感染中 YMDD 变异类型及时间研究. 中华肝病杂志 2003;5:302-304
- Oh JM, Kyun J, Cho SW. Long-term lamivudine therapy for chronic hepatitis B in patients with and without cirrhosis. *Pharmacotherapy* 2002;10:1226-1234
- Fontana RJ. Management of patients with decompensated HBV cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2003;23:89-100

- 12 胡冰, 刘春玲. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎对肝纤维化指标的影响. *中华传染病杂志* 2003;12:62-63
- 13 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
- 14 Yao FY, Terrault NA, Freise C, Maslow L, Bass NM. Lamivudine treatment is beneficial in patients with severely decompensated cirrhosis and actively replicating hepatitis B infection awaiting liver transplantation: a comparative study using a matched, untreated cohort. *Hepatology* 2001;2:411-416
- 15 Saito T, Shinzawa H, Watanabe H, Sugahara K, Okumoto K, Togashi H, Kawata S. Lamivudine and rapid regeneration of the atrophic liver in decompensated cirrhosis due to hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 2002;97:493-495
- 16 Hanada S, Kumashiro R, Kaji R, Harada M, Sata M. Additional benefit of lamivudine treatment as a preventive therapy for hepatic encephalopathy in patients with decompensated liver cirrhosis associated with hepatitis B. *Int J Mol Med* 2002;5:647-648
- 17 林向飞, 韩清锡, 林秀英. 拉米夫定治疗失代偿期乙型肝炎肝硬化的随机对照研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;1:57-59
- 18 Liu CL, Fan ST, Lo CM, Wei WI, Yong BH, Lai CL, Wong J. Live-donor liver transplantation for acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Transplantation* 2003;8:1174-1179
- 19 郑树森, 黄东胜, 王伟林. 71例人体原位肝移植对终末肝病的治疗. *中华肝脏病杂志* 2002;1:7-9
- 20 Chan HL, Chui AK, Lau WY, Chan FK, Wong ML, Tse CH, Rao AR, Wong J, Sung JJ. Factors associated with viral breakthrough in lamivudine monotherapy of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *J Med Virol* 2002;2:182-187
- 21 Todo S, Furukawa H, Matsushita M, Shimamura T, Jin MB, Suzuki T, Taniguchi M. Liver transplantation for patients with hepatitis B/C virus cirrhosis or hepatocellular carcinoma. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2002;5:408-413
- 22 Huang J, He X, Chen G, Zhu X, Lu M, Wang G, Fu Y, Yang Y, Guan X. Liver transplantation at the Sun Yat-Sen University of Medical Sciences in China. *Chin Med J* 2002;4:543-548
- 23 李志莹. 停药拉米夫定致慢性乙型肝炎急性重度发作1例. *中国肝脏病杂志* 2004;9:4
- 24 代永安, 骆名其, 高士成. 拉米夫定治疗乙型肝炎肝硬化停药后病情加重1例. *中华全科医师杂志* 2004;3:126
- 25 程书权. 关注拉米夫定的不良反应. *中国乡村医药杂志* 2004;2:33
- 26 成娟, 瞿淑贞. 拉米夫定停药问题的探讨. *肝脏* 2004;9:71-72
- 27 Manolakopoulos S, Karatapanis S, Elefsiniotis J, Mathou N, Vlachogiannakos J, Iliadou E, Kougioumtzan A, Economou M, Triantos C, Tzourmakliotis D, Avgerinos A. Clinical course of lamivudine monotherapy in patients with decompensated cirrhosis due to HBeAg negative chronic HBV infection. *Am J Gastroenterol* 2004;99:57-63
- 28 Jin RH, Lang ZW, Yao GB, Guo XH. Liver histological changes after lamivudine treating in chronic hepatitis B patients with HBeAg positive. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003;9:555-557
- 29 Heathcote J. Results of lamivudine therapy for HBe antigen positive hepatitis (in the West). *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):106-110
- 30 张定凤. 拉米夫定治疗 HBeAg 阴性乙型肝炎的研究进展. *中华肝脏病杂志* 2001;1:49-52
- 31 Nakanishi S, Michitaka K, Miyake T, Hidaka S, Yoshino I, Konishi I, Iuchi H, Horiike N, Onji M. Decompensated hepatitis B virus-related cirrhosis successfully treated with lamivudine allowing surgery for hepatocellular carcinoma. *Intern Med* 2003;5:416-420
- 32 Hann HW, Fontana RJ, Wright T, Everson G, Baker A, Schiff ER, Riely C, Anschuetz G, Gardner SD, Brown N, Griffiths D. A United States compassionate use study of lamivudine treatment in nontransplantation candidates with decompensated hepatitis B virus-related cirrhosis. *Liver Transpl* 2003;1:49-56

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

• 消息 •

主编: WJG 攀登上了中国期刊从未到达过的高度: 影响因子 3.318, 并且是惟一的全英文专业学术半月刊! 这是你的骄傲, 也是我们大家朋友们的骄傲! 我衷心地向你表示祝贺和敬意. 我认为今后不管有多大的困难, WJG 已经深深地印在了整个中国科技界的脑海中, 这就是对你最大的奖励! 你一定会保持成功的未来. 向你学习, 向你致敬! (编委: 肖宏 2004-06-21)

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

• 消息 •

《胃黏膜损伤与保护 - 基础与临床》出版

由国家重点学科第二军医大学长海医院消化内科博士生导师李兆申教授、湛先保博士和许国铭教授主编的《胃黏膜损伤与保护 - 基础与临床》一书上海科学技术出版社 2004 年 4 月出版, 全书 716 页, 95.4 万字. 该书全面系统地介绍了胃黏膜损伤与保护的基本理论, 以及该研究领域的最新基础研究进展与临床研究现状. 全书共分 35 章, 主要内容包括各类胃黏膜保护因子保护胃黏膜的作用机制, 以及常见的胃黏膜损伤因子(如胃酸及胃蛋白酶、胆汁、幽门螺杆菌、药物、免疫损伤、应激、酒精、吸烟等)损伤胃黏膜的作用机制; 常见的胃黏膜损伤性病变(如酸相关性疾病、幽门螺杆菌相关性疾病、药物相关性疾病、胆汁反流性疾病、酒精性胃黏膜疾病、应激性溃疡等)的基础与临床基本理论, 以及常用的胃黏膜保护性药物临床应用现状. 内容全面、系统、新颖, 叙述详细. 注重基础理论与临床实践相结合, 基本理论与研究进展相结合. 适用于消化内外科临床医师、研究生以及从事相关领域基础研究工作者参考. (江学良编委供稿)

拉米夫定停药后复发的慢性乙型肝炎的抗病毒治疗

郭江, 成军, 赵龙凤, 纪冬

郭江, 成军, 纪冬, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
赵龙凤, 山西医科大学第一附属医院感染病科 山西省太原市 030001
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

乙型肝炎病毒(HBV)的感染是重要的传染病之一。拉米夫定仍是治疗慢性乙型肝炎的一线药物,但由于疗程短及耐药株的出现可引起停药后复发。对于这些患者可以拉米夫定再治疗,联合IFN α 或其他核苷类似物或免疫调节剂治疗,及新药治疗,但这些方法各有优缺点,不能完全解决慢性乙型肝炎的治疗问题。尚需开发更加有效的药物。

郭江, 成军, 赵龙凤, 纪冬. 拉米夫定停药后复发的慢性乙型肝炎的抗病毒治疗. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1685-1687

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1685.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染是重要的传染病之一,全世界有3.5亿慢性携带者,在北美、澳大利亚等地感染率低于总人口的1%,而在中国为5-18%,平均为9.75%,明显高于其他地区。HBV持续感染是导致慢性乙型肝炎、肝硬化和原发性肝癌(HCC)的重要因素。由于乙型肝炎疫苗的预防接种,儿童慢性HBV感染和肝癌(HCC)的发病率明显降低,但由于存在着大量的乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)携带者,他们发展为恶性肝脏疾病的可能性仍然非常的高,因此通过有效的治疗来减少肝硬化、肝细胞癌的发病率、死亡率尤为重要^[1-3]。除了干扰素 α (IFN α),拉米夫定是一在临床治疗慢性乙型肝炎中广泛应用的抗病毒药。他作为一核苷类似物,可抑制依赖RNA的DNA多聚酶,并可整合到病毒DNA中抑制病毒反转录,进而再次抑制病毒蛋白的合成和HBV的复制。但由于拉米夫定一旦停药就不能抑制病毒复制及时间依赖性耐药株的产生,所以在大多数患者停药可引起病毒血症的反跳,引起停药后复发^[4-5]。本文就拉米夫定停药后复发的慢性乙型肝炎的抗病毒治疗作一综述。

1 拉米夫定停药复发原因

拉米夫定治疗病程短可引起停药复发。慢性乙型肝炎患者拉米夫定短期治疗可抑制乙型肝炎病毒DNA,但很少能抑制治疗后病毒复制。Dienstag et al^[6]评价了24例HBeAg阳性患者治疗18 mo的治疗反应及治疗后持续性。所有患者均在HBeAg减少后或HBeAg持续阳性6 mo停止治疗。拉米夫定治疗18 mo可持续抑制HBV复制,HBeAg减少率是短期治疗的3倍。其中7例患者在HBeAg减少或血清转换后停药,HBeAg状态仍可维持。故拉米夫定应在HBeAg减少或血清学转换后停药。

拉米夫定的作用机制是抑制而不是杀灭HBV,肝细胞内的HBV能否消除主要取决于机体的免疫清除能力,因而当停药后病毒复制仍可恢复。临床实践也证明,许多患者停药后出现反跳现象,肝炎复发。长期应用拉米夫定可导致HBV变异株逐渐发展为优势种群。多为多聚酶的YMDD突变,产生耐药性,使血清中已经阴转的HBV DNA重新出现,引起停药后复发。拉米夫定停药多引起野毒株的复发。治疗前高的病毒载量(HBV DNA 12 Meq/mL)是拉米夫定治疗早期生化学复发一决定因素。通过积极治疗降低病毒载量可减少复发^[7-9]。

2 拉米夫定停药后复发再治疗

2.1 单药治疗 拉米夫定再治疗可恢复其对病毒复制的抑制。对免疫系统良好的代偿期肝病患者在HBeAg血清学转换后可停治疗,但当HBV感染复发时可再治疗,而在免疫系统受抑制患者例如肝移植者需要长期免疫抑制治疗,即使已经取得HBeAg血清学转换亦可增加HBV再激活危险,对这些患者停药时间有待确定。Dienstag et al^[10]报道了8例患者因治疗结束后HBV标志物再现而再治疗,7例出现生化和病毒学指标改善(HBeAg血清转换,ALT正常化,HBV DNA缺失为标志),而无显著的不良反应出现。Honkoop et al^[11]观察41例拉米夫定治疗后停药的复发性肝病患者至少6 mo,其中复发肝炎性发生率为17%,黄疸伴早期肝功能衰竭者为5%。拉米夫定停药后复发肝炎表现为HBV DNA与转氨酶同步升高。所有患者均为HBV野毒株(即时1例拉米夫定治疗时即为耐药株)。1例拉米夫定停药后复发的黄疸型患者以拉米夫定再治疗可发生临床生化指标缓解、HBeAg血清转换及HBV载量减少,而5例没有再治疗非黄疸型患者并不出现类似反应。

但Lau et al^[8]研究发现拉米夫定停药复发再治疗导致更多突变株迅速产生。长期拉米夫定治疗可改善HBeAg

阴性慢性乙型肝炎患者和具有高转氨酶 HBeAg 阳性患者的病毒学、生化、组织学特征. 他们观察 27 例以拉米夫定持续治疗 2-4 a 的患者, 血清 HBV DNA 水平在所有患者在 1 a 内快速下降 4-5 log₁₀. Marzano et al^[12]亦描述 1 例终末肝病肝移植后复发以拉米夫定治疗 7 mo 时 HBV DNA 反跳, 在 9 mo 后停药. 拉米夫定停药后 9 mo 患者经历了伴随高 HBV DNA 新的肝病发作. 再以拉米夫定治疗 45 d 后 HBV DNA 水平正常化. 但 3 mo 后拉米夫定耐药菌株变成优势毒株. 这一病例表明 YMDD 突变株第一次出现时拉米夫定再治疗对于控制 HBV 合成是暂时有效的, 但可加速突变株的优势再现. 这提示抗病毒的联合治疗的必要性.

2.2 联合治疗 由于 HBV 与人免疫缺陷病毒(HIV)在分子生物学特性和生活周期上有许多相似之处, 不同作用机制的抗 HIV 药物可组成所谓“鸡尾酒”疗法, 在抗 HIV 治疗中, 有明显效果. 而目前临床应用的抗 HBV 药物作用机制不尽相同, 因此可以进行抗 HBV 的不同药物的联合治疗(combined therapy)积极有效探索, 以达到增加治疗的有效率, 减少药物耐药性的目的. 而且不同抗病毒药物的作用机制不同, 诱导病毒产生突变的形式也不同, 同时对多种抗病毒药物耐药的病毒, 其自身的复制、生存能力也明显下降, 因此联合用药可产生相加或协同抗病毒疗效. 常见有拉米夫定与 IFN α 联合治疗、拉米夫定与其他核苷类似物联合治疗、拉米夫定与免疫调节剂联合治疗等^[13].

第一, 拉米夫定与 IFN α 联合治疗: IFN α 是一种糖蛋白, 不能直接灭活病毒, 主要通过直接抑制 HBV 转录和翻译以及促进宿主抗病毒免疫反应而发挥抗病毒感染的作用, 清除已感染 HBV 的肝细胞, 只在免疫清除期具有一定效果, 拉米夫定通过抑制病毒逆转录酶, HBV 多聚酶活性, 终止病毒复制过程中 DNA 链延长而抑制 HBV 复制, 并不能清除肝细胞内的 HBV, 二者联合理论上具有增强抗 HBV 感染的作用. Jaboli et al^[14]进行的一项研究表明: 联合治疗组(拉米夫定治疗 1 mo, 拉米夫定与 IFN α 治疗 12 mo 再以拉米夫定治疗 6 mo)、拉米夫定组(单独治疗 12 mo)、IFN α 组(单独治疗 12 mo) 患者在治疗结束时 HBV DNA 转阴率分别为 88%, 99%, 55%, 血清转氨酶正常率分别为 84%, 91%, 53%, 而在治疗后 6 mo HBV DNA 转阴率分别为 61%, 42%, 45%, 且在联合治疗组没有观察到 YMDD 变异发生. 虽然联合治疗组病毒清除率和血清转氨酶正常率低于拉米夫定单独治疗组, 但是其可以获得持续益处和防止 YMDD 突变株的产生, 因此认为联合治疗是安全的. Serfaty et al^[15]选取 14 例 40 岁 HBV DNA > 100 ng/L 和 HBeAg 阳性男性患者以拉米夫定和 IFN α 进行序贯治疗(以拉米夫定单独治疗 20 wk, 接着以 2 b-IFN α 和拉米夫定联合治疗 4 wk, 最后以 IFN α 单独治疗 24 wk). 在拉米夫定治疗结束时, 所有患者都有未检测到 HBV DNA, 没有出现 HBV 聚合酶突变或反跳. 14 例中 8 例患者在治

疗结束后取的持续的血清 HBV DNA 清除, 3 例患者有 HBsAg 血清学转换. 11 例 HBeAg 阳性患者中有 3 例有 HBeAg 血清学转换. 所有持续应答者转氨酶均正常, 均有组织学改善. Mutimer et al^[16]研究 8 例具有高 HBV DNA 水平慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗效果. 6 例患者接受拉米夫定与 IFN α 的联合治疗, 停药 6 mo 后以拉米夫定单独治疗. 在联合治疗后 4 mo 平均病毒载量下降了 4.3×10^3 优于单用拉米夫定治疗 2.9×10^2 , 2 例患者先联合治疗 6 mo 立即开始拉米夫定单独治疗, 患者 IFN α 停用后病毒载量快速上升 1-2 log₁₀, 这些研究表明 IFN α 慢性 HBV 感染有直接抑制作用与拉米夫定有累加协同作用.

第二, 拉米夫定与其他核苷类似物联合治疗: 核苷类似物除拉米夫定外还有泛昔泛韦(FCV)、阿地福韦、恩地卡韦等. 泛昔泛韦为新型鸟嘌呤核苷类似物, FCV 抗 HBV 主要的作用机制与拉米夫定不同. FCV 无“DNA 链终止剂”作用, 但有抑制 HBV 多聚酶引物和感染细胞向外释放病毒颗粒子的作用^[17]. 二者在对 HBV 多聚酶的 DNA 聚合酶活性和逆转录酶活性是相同. Wang et al^[18]进行的一项研究表明: 联合治疗组、拉米夫定组、泛昔洛韦组患者的血清 HBV DNA 转阴率分别为 89.3%, 66.7%, 40.6%, 血清 HBeAg 消失率分别为 28.6%, 23.3%, 21.9%. 拉米夫定与泛昔诺韦联合治疗慢性乙型肝炎比单独治疗更安全有效. 拉米夫定与阿地福韦联合产生协同作用在感染鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的原代鸭肝细胞模型中亦得到证实^[19].

第三, 拉米夫定与免疫调节剂联合治疗: 拉米夫定抑制病毒复制, 免疫调节剂具有免疫增强作用, 清除已感染 HBV 的肝细胞. 二者联合理论是可行的. 常用免疫调节剂有胸腺素 α (Thymosin α 1)、左旋咪唑、淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞, 细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞, 白介素 -12(IL-12)、前-S 或 S 肽疫苗, 免疫复合物疫苗, 细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)表位疫苗, DNA 疫苗等. 胸腺素 α 1 是 1984 年发现, 由胸腺分化的一种重要的 T 淋巴细胞调节因子^[20], 他适用于慢性乙型肝炎治疗的一种重要的免疫调节因子, 是 T 细胞免疫调节和增强剂. 拉米夫定联合胸腺素的疗效未能肯定. 左旋咪唑涂布剂就是一种新剂型的非特异性免疫调节剂. 它具有细胞免疫促进作用, 能促使受抑制的 T 细胞转换、增生为免疫活性 T 细胞, 参与细胞免疫过程, 诱导 IFN α 的生成. 两药联合应用有协同抗病毒作用, 且可防止复发.

3 新药治疗

近年来出现了许多治疗慢性乙型肝炎的新药如泛昔泛韦、阿地福韦、恩地卡韦、聚乙二醇 IFN α 等. 阿地福韦作为一种核苷类似物具有有效抗 HBV 和 HIV 病毒的能力. Barcena et al^[21]对 6 例慢性乙型肝炎患者因拉米夫定耐药而以阿地福韦再治疗. 在治疗 10 mo 后所有患者病毒血症下降, 4 例患者血清 HBV DNA 转阴, 治疗

12 mo后无阿地福韦耐药株出现. 同时所有患者转氨酶水平下降, 5例患者呈现正常, 没有毒副作用出现. Dando et al^[22]亦研究发现对慢性乙型肝炎患者先以拉米夫定治疗继以阿地福韦治疗或联合治疗比单用拉米夫定在减少血清HBV DNA水平更有效.

泛昔泛韦是喷西洛维的一种易吸收的口服制剂, 他可抑制HBV DNA多聚酶. 有研究中显示: 泛昔泛韦(口服500 mg, 3次/d)可抑制所有患者HBV DNA, 引起少数患者HBeAg的血清学转换. 他在抑制HBV复制方面比拉米夫定速度要慢, 程度要低. 因此血清学转换率要低于拉米夫定. 泛昔泛韦耐药发生与HBV DNA多聚酶528位的残基突变有关. 所以泛昔泛韦仍不能解决拉米夫定耐药性问题^[23-27].

聚乙二醇干扰素 α -2a(派罗欣)即长效干扰素, 其半衰期长, 每周仅用药1次. 他在慢性丙肝及丙肝肝硬化治疗方面较普通IFN α 有明显优越性. 近来亦被用来治疗慢性乙型肝炎. 他在慢性乙型肝炎的治疗上较普通IFN α 疗效提高了1倍, 尤其对治疗前ALT低水平升高、HBV DNA水平高的患者有效. 他在治疗HBeAg阳性的慢性乙型肝炎过程中有良好的依从性, 当剂量为180 μ g时与其他剂量相比, 降低HBeAg的速度和幅度最大, 降低HBV DNA水平的程度最大, 延长其疗程和联合其他抗病毒药可能进一步提高拉米夫定停药后复发的慢性乙型肝炎.

总之, 拉米夫定现仍是治疗慢性乙型肝炎的一线药物, 但由于疗程短及耐药株的出现可引起停药后复发. 对于这些患者可以拉米夫定再治疗, 联合IFN α 或其他核苷类似物或免疫调节剂治疗, 及新药治疗, 但这些方法各有优缺点, 不能完全解决慢性乙型肝炎的治疗问题. 今后有待开发更加有效的药物.

4 参考文献

- Janjua NZ, Nizamy MA. Knowledge and practices of barbers about hepatitis B and C transmission in Rawalpindi and Islamabad. *J Pak Med Assoc* 2004;54:116-119
- 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
- 成军, 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
- Gervain J, Papp I, Csondes M, Nemesanszky E, Racz I, Ribiczey P, Telegdy L, Tornai I, Weisz G. Determination of the lamivudine-resistant mutants of hepatitis B virus. *Orv Hetil* 2003;144:1251-1256
- 成军, 李莉. 抗乙肝病毒联合治疗方案的研究进展. *中华传染病杂志* 2003;21:157-160
- Dienstag JL, Schiff ER, Mitchell M, Casey DE Jr, Gitlin N, Lisoos T, Gelb LD, Condreay L, Crowther L, Rubin M, Brown N. Extended lamivudine retreatment for chronic hepatitis B: maintenance of viral suppression after discontinuation of therapy. *Hepatology* 1999;30:1082-1087
- Zhou DY, Cao YJ, Lin LY, Wang H, Huang JS. HBV resistant to lamivudine: experimental and clinical studies. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:519-522
- Lau DT, Khokhar MF, Doo E, Ghany MG, Herion D, Park Y, Kleiner DE, Schmid P, Condreay LD, Gauthier J, Kuhns MC, Liang TJ, Hoofnagle JH. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 2000;32:828-834
- Chan HL, Chui AK, Lau WY, Chan FK, Hui AY, Rao AR, Wong J, Lai EC, Sung JJ. Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus mutant post-liver transplantation on lamivudine monotherapy. *Clin Transplant* 2004;18:295-300
- Dienstag JL, Cianciara J, Karayalcin S, Kowdley KV, Willems B, Plisek S, Woessner M, Gardner S, Schiff E. Durability of serologic response after lamivudine treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003;37:748-755
- Honkoop P, de Man RA, Niesters HG, Zondervan PE, Schalm SW. Acute exacerbation of chronic hepatitis B virus infection after withdrawal of lamivudine therapy. *Hepatology* 2000;32:635-639
- Marzano A, Debernardi-Venon W, Condreay L, Rizzetto M. Efficacy of lamivudine re-treatment in a patient with hepatitis B virus (HBV) recurrence after liver transplantation and HBV-DNA breakthrough during the first treatment. *Transplantation* 1998;65:1499-1500
- Malik AH, Lee WM. Chronic hepatitis B virus infection: treatment strategies for the next millennium. *Ann Intern Med* 2000;132:723-731
- Jaboli MF, Fabbri C, Liva S, Azzaroli F, Nigro G, Giovanelli S, Ferrara F, Miracolo A, Marchetto S, Montagnani M, Colecchia A, Festi D, Reggiani LB, Roda E, Mazzella G. Long-term alpha interferon and lamivudine combination therapy in non-responder patients with anti-HBe-positive chronic hepatitis B: results of an open controlled trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:1491-1495
- Serfaty L, Thabut D, Zoulim F, Andreani T, Chazouilleres O, Carbonell N, Loria A, Poupon R. Sequential treatment with lamivudine and interferon monotherapies in patients with chronic hepatitis B not responding to interferon alone: results of a pilot study. *Hepatology* 2001;34:573-577
- Mutimer D, Dowling D, Cane P, Ratcliffe D, Tang H, O'Donnell K, Shaw J, Elias E, Pillay D. Additive antiviral effects of lamivudine and alpha-interferon in chronic hepatitis B infection. *Antivir Ther* 2000;5:273-277
- Shen H, Alsatie M, Eckert G, Chalasani N, Lumeng L, Kwo PY. Combination therapy with lamivudine and famciclovir for chronic hepatitis B infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:330-336
- Wang HF, Li L, Su HB, Ji W. Treatment of patients with chronic hepatitis B virus infection with lamivudine combined with famciclovir. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2003;17:180-182
- Beckebaum S, Malago M, Dirsch O, Cicinnati VR, Trippler M, Lampertico P, Lama N, Treichel U, Gerken G, Broelsch CE. Efficacy of combined lamivudine and adefovir dipivoxil treatment for severe HBV graft reinfection after living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2003;17:554-559
- Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Yoshida S, Suzuki Y, Nagao K, Saisho H. Corticosteroids and lamivudine combined to treat acute severe flare-up in a chronic hepatitis B and C patient. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:238-239
- Barcena Marugan R, Cid Gomez L, Lopez Serrano P. Use of adefovir in the treatment of the chronic hepatitis B virus infection with resistance to lamivudine. *Transplant Proc* 2003;35:1841-1843
- Dando T, Plosker G. Adefovir dipivoxil: a review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs* 2003;63:2215-2234
- Leon P, Pozo F, Echevarria JM. Detection of hepatitis B virus variants resistant to lamivudine and famciclovir among randomly selected chronic carriers from Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:133-137
- Halfon P, Pol S, Bourliere M, Courcambeck J, Cacoub P. Nucleoside analogues resistance in the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Rev Med Interne* 2003;24:786-793
- Li L, Shao Q, Zhang J, Ji D. Famciclovir treatment of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:390-391
- Ayres A, Bartholomeusz A, Lau G, Lam KC, Lee JY, Locarnini S. Lamivudine and Famciclovir resistant hepatitis B virus associated with fatal hepatic failure. *J Clin Virol* 2003;27:111-116
- Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, de Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine, lamivudine-famciclovir or lamivudine-ganciclovir. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1007-1011

抗乙型肝炎病毒治疗中病毒载量的动力学特点

杨 媛, 成 军, 黄燕萍, 白桂芹, 赵英仁

杨媛, 成军, 黄燕萍, 白桂芹, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
赵英仁, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

病毒载量动力学的检测被越来越广泛地用来预测抗病毒药物的治疗效果, 先前的免疫学检测受很多因素的影响, 已不能正确反应病毒的复制。而病毒载量定量检测可使人们能够比较清楚地了解病毒在体内的变化情况, 弥补了免疫学方面的不足。通过对病毒动力学的研究可以使我们了解病毒在清除过程中的特点, 从而用于指导临床来评估药物疗效, 以及针对不同的患者设计合理的治疗方案。

杨媛, 成军, 黄燕萍, 白桂芹, 赵英仁. 抗乙型肝炎病毒治疗中病毒载量的动力学特点. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1688-1691
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1691.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个困扰全球的健康问题, 世界范围内大约有 3.5 亿人感染 HBV, 其中亚洲占了 3/4, 仅中国就有近 1.3 亿人携带 HBV^[1]. HBsAg 携带率达 9.75%, 慢性乙型肝炎患者达 3 000 万人, 其中约 10-20% 发展成为肝硬化, 1-5% 可演变成成为肝癌(HCC). 近来国内外对慢性乙型肝炎治疗已有了很大进展, 主要采用抗病毒、免疫调节、改善肝功能和防止慢性化发展等综合治疗. 近些年来, 肝病学界已达成共识, 认为抗病毒治疗是其中最主要、最根本的治疗措施, 目前用于病毒性肝炎抗病毒治疗的药物主要有二类, 一类是抗病毒药物, 具有直接抑制及杀灭病毒的作用; 另一类是免疫调节剂, 通过调节人体的免疫功能, 从而抑制及清除肝炎病毒. 但是这些药物的效果还不稳定, 治疗费用昂贵, 所以不论是从疗效的角度, 还是从经济角度, 人们都在寻求一种有效的方法来预测药物的效果及进一步指导用药. 先前人们选用免疫学的方法来预测抗病毒药物的疗效, 随着现代分子生物学的快速发展, 又为慢性乙型肝炎抗病毒治疗相关研究提供了新的机遇与挑战, 人们通过监测治疗前、治疗时及治疗后病毒载量的变化可更准确的, 更

量化的预测药物的疗效, 并为治疗措施的制定提供有力依据。

1 乙型肝炎病毒在细胞内的复制与清除

在 HBV 复制循环过程中, 一个重要的特征是共价闭环(ccc)或超螺旋 DNA 分子的形成, 作为一种病毒的微染色体而存在^[2]. 虽然 HBV 仅在宿主细胞内复制, 病毒本身不能引起肝细胞病变, 但是 HBV 通过细胞内免疫引发的肝损害是慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的主要原因^[1].

乙型肝炎患者自体每日可清除外周血中大量 HBV. 根据最近对 HBV 在人体内动力学研究, HBV 的半衰期为 26.4 h, 病毒存活期为 36.6 h, 日更新率为 48%, 所以控制人体病毒感染的关键在于清除 HBV cccDNA, 抑制病毒复制^[3-4]. Guidotti et al^[5] 的研究得出在动物模型中, 病毒第一阶段的清除主要通过非细胞病理的作用清除或抑制 cccDNA 的产生, 可能是通过细胞因子的作用. Whalley et al^[6] 在对人急性 HBV 感染的动力学研究中, 得出病毒清除第一阶段半衰期的平均数与动物模型中 cccDNA 半衰期相一致^[7]. 该项研究提示病毒初始阶段的清除机制或许与 cccDNA 的清除相关; 但是该实验不能得出在病毒生活周期的下游阶段可能受到的抑制作用, 这些还需要大量直接的实验加以验证. 于是人们期望能通过清除 HBV 的复制模板 cccDNA 来降低被感染细胞的产病毒的能力, 由此可导致血清中相关病毒 DNA 的降低。

2 抗乙型肝炎病毒的治疗

慢性 HBV 感染常常是由于早期暴露于 HBV 的结果, 导致了病毒在缺乏强大抗体与细胞内免疫反应的情况下长期存在^[8]. 如果人体的免疫机制不能及时清除 HBV 在体内的持续存在与活跃复制, 必将导致肝组织损伤的不断进展. 因此, 要想阻止肝脏进行性损害, 必须采取有效药物清除或抑制 HBV 的复制, 也就是说抗病毒治疗是控制慢性乙型肝炎的最主要、最根本的治疗措施。

目前用于抗病毒治疗的药物主要有两类, 一类为细胞因子, 如干扰素, 有 α , β , γ 三种, α , β 干扰素疗效相似, 临床应用较广泛, γ -干扰素疗效较差, 应用受到限制. 他们一方面通过免疫调节发挥作用, 另一方面也可直接抗病毒, 然而 IFN α 的治疗效果是有限的, 长期应用才可抑制 HBV 复制, 获得持久性效应. IFN α 治疗慢性乙型肝炎的治疗效果和疗程有关, 治

疗近期疗效较高, 远期疗效尚低, 如果有针对的选择病例, 可以提高疗效. 因为其不能清除 cccDNA, 停药后可再次复制, 也不能清除已整合入的细胞基因组的病毒基因, 而且长期使用有很多的副作用, 于是出现了另一类可大量直接抗病毒的药物, 即核苷类似物, 通过抑制病毒聚合酶来阻止病毒的复制, 如拉米夫定、泛昔洛韦、阿昔洛韦已用于临床, 阿德福韦、恩他卡韦和 BMS-200475 也正在进行临床试验. 其中拉米夫定是最具代表性的一个, 在 HBV 复制循环过程中, 病毒的逆转录酶是合成新的 HBV DNA 的前基因组 mRNA 模板所必需的, 由此拉米夫定可阻止已被病毒感染细胞生产新病毒^[9]. 另外病毒的聚合酶是病毒进入细胞核之前形成双链环状 DNA 所必须的^[10], 故拉米夫定还可阻止病毒感染新的细胞^[11]. 他与 IFN α 的不同之处是其不影响机体的免疫系统, 最早用于治疗免疫缺陷型病毒, 后来发现其对 HBV 也有明显的抑制作用, 而且作用迅速, 可降低 HBV DNA 低度可达 $10^{6.7}$ 拷贝/L, 已广泛用于临床. 但是其对 HBV 的抑制作用是可逆的, 停用药物后 HBV DNA 又反复出现, 低于或相当于基础水平, 而且也不能完全清除 cccDNA, 更不能清除已与细胞基因组整合的病毒, 使 HBsAg 消失. 只有长期使用, 持续性抑制 HBV 复制直至消耗 cccDNA, 才可获得持久性效应^[12], 但是 YMDD 变异的存在, 对其在临床中的应用提出了挑战, 患者的选择及停药时机的选择都是至关重要的. 近年来有效的抗病毒药物的使用大大促进了人免疫缺陷病毒(HIV)、猴免疫缺陷病毒、HBV、丙型肝炎病毒(HCV)感染的动力学数学分析的发展^[13]. 反过来, 在抗病毒的治疗过程中, 对于这些病毒感染的动力学的深入理解不仅为病毒发生机制提供了动力学图谱, 而且也设计合理的治疗措施提供了有力的依据, 使人们越来越意识到研究病毒动力学的重要性及其临床意义.

3 乙型肝炎病毒载量

3.1 与抗原抗体的模式关系 早期人们多采用血清学方法进行乙型肝炎病原学诊断, 预测其传染性、疾病进程及预后. 在病毒复制过程中, 也表达病毒特异蛋白, 这些蛋白可激发机体的免疫系统, 产成相应的抗体, 故可通过检测抗原抗体来间接反应病毒的复制水平. Gerken et al^[14]用 IFN α 治疗慢性活动性肝炎期间, 发现抗-HBcIgM 和病毒载量有很好的相关性; 隋云华 et al^[15]通过对 838 例各型乙型肝炎患者血清 HBV DNA 定量, 得出 HBV DNA 定量与 HBsAg、HBeAg、HBcAb 阳性的符合率为 94.4%, 显示了极好的特异性. 但是免疫学检测存在许多无法克服的问题, 如抗原变异、免疫交叉反应、免疫复合物的形成^[16], 这些都影响着血清学检测方法的灵敏度和准确性的进一步提高, 另外 HBV 的表达和机体的免疫反应的强弱受多种因素的影响, 免疫学指标与临床现象及病毒载量有可能不完全吻合. 随着逆转录酶抑制剂的广泛使用, 病毒变异的广泛存在, 紧

紧依靠免疫学指标已经不能完全解释许多临床现象. 血清学检测不能准确地反应病毒的复制, 故病毒载量的检测被越来越广泛地用于临床诊断. 有学者在分析免疫学检测与病毒载量检测之间的关系时得出, HBsAg, HBcAb 阳性, HBsAg, HBeAb, HBcAb 阳性组, HBV DNA 的阳性率分别为 38.6% 和 27.3%, 显示了 HBV DNA 定量的灵敏性^[21]. 随着一些抗病毒药物的有效应用, 临床中发现某些 HBeAg 阳性的乙型肝炎患者的 HBV DNA 呈阴性结果, 提示血清学标志反映 HBV 复制状态存在局限性. 李文清 et al^[23]调查了 20 例乙型肝炎患者(16 例 HBeAg 阳性和 4 例 HBeAb 阳性)在拉米夫定治疗期间, 经 12 wk 和 24 wk 治疗后, 其 HBV DNA 含量迅速下降, 部分 HBV DNA 含量低于检测范围, 而呈阴性结果, 其阳性率分别仅为 75.0% 和 55.0%, 而血清学标志无 1 例发生变化. 表明在抗病毒治疗期间, 血清学标志的变化滞后于 HBV DNA 含量的变化, HBV DNA 定量检测是反映 HBV 复制和药物疗效的判断最直接、可靠的指标^[17].

既往一般认为, 血清 HBeAg 阴转或抗-HBe 出现预示病毒复制水平降低或病变趋于恢复^[18], 但有报道指出 HBeAg 阳性患者的病毒载量比 HBeAg 阴性患者的高^[19], 在其调查的 116 例患者中有 42 例(36.1%)血清 HBeAg 阴性, 但仍可检出 HBV DNA, 部分病例 HBV DNA 水平还较高, 提示 HBeAg 阴转不能认为 HBV 复制减少或停止. 近年的研究发现, 这些患者中多数伴有 HBV 前-C 区的基因突变, 特别是第 1896 位核苷酸的突变, 致使前-C 区第 28 位密码子(TGG)转变为翻译终止密码子(TAG), 导致 HBeAg 的合成、分泌障碍, 但却不影响 HBV 的复制^[20]. 这种变异的 HBV 比野生型 HBV 更不易被机体清除, 因而更易引起乙型肝炎慢性化、慢性肝炎恶化, 且与重型肝炎和肝癌密切相关^[21]. 因此, 血清 HBeAg 阴性而 HBV DNA 含量高的患者应引起临床上重视, 慢性乙型肝炎(CHB)患者随着肝损害程度的加重, 血清 HBV DNA 含量却逐渐下降, 提示病情可能越重, 病毒复制水平越低. 这可能与 CHB 患者机体的体液和细胞免疫应答在造成肝损害的同时, 也中和和清除血循环中的病毒颗粒有关^[22], 表现为免疫损伤越严重, 肝损害程度也越严重, 血清 HBV DNA 含量越低. 此外, 随着病程的延长, 病情的加重, 部分 HBV DNA 被整合到宿主肝细胞中, 致使血清 HBV DNA 含量降低. 因此, CHB 患者定量检测血清 HBV DNA 含量对临床判断肝损害程度, 指导抗病毒治疗, 估计其预后具有重要意义.

3.2 病毒动力学 病毒的动力学研究主要通过假设的数学模型, 结合抗病毒药物作用下病毒载量的动态变化数据求解得到的病毒感染动力学特征的基本参数. 了解病毒感染动力学过程, 可以更清楚的理解病毒感染发生、发展、转归以及药物治疗效果. 最初的病毒动力学原理的研究是源于对 HIV 感染动力学分析, 并促进了

病毒动力学的发展. 在慢性病毒感染的患者中, 病毒的水平通常被认为达到一个稳定或恒定水平, 然后保持这一状态很多年. 为了保持这一恒定的水平, 机体必须以同样的速率清除和生产病毒. 如果不保持清除与产出平衡的话, 那么病毒的数量就会慢慢地增加. 一旦恒定点建立, 测量病毒载量将不能证实病毒的生产是减慢了, 还是加速了. 因此为了获得病毒生产与清除率的信息, 不得不用抗病毒药物打乱该系统. 例如, 如果病毒生产能够完全被阻止, 那么病毒载量将会下降, 他下降的速率是清除的速率. 如果病毒的生产不能完全被阻止, 那么病毒载量下降的速率将不仅仅依赖于病毒清除的速率, 而且也依赖于生产病毒的细胞的死亡率和抗病毒药物的效果^[23].

目前 HBV 动力学研究也有报道, 获得了一些重要参数^[24], 该参数包括病毒感染, 细胞的死亡及抗病毒药物的疗效. 其中基本的动力学模型可用于研究 HBV 的感染, 计算慢性感染过程中平衡病毒学载量, 也适于研究抗逆转录病毒的抗病毒治疗. Whalley et al^[6]通过检测急性 HBV 感染者病毒潜伏后期和临床期血清病毒载量的动态变化, 研究了 HBV 感染动力学过程. HBV 复制很快, 在 2.2-5.8(3.7 ± 1.5 d), 经过一个峰值后, 血清中病毒载量达到约 10¹³ 拷贝/L. HBV DNA 的清除经过 2-3 阶段下降, 第一阶段为快速下降期, 半衰期为 3.7 ± 1.2 d, 接近于在其他嗜肝病毒中所观察到的 cccDNA 通过非细胞病理机制清除时的半衰期. 最后的病毒清除阶段半衰期范围很广泛, 在 4.8-284 d 之间, 这可能与感染肝细胞的清除率有关. 游离病毒的半衰期大多数为 1.2 ± 0.6 d. 他们估计在病毒复制高峰每天至少产生 10¹³ 个病毒, 平均一个感染肝细胞每天最多能产生 200-1 000 个病毒. Nowak et al^[25]通过假设拉米夫定完全阻断了病毒对细胞的感染, 使感染细胞数量维持恒定, 从而建立了一个数学模型, 提出了病毒清除表现为双期过程的理论. Tsiang et al^[26]对 Nowak 数学模型作了修正, 他们假设感染的细胞并不维持恒定, 引入了病毒抑制效率参数. 应用修正后的模型评价了阿德福韦对病毒的抑制效率参数, 得出 30 mg/d 阿德福韦对病毒的抑制效率为 0.993 ± 0.008, 即治疗期间每天仍有 0.7% 的病毒产生. Lowin et al^[27]提出病毒的下降模式可能存在更复杂的多阶段模式 - 阶梯式. 通过对病毒动力学的研究了解病毒在清除过程中的特点, 从而可指导临床评估药物疗效, 以及针对不同的患者设计合理的治疗方案.

3.3 动态学检测与抗病毒治疗 病毒载量一般指每毫升血清中病毒拷贝数, 也表示肝脏病毒含量. 血清中, 病毒 DNA 水平与病毒含量一致, 病毒载量和病毒 DNA 水平意义相同; 但肝脏中的病毒 DNA 水平包括已包装和待包装的病毒 DNA, 因此病毒载量和病毒 DNA 水平不完全等同. 感染细胞和血清中的病毒半衰期均很短, 因此血清病毒水平反应了病毒的复制水平, 但病毒载量并不完全反映病毒的复制水平, 其反映的是检测前感染

细胞释放的病毒与被清除体外的病毒的累积差值. 数值大小不直接与感染细胞生成速度(复制水平)有关, 而是与感染细胞的破坏速度和机体清除游离病毒的速度有关. 病毒载量可以通过测定病毒基因组来确定^[28]. 病毒载量在不同患者、不同发病阶段和不同发病类型中, 相同大小的病毒载量可能表示不同的临床意义. 以前, 病毒载量的检测仅用于基础研究, 现在被广泛用于常规的病毒学诊断, 并且检测试剂已大量商品化. 在临床病毒学中, 病毒载量的测试主要用于四个目的: 即病毒学诊断; 评估患者的预后; 作为检测抗病毒治疗效果的标志; 评估患者的传染性, 即传播的危险性.

病毒载量定量检测使人们能够比较清楚地了解病毒在体内的致病作用, 弥补了免疫学方面的不足. Nowak et al^[3]对使用拉米夫定治疗的患者进行了随访观察, 监测其病毒载量的变化, 利用数学模型分析病毒载量下降的特点、治疗的效果. 结果发现, 在治疗的第 2-4 wk, 血清中病毒 DNA 降低分两阶段进行. 第一阶段主要是游离病毒的清除, 第二阶段主要是生产病毒的被感染细胞的清除. 当患者停止使用拉米夫定, 病毒水平将会迅速增加至初始的稳定阶段. Zeuzem et al^[29]和 Tsiang et al^[26]也观测到了病毒载量分两阶段下降这一特征. 从这些研究中, 按每天 50% 的反复率可估计游离 HBV 的半衰期约为 24 h, 游离病毒的生产率约每天 10¹², 被感染细胞的半衰期为 10-100 d. Lowin et al^[27]指出病毒的下降模式在一些患者中可能更加复杂, 患者采用拉米夫定联合泛昔洛韦, 或联合其他的核酸类似物, 采用实时 PCR 法监测病毒的下降模式. 结果发现对部分患者而言, 病毒水平不是按照前面所描述的典型的两阶段模型下降, 其下降模式更像阶梯式, 提示 HBV 病毒动力学或许比先前提及的更为复杂, 另外有两例患者血清中的 HBV DNA 更加快速的被清除, 提示先前估计的游离病毒的半衰期为 24 h 并不是普遍存在的. Tsiang et al^[26] 在近来的阿德福韦 期临床研究过程中, 有 15 例慢性 HBV 患者接受了每天使用 30 mg 阿德福韦, 持续了 12 wk, 结果血浆中 HBV 水平下降了 10^{4.1}. 虽然病毒清除的第一阶段及第二阶段的初始阶段与先前的两阶段模式相符合, 但是病毒载量实际上处于不稳定状态, 在第二阶段中病毒 DNA 以更低的速率持续下降, 病毒载量的变化甚微, 在治疗 30 d Nowak et al^[25] 的模型不再适用. 血浆中病毒水平迅速和持续的降低依赖于病毒生产有效的抑制, 因为这些都是由抗病毒治疗的剂量与效力所决定的. 病毒生产完全抑制的缺乏, 病毒彻底清除与肝纤维化危险性的降低及肝细胞癌的发展将主要依靠被感染细胞降低的有效率^[30-31]. 显然还需要大量的研究来证实这些有意义的发现.

血清 HBV DNA 检测对监测病毒载量的变化起到重要的作用, 但是肝组织中的 HBV DNA 的检测可更准确地反映病毒的复制情况. 张光曙 et al^[32]通过肝活检, 检测肝组织 HBV DNA, 结果发现在急慢性 HBV 感染中可

提高确诊率,尤其是慢性感染. 研究观察证实血清内的HBV DNA检出率和HBV DNA含量均明显低于肝细胞,提示肝细胞内HBV DNA阴转可能晚于血液,因而提示在抗病毒治疗时,血内HBV DNA阴转并不能说明肝细胞内亦已阴转,在血液内HBV DNA阴转不应随即停止治疗,应结合临床表现及肝组织中HBV DNA是否阴转来判定. 故除了监测血清中病毒载量的变化外,应该进一步检测肝组织中的病毒DNA,因为其能更准确地反映病毒的复制状况,但是由于取材较复杂,故临床的应用受到限制.

病毒载量及其动态变化与临床现象的关系比较复杂,需准确观察低复制病毒的微量变化;逆转录酶抑制剂的应用提高了乙型肝炎的治疗效果,但这类药物可引起HBV耐药毒株的出现,从而引发停药后反弹,是目前在乙型肝炎治疗中比较棘手的一个问题^[33-35]. 故应针对不同患者具体的发病阶段和治疗措施,适时、动态的测定多个时间段的病毒载量,在治疗期间预测耐药毒株,及时调整治疗方案,这些都对HBV的治疗有重要意义.

4 参考文献

- Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745
- Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* 1995;69:3350-3357
- Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4398-4402
- Payne RJ, Nowak MA, Blumberg BS. The dynamics of hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6542-6546
- Guidotti LG, Rochford R, Chung RF, Purcell MSR, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825-829
- Whalley SA, Murray JM, Brown D, Webster GJ, Emery VC, Dusheiko GM, Perelson AS. Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* 2001;193:847-854
- Delzney WE 4th, Miller TG, Isom HC. Use of the hepatitis B virus recombinant baculovirus-HepG2 system to study the effects of(-)-beta-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine on replication of hepatitis B virus and accumulation of covalently closed circular DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2017-2026
- Penna FC, Bertolotti A, Valli A, Antoni A, Giuberti AD, Cavalli T, Petit A, Fiaccadori MAF. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1990;145:3442-3449
- Tiollais P, Buendia MA. Hepatitis B virus. *Sci Am* 1991;264:116-123
- Ganem D, Pollack GD, Tavis JR. Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect Agents Dis* 1994;3:85-93
- Severini A, Liu XY, Wilson JS, Tyrrell DL. Mechanism of inhibition of duck hepatitis B virus polymerase by (-)-beta-L-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *J Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1430-1435
- 骆抗先. 慢性乙型肝炎抗病毒治疗的选择:干扰素还是拉米夫定. *肝脏* 2001;6(增刊):1-2
- Bongoeffer S, Coffin JM, Nowak MA. Human immunodeficiency virus drug therapy and virus load. *J Virol* 1997;71:3275-3278
- Gerken G, Gomes J, Lampertico P, Colombo M, Rothaar T, Trippler M, Colucci G. Clinical evaluation and applications of the Amplicor HBV Monitor test, a quantitative HBV DNA PCR assay. *J Virol Methods* 1998;74:155-165
- 隋云华, 杨志国, 许家璋, 何长伦. HBV DNA定量与乙型肝炎临床及病理关系的探讨. *现代诊断与治疗* 2002;13:266-268
- Chung RT, Kim AY, Polsky B. HIV/Hepatitis B and C coinfection: pathogenic interactions, natural history and therapy. *Antivir Chem Chemother* 2001;12(Suppl 1):73-91
- 李文清, 陈玉丽, 林经安, 刘豫瑞. 乙型肝炎病毒血清DNA定量检测的临床意义. *临床荟萃* 2003;18:1025-1027
- 陈瑞烈, 方婵英, 张惠娟, 方少鹏. 慢性乙型肝炎血清HBV DNA定量检测及其临床意义. *中国基层医药* 2001;8:317-318
- Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A. Correlation between serum transaminase activity and virus load among patients with chronic liver disease type B. *Hepatol Res* 2001;21:159-168
- 成军, 扬守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997:30-70
- Lindh M, Furuta Y, Vahlne A, Norrans G, Horal P. Emergence of precore TAG mutation during hepatitis B e seroconversion and its dependence on pregenomic base pairing between nucleotides 1858 of 1896. *J Infect Dis* 1995;172:1343-1347
- 蔡卫平, 唐小平, 陈劲峰. 慢性乙型肝炎HBV DNA定量检测与病原学标志和肝损害程度的关系. *中国实用内科杂志* 1998;18:149-150
- Llyden TJ, Laden JE, Ribeiro RM, Perelson AS. Mathematical modeling of viral kinetics: a tool to understand and optimize therapy. *Clin Liver Dis* 2003;7:163-78
- Payne RJ, Nowak MA, Blumberg BS. The dynamics of hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6542-6546
- Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4398-4402
- Tsiang M, Rooney JF, Toole JJ, Gibbs CS. Biphasic clearance kinetics of hepatitis B virus from patients during adefovir diiovoxil therapy. *Hepatology* 1999;29:1863-1869
- Lowin SR, Ribeiro RM, Walters T, Lau GK, Bowden S, Locarnini S, Perelson AS. Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed. *Hepatology* 2001;34:1012-1020
- 洪卫国, 王福生, 陈菊梅. 病毒载量动态检测在乙型肝炎治疗和研究中的意义. *中华肝脏病杂志* 2003;11:54-56
- Zeuzem S, de Man RA, Honkoop P, Roth WK, Schalm SW, Schmidt JM. Dynamics of hepatitis B virus infection in vivo. *J Hepatol* 1997;27:431-436
- Mason WS. The problem of antiviral therapy for chronic hepadnavirus infections. *J Hepatol* 1993;17:S137-S142
- Mason WS, Cullen J, Saputelli J, Wu TT, Liu C, London WT, Lustbader E, Schaffer P, O'Connell AP, Fourel I. Characterization of the antiviral effects of 2' carbodeoxy-guanosine in ducks chronically infected with duck hepatitis B virus. *Hepatology* 1994;19:398-411
- 张光曙, 卓海龙, 徐传镇, 丁明权, 于建国, 甘天福. 肝组织HBVDNA定量检查的临床意义. *临床肝胆病杂志* 2003;19:100-101
- Delaney WE, Locamini S, Shaw T. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antivir Chem Chemother* 2001;12:1-35
- Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Hepatitis B virus variants in patients receiving lamivudine treatment with breakthrough hepatitis evaluated by serial viral loads and full length viral sequences. *Hepatology* 2001;34:583-589
- Da Silva LC, Pinho JR, Sitnik R, Da Fonseca LE, Carrilho FJ. Efficacy and tolerability of long-term therapy using high lamivudine dose for the treatment of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2001;36:476-485

丙型肝炎病毒 p7 蛋白研究进展

郭江, 成军, 赵龙凤

郭江, 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
赵龙凤, 山西医科大学第一附属医院感染病科 山西省太原市 030001
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

p7 蛋白是一个介于丙型肝炎病毒(HCV)结构蛋白和非结构蛋白之间的一小蛋白, 在脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 在病毒的自然感染过程中起一定的作用. 金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物可抑制 p7 形成的阳离子通道, 从而对 HCV 的治疗发挥重要作用. 本文就 p7 蛋白的基因组结构、合成与功能作一综述.

郭江, 成军, 赵龙凤. 丙型肝炎病毒 p7 蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1692-1694

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1692.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是慢性肝炎的主要病原之一, 约有 1.7 亿人被感染, 常导致肝硬化和肝细胞癌(HCC)^[1-5]. HCV 的基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF), 编码一个约 3 010 个氨基酸残基(aa)组成的多蛋白, 该多蛋白被细胞和病毒蛋白酶切割产生至少 10 个病毒基因产物: 核心蛋白(core), E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B 蛋白等^[6-9]. p7 是由 HCV 基因组 2 580-2 768 核苷酸(nt)之间的基因编码的由 63 个氨基酸残基(aa)组成的小蛋白. 近年来对其基因组结构、合成与功能研究取得了一些进展, 本文就这方面的研究进展如下.

1 p7 蛋白的基因组结构与合成

p7 是一个小的疏水性多蛋白, 包括 63 个氨基酸残基, 编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间, 是膜相关性的, 定位在内质网内. 他包括 2 个跨膜 α 螺旋, 与一小的带电细胞质环相连, 其氨基和羧基端尾朝向细胞内质网腔^[10]. 这一带电环为亲水片段. p7 蛋白属于病毒孔道蛋白家族, 在细胞膜内其同源寡聚体形成水相孔道, 这些蛋白最具特征性的代表是流感 A 病毒的 M2 通

道. p7 通过与谷胱甘肽-S-转移酶(GST)在大肠杆菌中的融合可获得高水平的表达, 二者之间被一 6 组氨(HIS)连接子所分离形成 GST-HIS-p7 复合结构. 通过透射电子显微所成像发现, GST-HIS-p7 和裂解的近于天然 HIS-p7 均呈具有纬度的环状结构. 化学交联数据表明 p7 形成五聚体或六聚体结构^[11]. Griffin et al^[11] 研究表明在 HepG2 细胞中, 重组的 HCV p7 可交联成六聚体, 在体外大肠杆菌表达的 p7 亦可形成六聚体.

Carrere-Kremer et al^[10] 通过分析融合在 p7 羧基端的报告糖蛋白的移位而确证 p7 的羧基端跨膜区是一信号序列. 通过 CD4 的外功能区和 Myc 表位所标记这一 p7 多肽, 并经碱性提取证实其为一整膜多肽. 经非通透性细胞表面的免疫荧光检测 CD4-p7 嵌合体证明其可运输到质膜. 然而脉冲追踪技术分析长的追踪时间后仅有 20% 的内切糖苷酶 H 抵抗性 CD4-p7 被检测到, 这表明 p7 的大部分存在分泌通路的早期间隔内. 他们在 p7 的几个位置插入 Myc 表位, 分析这一表位在 HepG2 细胞膜上的通透性, 表明其是一双跨膜拓扑结构, 其氨基和羧基端朝向细胞外. 这些研究表明 p7 是在分泌通道的几个区域有功能多分裂膜蛋白.

p7 基因定位在 E2 和 NS2 之间, p7 由位于内质网(ER, endoplasmic reticulum)的宿主信号肽酶催化形成的. p7 的羧基端跨膜区是一信号序列, 可促进 NS2 进入内质网腔被宿主信号肽酶进行合适的切割. 而最近体外实验研究表明在 p7 缺乏的条件下, NS2 亦可与膜发生关联^[12]. 虽然 HCV 大部分的多蛋白前体在翻译期间和翻译后被裂解的, 然而 E2-p7 和 p7-NS2 之间的裂解要延迟, 导致 E2-p7-NS2 前体的产生, 且产生 E2-p7 蛋白及单个蛋白的混合的不完全裂解. 虽然 E2-p7 在 HCV-1 和 HCV-H 株相对稳定, 而在 HCV-BK 的研究表明, E2/p7 位点的加工更为有效, E1-E2 可能通过非共价键和共价二硫键结合两种方式相互作用折叠形成异源二聚体, 作为病毒的功能亚单位, 其形成速度依赖于 ER 中的“分子伴侣”(molecular chaperone)存在^[13-15]. E2-p7-NS2 前体的迅速形成、不存在 NS2/3 中间体表明 NS2/3 位点的加工运行着某种快速切割机制, 提示其作用方式为分子内顺式(intramolecular reaction, cis)切割行为. 但在某些特定条件下, 酶切可由分子间的反式(intermolecular, trans)方式进行, 在一系列共转染实验中发现 NS2/3 位点可以反式方式切割, 即由 Cpro-1(Zn²⁺ 依赖性金属蛋白酶)进行切割^[16-18].

2 p7 与 HCV 感染

关于 p7 的功能研究较少. p7 可在黑脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 推测其功能与病毒离子孔道蛋白(viroporin)类似, 可使细胞内膜结构不稳定化, 以利于成熟的病毒颗粒释放^[11, 19]. 与 HCV 基因结构相似的牛病毒性腹泻病毒(BVDV)的 p7 对产生子代病毒颗粒必不可少, 对相关病毒颗粒的感染性产生亦是必需的. 基环的连接子的突变可导致病毒无法存活^[20]. Sakai et al^[21]诱变了一个具有感染性基因型 1 a 型 cDNA 克隆, 并通过黑猩猩的肝内转染检测 A 型感染的每一突变的 RNA 转录体. 在转染的哺乳动物细胞中证实了突变多肽恰当处理. p7 的部分、完全删除和细胞质环状结构两个保守残基的替换突变的病毒均不能存活. 故认为 p7 对 HCV 感染是必需的. 1 a 克隆的 p7 嵌合体被感染型的 2 a 克隆嵌合体替换病毒仍不能存活. 这表明 p7 和其他基因组区之间存在的基因型相关的相互作用. p7 在这一相互作用中起关键作用. 他们研究了 3 个具有 1A 主链, 而 p7 特殊区域被 2A 的序列所替换的 p7 嵌合体: 具有 2A 的尾和跨膜区和 1A 细胞质环的 p7 嵌合体并不能存活. 具有 1A 的跨膜区和 2A 的尾和细胞质环的嵌合体亦不能存活. 具有 2A 的跨膜区和细胞质环和 1A 的尾 p7 嵌合体可以存活. 感染的黑猩猩在 2 wk 时进入病毒血症期, 恢复期病毒中有嵌合体基序. 总之, p7 胞腔内氨基和羧基端尾具有基因型相关功能的序列.

HCV 的 3 个结构蛋白(核心蛋白 C 和两个包膜蛋白 E1 和 E2), 6 个非结构蛋白(NS2-NS5B)均与多蛋白的处理和 RNA 复制有关, 然而 p7 为结构蛋白或非结构蛋白仍不清楚. 通过对 HCV 亚基因组复制子的研究发现 p7 对 RNA 复制并不是关键的^[22]. 黄病毒属 BVDV 相应的蛋白对于细胞培养的感染性是关键^[20]. 以 p7 发生框内缺失和点突变感染性 BVDV cDNA 克隆的 RNA 转录体转染细胞研究表明: RNA 复制并不受影响, 但感染性病毒不能产生. 但是在反转录时提供 p7 感染性可恢复. BVDV 的 E2-p7 对细胞培养的活性并不重要, 这是因为 RNA 转录体形成双顺反子结构, 在这一结构上 E2 和 p7 分别表达, 从而产生感染性病毒^[20]. HCV p7 有与病毒细胞外膜孔道蛋白相似的特征. 这些蛋白形成的离子通道病毒可能对病毒装配和释放, 且对病毒颗粒的成熟有重要作用^[11]. 而对 HCV p7 同一家族流感病毒 B 的 NB 蛋白的研究表明, 这些离子通道蛋白可能对于细菌的繁殖并不是关键的.

无 p7 的 HCV 病毒样颗粒可诱导 Balb/c 小鼠产生 Th1 占优势的细胞免疫. 有或没有 p7 的 HCV 病毒样颗粒(HCV-LPs)在形态学和生物物理学特性上是没有区别的, 这再一次证实了 p7 对于病毒的装配是不重要的. 无 p7 的 HCV-LP 可诱导 Th1 细胞占优势的免疫系统产生比有 p7 的 HCV-LP 更强烈免疫应答. 无 p7 的 HCV-LP 可诱导 ADD 小鼠产生体液和细胞免疫. p7-HCV-LP 免疫的 Balb/c 小鼠可诱发 T 辅助细胞 1 产生 γ 干扰素^[23].

Saunier et al 研究发现, 3T3-22Z 细胞可摄取染料标记包括 p7 的 HCV 结构蛋白即 HCV-SP/p7(+), 而 3T3-L1 或 3T3-24X 无法摄取不包括 p7 的 HCV 结构蛋白既 HCV-SP/p7(-). 故认为 p7 可调节 HCV 结构蛋白的内在化. HepG2 对染料标记 HCV-SP/p7(-)的摄取并不像 HCV-SP/p7(+)那样有效, 这是由于 p7 的缺乏可导致包膜蛋白结构变化, 这在相关病毒亦得到验证. p7 对于 HCV 病毒颗粒的细胞结合和进入是重要的^[15].

3 p7 蛋白与 HCV 的治疗

HCV 感染世界上 3% 的人群, 在西方是肝移植的主要指征, 急性感染常是无症状的, 在大多数患者可持续导致慢性化. HCV 抗病毒的治疗局限在 1 型干扰素(长效干扰素)或联合病毒唑、核苷类似物拉米夫定等, 这一治疗方案是昂贵的, 很少患者可以接受, 且只对 50% 的患者有效. 在病毒基因型中, 经常出现治疗耐药. 由于在体外不能成功培养病毒, 使的疫苗和新治疗方法研究受到阻碍. 所有这些使的对 HCV 离子通道 p7 的靶向抗病毒治疗显得尤为重要. 对与 p7 离子通道蛋白同一家族流感病毒 A 的 M2 孔道的研究发现: 金刚烷胺是第一个抗病毒药物^[11].

Griffin et al 研究发现 HCV p7 在哺乳动物细胞的测定中能代替流感病毒的 M2 的相应部分, 这在 BVDV 中亦得到了证明, 而且金刚烷胺在抑制 M2 的浓度时可使 HCV 的 p7 功能丧失. 定位在 HCV p7 两个跨膜 α 螺旋之间的保守的基环的突变可以使 p7 的离子通道功能丧失. p7 的细胞内定位并不被这一突变影响, 且与线粒体相关膜明显重叠. Griffin et al^[11]在应用黑脂质膜(BLM)系统研究表明: 纯化 HIS-p7 在人工的脂质双分子层中形成离子通道, 与 M2 孔道相似. HIS-p7 高效开放的通道被 1 μ mmol/L 的金刚烷胺完全抑制, 这一浓度在体外可有效抑制 M2. 这一效应是近于天然 HIS-p7 特有的, 而 GST-HIS-p7 并不受这一药物的影响, 即使在 1 mmol/L 的浓度. 这一重组蛋白对于离子从 HCV 感染的宿主细胞内质网到细胞质的运输是重要的. p7 离子通道具有对钙离子较钾离子优先通透性, 这与蛋白在活细胞中的网状定位相关, 而且 HIS-p7 高效开放的通道可被 1 μ mmol/L 的金刚烷胺完全抑制, 这一浓度在体外可有效抑制 M2. 这一效应是近于天然 HIS-p7 特有的, 而 GST-HIS-p7 并不受这一药物的影响, 即使在 1 mmol/L 的浓度. 最近的临床研究表明这一药物与现在的治疗相结合对许多患者有效, 尤其对非应答患者, 如与聚乙二醇干扰素联合. 故认为 p7 是金刚烷胺的作用靶点. 由于膜渗漏, 在大肠杆菌中天然 p7 的诱导性表达可产生生长抑制效应, 且这一效应可被金刚烷胺所逆转. 而且 p7 带电荷环突变可抑制这一效应, 这与瘟病毒中的 BVDV 研究结果一致. p7 可诱导哺乳动物细胞提高对潮霉素 B 的通透性. 在生物鉴定中, p7 可替代流感 A M2 蛋白的功能, 亦可被金刚烷胺的加入所抑制. 基于

以上研究, 他们正在发展一新的抗 HCV 复合体。

HCV p7的离子通道受长烷基链的亚氨基糖衍生物抑制, 这一衍生物具有针对 HCV 替代物 BVDV 的抗病毒活性^[19]。在缺乏合适的HCV小动物模型和可靠的体外感染实验测定法的条件下, 可利用相关的 BVDV 实验潜在的抗病毒药物, 并通过与 HCV p7 相似 BVDV 的 70 aa 的蛋白获得大量资料。用 BVDV 在体外感染测定中已证实: 长烷基链的亚氨基糖衍生物包括葡萄糖同功异质体脱氧野尻霉素(DNJ)或半乳糖同功异质体半乳糖酸野尻霉素(DGJ)都是有效的抗病毒抑制剂。DNJ 衍生物可抑制内质网- α -葡萄糖苷酶 I 和 II, 这一抑制可导致宿主和病毒编码糖蛋白(包括 BVDV 和 HCV)的包膜糖蛋白的错误折叠。长烷基链衍生物 N-壬基-DNJ(NN-DNJ) 抗病毒效果较短烷基链 N-丁基-DNJ(NB-DNJ) 显著, 尽管后者在细胞内可更有效的抑制内质网- α -葡萄糖苷酶, 长烷基链 DGJ 衍生物不能被内质网葡萄糖苷酶识别, 故不能抑制内质网葡萄糖苷酶, 也显示了有效的抗病毒活性。因此, 内质网葡萄糖苷酶的抑制与观察到的抗病毒效果无直接相关, 排除了其作为惟一抗病毒机制的可能。另一作用机制与烷基侧链的长度明显相关, 因为这一短链 NB-DGJ 并没有出现抗病毒活性, 而长烷基链衍生物 NN-DGJ 是一有效抑制剂。这是因为长烷基链的亚氨基糖衍生物影响病毒膜糖蛋白的二聚化和改变分泌 BVDV 病毒颗粒糖蛋白的构成, 但并不影响病毒 RNA 的复制或蛋白的合成。小的跨膜蛋白 p7 可作为长烷基链的亚氨基糖衍生物的潜在靶, 因为黄病毒属如登革热病毒和日本脑炎病毒不包括 p7, 则不被长烷基链 DGJ 衍生物抑制, 而瘟病毒属如瘟病毒和嗜肝病毒包括 p7, 则可被抑制。有趣的是, BVDV 经长烷基链的亚氨基糖衍生物治疗后可产生非感染性 BVDV 颗粒。

Pavlovic et al^[19]逐渐提高 BLM 一侧的亚氨基糖衍生物浓度, 观察 p7 诱发的离子通道效应。当应用短烷基链衍生物 NB-DGJ 和 NB-DNJ 时, p7 的通道活性并不改变, 然而逐渐提高长烷基链衍生物 NB-DGJ、NB-DNJ、N-7-氧壬基-6-脱氧-DGJ 剂量导致剂量依赖性的离子通道的抑制。在 140M NN-DGJ、105M NN-DNJ、180M N-7-氧壬基-6-脱氧-DGJ 时可致通道完全抑制。总之, p7 蛋白是一个介于 HCV 结构蛋白非结构蛋白之间的一小蛋白, 在脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 在病毒的自然感染过程中起一定的作用。金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物可抑制 p7 形成的阳离子通道, 从而对 HCV 的治疗发挥重要作用。但关于 p7 的功能仍知之甚少, 需进一步研究。

4 参考文献

- 1 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 2 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 3 成军. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003

- 4 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 基因表达谱芯片筛选 NS5A TP3 转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:306-310
- 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 Majumder M, Steele R, Ghosh AK, Zhou XY, Thornburg L, Ray R, Phillips NJ, Ray RB. Expression of hepatitis C virus non-structural 5A protein in the liver of transgenic mice. *FEBS Lett* 2003;555:528-532
- 7 Lo SY, Selby M, Tong M, Ou JH. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by single amino acid substitution. *Virology* 1994;199:124-131
- 8 Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, Ou JH. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 1995;213:455-461
- 9 Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996;70:4438-4443
- 10 Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 2002;76:3720-3730
- 11 Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003;535:34-38
- 12 Yamaga AK, Ou JH. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem* 2002;277:33228-33324
- 13 Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 1994;68:6147-6160
- 14 Mizushima H, Hijikata M, Asabe S, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol* 1994;68:6215-6222
- 15 Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994;68:5063-5073
- 16 Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10583-10587
- 17 Hirowatari Y, Hijikata M, Tanji Y, Nyunoya H, Mizushima H, Kimura K, Tanaka T, Kato N, Shimotohno K. Two proteinase activities in HCV polypeptide expressed in insect cells using baculovirus vector. *Arch Virol* 1993;133:349-356
- 18 Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67:4665-4675
- 19 Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain minosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6104-6108
- 20 Harada T, Tautz N, Thiel HJ. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* 2000;74:9498-9506
- 21 Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11646-11651
- 22 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
- 23 Lechmann M, Murata K, Satoi J, Vergalla J, Baumert TF, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 2001;34:417-423

胰腺癌的治疗进展

郑宏群, 崔云甫

郑宏群, 崔云甫, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰 腹腔镜外科
黑龙江省哈尔滨市 150086
项目负责人: 崔云甫, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 246 号, 哈
尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰腹腔镜外科. yfcui@hotmail.com
电话: 0451-86605356
收稿日期: 2004-04-16 接受日期: 2004-05-13

摘要

胰腺癌(pancreatic cancer)是常见的消化道恶性肿瘤之一, 由于其早期诊断困难, 因此预后极差, 5 a 生存率不足 5%. 近年来, 胰腺癌的外科手术治疗取得了一定的进步, 尤其是腹腔镜技术的应用为手术切除胰腺癌开辟了新的发展空间. 放射治疗及化学治疗仍然是主要的辅助治疗方法, 其不但可以提高根治术后患者的生存率, 而且可以改善晚期患者的生存质量. 目前, 胰腺癌的有效治疗方法仍然是以外科手术为主, 放射治疗及化学治疗为辅的综合治疗. 随着免疫和分子生物学在肿瘤发生、发展和转移机制等方面研究的不断深入, 使胰腺癌的基因治疗及免疫治疗成为可能, 也使其成为胰腺癌的治疗的新的发展方向. 现就胰腺癌的治疗进展作一综述.

郑宏群, 崔云甫. 胰腺癌的治疗进展. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1695-1700
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1695.asp>

0 引言

胰腺癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 由于其早期诊断困难, 大部分患者就诊时已属晚期, 所以其预后极差, 5 a 生存率不足 5%, 有 85% 的患者在诊断后 12 mo 内死亡^[1]. 尽管胰腺癌的诊断和治疗技术已经有了一定程度的进步, 但根据对美国国立癌症数据库(national cancer database)1985/1995年100 313例胰腺癌患者的数据调查得出的结论: 近 20 a 来, 胰腺癌的总生存率并没有改变^[2]. 胰腺癌的治疗方法包括外科手术治疗、放射治疗、化疗、物理治疗、免疫治疗、基因治疗等多方面. 但有效的治疗是以外科手术为主, 其他治疗为辅的综合治疗.

1 外科手术治疗

1.1 胰十二指肠切除术(pancreatoduodenectomy, PD)
自从 1935 年 Whipple 发明了两步法 PD 以来, 经过几十年的发展, 现在已经成为治疗胰腺癌的标准术式. 该手术切除范围包括胰头(含钩突)、远端胃、十二指肠、上段空肠、胆囊和胆总管, 清除相关淋巴结, 并将胰、胆和胃与空肠重建. 目前, PD 的手术死亡率及严

重并发症发生率已经从 1970 年代的 20-40%, 40-60% 分别降低到 5%, 10% 左右^[3]. 手术的安全性已经有了很大的提高, 但远期疗效仍不能令人满意. 如何提高 PD 术后长期生存率是外科医师一直在探讨的问题. 1970 年代末, 受 Fortner 的区域性胰腺切除的影响, 日本的一些机构开始采取扩大的胰腺癌根治术^[4]. 其主要是根据肿瘤的侵及范围适当扩大手术的切除范围、广泛的淋巴结清扫以及受累的肠系膜上静脉-门静脉的切除. Ishikawa et al^[5]认为, 广泛的淋巴结及相关软组织清扫可以提高胰腺癌患者的 5 a 生存率, 并降低局部复发率. 张怡杰 et al^[6]对 53 例胰头癌患者在 PD 基础上行区域淋巴结廓清治疗后随访发现, 1, 2, 3, 5 a 的生存率分别为 70%, 52.8%, 26.7%, 17.8%. 术后生存时间明显延长, 且手术风险没有增加. Mu et al^[7-8]的报道也证实了扩大根治术的治疗效果优于 Whipple 术式. 而 Henne-Bruns et al^[9]对 72 例胰腺癌患者的调查研究后发现, 扩大的腹膜后淋巴结及相关软组织清扫($n=46$)相对于局部淋巴结清扫($n=26$)比较, 长期生存率并没有改善. 他认为胰腺癌的预后与下列情况有关: (1) 肿瘤的分期; (2) 肿瘤的恶性程度; (3) 淋巴结的侵及范围; (4) 是否侵及门静脉. Nakao et al^[10]报道 1981/1999 年, 196 例患者行胰腺癌切除术, 其中 145 例行门静脉切除重建, 结果发现手术切缘癌细胞阳性的患者无 1 例存活 3 a 以上, 他认为门静脉切除的关键是切缘无残余, 而可能存在切缘残余的患者不应该采用扩大根治术. Launois et al^[11]报道 14 例胰腺癌根治术合并门静脉切除的患者, 2 a 生存率为 15%, 没有 1 例生存 5 a 以上. 可见, 究竟是采用标准的 PD 还是采用扩大根治术目前还存在争议, 需要进一步的临床实践来指导胰腺癌术式的选择.

1.2 保留幽门的胰十二指肠切除术(PPPD) PPPD 由 Watson 在 1944 年首先报道^[1], 该术式在传统 PD 的基础上保留了幽门, 从而减少了胃切除后的并发症, 保留了胃的存储功能并且可以使胃肠激素的水平维持在术前水平. Hashimoto et al^[12]的资料显示, PPPD 术后的患者胰腺的外分泌功能、胰腺实质的厚度及胃泌素的释放量均明显高于 PD 术后的患者. 与传统 PD 相比, PPPD 具有手术创伤小、手术时间短、出血量少以及术后恢复快等优点. 术后早期出现胃排空延迟(DGE)是 PPPD 存在的问题之一, Yamaguchi et al^[13]对 1998 年日本 74 个专业机构的 1 066 例实施 PPPD 患者术后并发症的分析表明, 有 46% 的患者出现明显的 DGE. 但也

有资料显示, DGE 的发生率在 PPPD 与 PD 之间并无明显差异^[14]. PPPD 另一个受质疑的原因是有人认为保留幽门使得相应的淋巴结得不到彻底的清扫, 从而影响患者的预后. 但根据一项对 50 例胰头癌患者术后追踪调查^[15], 1 a 和 3 a 生存率 PD 组($n=27$)分别为 53.8% 及 15.8%; PPPD 组($n=23$)分别为 62.8% 及 19.6%. 两组之间并没有显著差异. 其他一些资料也证实了这个观点^[16-17]. 因此, 只要严格掌握手术的指征, PPPD 可以作为根治胰腺癌的一种选择.

1.3 全胰切除术(TP) TP 是在 PD 的基础上, 切除远端胰腺及脾, 同时清扫胃左动脉、脾动脉、腹腔干周围的淋巴结, 并将肝管与空肠吻合. 全胰切除可以彻底清除癌灶及胰腺周围淋巴结, 并且避免了发生胰痿的危险, 理论上可以提高患者的生存率. 但 Karpoff et al^[18]的报道显示, 全胰切除术并不能提高胰腺癌患者的生存率. 另外, 全胰切除可以带来很多代谢及营养并发症^[19], 也使全胰切除术的应用受到了质疑. 但近年来也有报道显示, 保留幽门的全胰切除术可以改善患者术后的营养状态^[20-21]. 因此, 应严格掌握全胰切除术的手术指征.

1.4 腹腔镜在胰腺癌治疗中的应用 目前, 腹腔镜在胰腺癌治疗方面的应用主要包括: (1) 胰腺癌的分期及可切除性评价; (2) 晚期胰腺癌的姑息治疗; (3) 胰腺癌的切除^[22]. 应用腹腔镜及腹腔镜超声对胰腺癌进行分期和可切除性评价的敏感性及准确性高, 因此避免了不必要的剖腹探查. Durup Scheel-Hincke et al^[23], 对 35 例胰腺癌患者术前行腹腔镜超声检查, 结果显示其 T, N, M 分期的准确性分别为 80%, 76% 及 68%. 总的 TNM 分期的准确性为 68%. 对于评估不可切除性、远处转移以及淋巴结转移, 其敏感性分别为 86%, 43% 及 67%. 联合应用腹腔镜及腹腔镜超声, 判断不可切除肿瘤的准确性可达 89%. John et al^[24]的资料也说明, 腹腔镜及腹腔镜超声在判断肿瘤远处转移及可切除性方面优于 CT 及内镜超声. 近年来, 国内也有利用腹腔镜及腹腔镜超声判断胰腺癌可切除性并取得良好临床效果的报道^[25]. 由于胰腺癌早期诊断困难, 大部分患者就诊时已经失去手术切除的机会, 因此解除肿瘤造成的胆道及胃肠道梗阻成为这类患者面临的主要问题. 以往开放性姑息手术的创伤大, 术后并发症发生率及死亡率高. 将腹腔镜应用于胰腺癌姑息性手术将使这种情况得到改善. Rothlin et al^[26]利用腹腔镜对 14 例胰腺癌患者行姑息手术, 并与开腹手术患者进行对比后得出的资料显示, 术后并发症发生率分别为 7% 及 43% ($P < 0.05$), 术后死亡率分别为 0% 及 29% ($P < 0.05$), 采用腹腔镜手术效果优于开腹手术. 由于胰腺周围解剖复杂, 因此腹腔镜胰腺十二指肠切除术的效果并不理想. 其相对于开腹手术, 无论在手术时间、并发症发生率及住院时间等方面都没有表现出优势. Gagner et al^[27]做过 10 例腹腔镜胰十二指肠切除术, 手术中转率为 40%, 平均手术时间为 8.5 h, 住院时间平均为 22.3 d, 与开腹手术相比

没有优势. 但相信随着腹腔镜技术的不断完善, 其在胰腺癌的治疗方面一定会表现出巨大的潜力.

2 物理因子治疗

2.1 放射治疗 放射治疗是胰腺癌重要的辅助治疗手段之一, 虽然不能明显延长胰腺癌患者的平均生存期, 但可以缓解腰痛及背痛等临床症状, 改善患者的生存质量. 常规外照射(external beam radiotherapy, EBRT)结合化疗是治疗胰腺癌经常采用的方法. 对于可以手术切除的患者, 根治术结合术前或术后放疗可以改善胰腺癌患者的预后. Regine et al^[28]报道, PD 后放疗(切缘阴性者 54Gy, 有残余者 64.8Gy)结合 5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗, 患者中位生存期可达 35 mo, 3 a 生存率达 21%. Mehta et al^[29]也报道, PD 后对瘤床及区域淋巴结照射(45Gy 或 54 Gy)联合 5-FU 持续灌注化疗, 患者中位生存期可达 32 mo, 2 a 及 3 a 生存率分别为 62%, 39%. 对于失去手术切除机会的患者, 放射治疗同样可以改善患者的预后及生存质量. Shinchi et al^[30]报道了 31 例不能手术切除的胰腺癌患者, 其中一组($n=16$)接受常规外照射(50.4Gy)同时联合 5-FU 持续灌注化疗, 而另一组($n=15$)没有接受联合放疗. 通过对两组的对比显示, 接受联合放疗组的中位生存期为 13.2 mo, 1 a 生存率为 53.3%, 优于未治疗组的 6.4 mo 及 0% ($P=0.009$). 肝及腹膜转移的发生率两组分别为 31% 及 64%. 治疗组中 10 例治疗前曾有疼痛, 治疗后 8 例缓解, 缓解期平均持续 5.2 mo. 另外, 术前行联合放疗可以提高胰腺癌的手术切除率, 使某些被认为难以切除的患者重新获得手术切除的机会^[31]. 术中放疗(intraoperative radiotherapy, IORT)的优点是使病灶区域得到了一次高剂量的照射, 最大程度的杀灭肿瘤细胞, 减少术后复发; 并可以精确控制照射剂量和照射范围, 有效地保护了周围健康组织和器官, 副作用较小. Wang et al^[32]对 27 例中晚期胰头癌患者行胆囊空肠吻合术加术中放疗, 同时联合术后动脉灌注化疗. 结果显示, 所有肿瘤均不同程度缩小, 疼痛缓解率为 100%. 6, 12, 24 mo 的生存率分别为 100%, 93.7%, 20%. 平均生存期为 17.9 mo. 他们的结论是, 术中放疗联合灌注化疗是延长中、晚期胰头癌患者生存期的有效方法. Dobelbower et al^[33]对 44 例胰腺癌患者分组治疗后的结果显示, 单纯根治手术组($n=14$)中位生存期为 6.5 mo, 根治术联合 IORT 组($n=6$)、根治术联合 EBRT 组($n=14$)及根治术联合 IORT, EBRT 组($n=10$)的中位生存期分别为 9 mo, 14.5 mo 及 17.5 mo. 他们认为根治术联合辅助放疗的效果优于单纯手术根治, 并且以根治术联合 IORT 及 EBRT 的效果最好. 适形放疗是采用立体定向放疗技术, 使得高剂量区分布的形状在三维方向上与靶区的形状一致, 最大限度地使放射线剂量集中于病变区域, 而使周围正常的组织减少或避免不必要的照射, 提高局部控制率. Ceha et al^[34]报道对 44 例无法切除但没有远处转移的胰腺癌患

者进行大剂量三维立体适形放疗(70-72Gy), 中位随访期 9 mo, 3 mo 后 CT 检查, 27% 的患者肿瘤缩小, 20% 的患者疾病稳定, 40% 的患者出现局部进展; 疼痛缓解率为 68%; 中位生存期为 11 mo, 1 a 生存率为 39%. 他们认为, 高剂量适形放疗在晚期胰腺癌的治疗中是切实可行的, 特别对于疼痛的患者, 可以起到缓解的作用. 周桂霞 et al^[35]对 23 例胰腺癌患者在一定剂量外照射基础上开展了立体定向适形照射的临床研究, 结果多数患者胸背部疼痛明显减轻, 缓解率为 87%; 1 a 和 2 a 生存率分别为 81.16% 和 26.63%; 中位生存期 15 mo. 但立体定向适形放射治疗是目前肿瘤放疗的新进展, 关于如何在治疗胰腺癌时选择最佳照射剂量, 分割方式和与其他治疗方法有机结合等方面还需要进一步的临床研究.

2.2 物理治疗 物理治疗对许多实体肿瘤均有一定的效果, 冷冻、射频、微波固化物理治疗等为常用的治疗手段. 现以射频治疗为例, 简要介绍胰腺癌的物理治疗. 射频治疗的基本原理是控制射频可以改变电流, 通过电极顶部的传导, 造成局部粒子的混乱而产生摩擦热, 经 CT 引导、腹腔镜、开腹手术插入电极, 利用该热量对肿瘤组织热凝, 达到减少肿瘤细胞和改善症状的目的. 近年来, 国内、外均有射频治疗实体肿瘤, 并取得满意临床效果的报道^[36-38]. 但射频技术应用于胰腺的实验及临床研究却鲜见报道. Merkle et al^[39]于 1999 年报告, 应用 MRI 导引经皮射频处理猪胰腺是安全可行的, 随访 1 wk 仅发现有腹泻, 无胰腺炎等并发症发生. Matsui et al^[40]利用射频手段对 20 例不可切除胰腺癌患者行热凝治疗, 射频脉冲 13.56-MHz, 局部温度 50℃, 每次持续 15 min, 根据肿瘤大小重复该治疗 1-15 次. 除 1 例感染性休克和 1 例胃肠道出血外, 其余 18 例患者均未出现明显并发症. 提示该手段治疗胰腺癌是相对安全的. 随访的 17 例患者的 CT 的变化和 / 或血清肿瘤标志物的降低提示该手段对晚期胰腺癌治疗有效. 但治疗组的中位生存期(3 mo)与对照组没有明显差异. 国内田伏洲 et al^[41]的报道, 利用选择性多极射频热缓释仪治疗不能切除的胰腺癌患者 8 例, 6 例术前疼痛的患者均有不同程度的减轻或消失, 平均生存时间 239.6 d, 最短生存时间 112 d, 最长生存时间 305 d. 虽然胰腺癌的物理治疗显示了一定的疗效, 但由于胰腺在解剖和生理上的特殊性, 治疗后有可能造成出血、胰腺炎、胰瘘等并发症, 使物理治疗的应用受到限制. 相信通过加强基础与临床研究, 物理治疗有望成为中晚期胰腺癌治疗的有效手段之一.

3 化学药物治疗

化疗是胰腺癌有效的辅助治疗手段之一, 常用的药物有 5-FU、丝裂霉素 C、顺铂、链脲霉素、阿霉素和表阿霉素以及吉西他滨等. 5-FU 是胰腺癌化疗中应用最广泛的药物, Lutz et al^[42]报道, 26 例胰腺癌患者

单独使用 5-FU 静脉滴注化疗, 反应率为 8%, 中位生存期为 248 d. 吉西他滨是一种新的核苷酸类似物, 由于其药物毒性低, 副作用小, 近年来已经逐渐成为治疗胰腺癌的一线药物. Burris et al^[43]将 126 例胰腺癌患者随机分为两组, 分别采用吉西他滨和 5-FU 进行化疗, 结果显示, 吉西他滨组的临床受益率为 23.8%, 中位生存期为 5.65 mo, 1 a 生存率为 18%, 高于 5-FU 组的 4.8%($P=0.002$)、4.41 mo($P=0.0025$)及 2%. Karasek et al^[44]报道 100 例局部进展或转移的胰腺癌患者使用吉西他滨静脉滴注化疗, 1 次 /wk, 1 000 mg/m², 4 wk 一个疗程. 结果显示总反应率为 13%, 中位生存期为 32 wk.

联合化疗也是被广泛采用的化疗方法, Marantz et al^[45]对 29 例胰腺癌患者联合应用吉西他滨、5-FU 及甲酰四氢叶酸化疗, 总反应率为 21%, 中位生存期 8.4 mo, 1 a 生存率为 36%. Barone et al^[46]报道吉西他滨联合 24 h 静脉滴注 5-FU 治疗不能切除或转移的胰腺癌, 中位生存期 11 mo, 1 a 生存率 33%. 其他一些报道也说明了联合化疗的疗效^[47-51]. 但也有些资料显示, 联合化疗并不比单一药物化疗有优势^[52-53].

关于给药途径, 传统的全身静脉给药由于癌灶部位药物浓度低, 大大降低了化疗药物的作用, 而且毒副作用较大. 局部给药不仅可以提高药物在肿瘤组织中的浓度, 而且可以使药物到达癌灶区域的时间缩短, 从而提高化疗药物的治疗作用, 减少药物的毒副作用. Beger et al^[54]对 20 例胰腺癌患者行术后局部化疗, 中位生存时间 18.5 mo, 高于历史对照组的 9.3 mo ($P<0.0006$). 北京协和医院石海峰 et al^[55]对 22 例中晚期胰腺癌患者采用 Seldinger 法进行动脉灌注化疗, 灌注吉西他滨和 5-FU, 治疗间隔为 3 wk. 临床受益率为 36.4%, 客观缓解率为 13.6%, Kaplan-Meier 法计算 6 mo 和 9 mo 的累计生存率分别为 54.6% 和 28.4%, 频数分布法计算中位生存期为 6.1 mo, 中位疾病进展期为 2.9 mo. 他们认为经动脉灌注吉西他滨和 5-FU 治疗中晚期胰腺癌可以获得较好的临床反应, 并有可能提高患者的生存率.

4 基因治疗

近年来随着分子生物学的进步, 人们对肿瘤发生发展机制的认识有了长足的进步. 肿瘤的基因治疗就是针对肿瘤发生的遗传学背景, 引入外源性目的基因到肿瘤细胞或其他体细胞内以纠正或补偿缺陷基因, 从而达到治疗的目的. 基因治疗大致包括以下几种方法: 灭活突变的癌基因; 补充缺失的抑癌基因; 基因介导的前药物激活治疗; 肿瘤特异性复制健全性病毒治疗; 以及基因介导的免疫激活治疗等. 研究表明 90% 以上的胰腺癌存在 K-ras 原癌基因突变, 约 70% 的胰腺癌存在 p53 抑癌基因突变, 因此许多基因治疗选择 K-ras 基因以及 p53 抑癌基因作为治疗的靶基因. Tsuchida et al^[56]利用重组腺病毒表达抗 K-ras 的核酶来抑制突变 K-ras 基因的转

录, 结果发现可以抑制胰腺癌细胞的生长. Kijima et al^[57]的报道也证实了这一点. 脂质体介导的 K-ras 反义核苷酸的转染实验表明他能抑制胰腺癌细胞株的生长. Bouvet et al^[58]的研究表明应用含野生型 p53 抑癌基因的腺病毒或逆转录病毒转染 p53 基因突变的胰腺癌同样可以抑制肿瘤的生长. Hwang et al^[59]的报道也显示, 逆转录病毒介导的 p53 基因能显著抑制鼠的原发或转移性胰腺癌的生长.

基因介导的前药物激活治疗的原理是利用转基因方法将某些细菌及病毒中特有的药物敏感基因转入肿瘤细胞, 使肿瘤细胞产生某些酶类, 将原来无毒的抗病毒药物或化疗前体药物代谢转化成细胞毒性产物而杀伤宿主细胞. 这些基因被称为“自杀基因”. 如单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV-tk), 其在肿瘤细胞内表达后产生胸苷激酶, 可将与核苷结构类似的丙氧鸟苷(GCV)磷酸化成单磷酸形式, 然后经细胞内激酶代谢转化为三磷酸形式, 三磷酸 GCV 具有细胞毒性, 通过抑制 DNA 复制促进肿瘤细胞死亡. Makinen et al^[60]联合利用腺病毒和逆转录病毒转导 HSV-tk 后再给予 GCV, 发现在体外及动物实验中, 均有杀灭胰腺癌细胞的作用. 其他一些资料也说明了这一点^[61-63].

选择复制性病毒是指那些仅在肿瘤细胞中复制, 而在正常细胞中不能复制的病毒. 利用这一特性, 可以使病毒特异性在肿瘤细胞中复制增生, 引起肿瘤细胞的溶解, 而正常的细胞则不受影响. 胰腺癌研究中应用较多的是单纯疱疹病毒和腺病毒. Kasuya et al^[64]研究发现, 选择复制性疱疹病毒 hrR3 结合 GCV 系统能有效地治疗腹腔内广泛转移的胰腺癌实验鼠, 接受 hrR3 和 GCV 系统治疗的小鼠 70% 生存期达到 150 d, 高于仅接受 hrR3 治疗的 40% 和未治疗的 0%, 并且发现 hrR3 病毒仅在肿瘤细胞中复制. Motoi et al^[65]检测了腺病毒 AxE1AdB 对胰腺癌的作用, 结果表明 AxE1AdB 对离体胰腺癌细胞具有显著的杀伤作用, 对在体胰腺癌肿瘤具有明显的抑制作用. 胰腺癌的基因治疗刚刚起步, 但已经取得了良好的发展趋势, 随着现有技术的不断完善以及新技术的不断出现, 基因治疗胰腺癌将取得突破性的进展.

5 免疫治疗

肿瘤的免疫治疗就是通过诱导及增强机体抗肿瘤免疫反应达到治疗肿瘤的目的, 并可以通过免疫接种或转染某些细胞因子基因等方法实现这一目的. 随着胰腺癌抗原的鉴定, 为免疫接种提供了特异性的靶位. 现在通过特异性肽段、裸 DNA、重组病毒和体外生成含特异性抗原的树突状细胞等方法来提高机体对肿瘤的免疫识别能力, 诱导肿瘤特异性细胞免疫和体液免疫. Schnurr et al^[66]将胰腺癌细胞提取物载入树突状细胞制备抗肿瘤疫苗, 不但可以避免单一抗原的局限性, 而且其不受 MHC 类型限制, 结果表明此种疫苗可以诱导较

强的 T 细胞抗肿瘤免疫反应. 唐朝晖 et al^[67]的资料表明, 利用 IL-8 和胰腺癌细胞裂解物修饰的树突状细胞疫苗对胰腺癌荷瘤小鼠有明显的免疫治疗作用. Gjertsen et al^[68]联合 Ras 肽疫苗和 GM-CSF 对晚期胰腺癌患者皮下注射, 成功诱导抗肿瘤免疫, 患者能够耐受免疫治疗且生存期延长.

某些细胞因子, 如 IL-2、IFN- α 、GM-CSF 等, 在胰腺癌的免疫治疗中可以发挥明显的作用. Abdel-Wahab et al^[69]利用 IL-2 联合化疗治疗进展期胰腺癌, 与未治疗组比较, IL-2 治疗组的患者表现出明显的疼痛减轻、体重增加、肿瘤体积缩小、生存期明显延长. Ogawa et al^[70]利用腺病毒载体转染 GM-CSF 基因, 治疗小鼠胰腺癌, 证实转染 GM-CSF 基因的胰腺癌细胞可以作为新的辅助治疗方法, 用于外科治疗后的原发和转移性胰腺癌. 随着胰腺癌免疫治疗研究的深入, 人们将能够更好的利用机体强大的免疫系统, 使其在胰腺癌的治疗中发挥更大的作用.

总之, 胰腺癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 其早期诊断困难, 预后较差, 5 a 生存率 1-2%, 85% 的患者在诊断后 12 mo 内死亡. 手术切除是目前根治胰腺癌惟一有效的方法, PD 手术仍是胰腺癌根治的标准术式, 但是越来越多的外科医师将 PPPD 用于胰腺癌的治疗, 并证明他是一种安全、根治性的切除手术, 并且术后患者的生活质量、体重增加和社会活动能力都优于 PD 术后的患者. 腹腔镜在胰腺癌治疗中的应用也开辟了外科治疗胰腺癌的新途径. 放疗和化疗是重要的辅助治疗手段, 对于可以手术切除的患者, 手术结合放、化疗可以提高术后生存率; 对于无法切除的患者, 姑息性放、化疗可以缓解疼痛等症状, 改善患者的生存质量, 对延长患者的生命也有一定的作用. 物理治疗对缓解中、晚期胰腺癌患者的症状, 改善生活质量方面有一定的作用, 相信通过努力, 其也将成为一种有效的治疗手段. 虽然胰腺癌的基因治疗和免疫治疗还处于实验研究阶段, 仅有少部分进入临床试验, 但他们为胰腺癌的治疗开辟了崭新的领域. 相信随着他们的发展, 不久的将来, 胰腺癌的治疗效果必将有更大的改观.

6 参考文献

- 1 Friess H, Liao Q, Zhao YP, Büchler MW. Surgical treatment for pancreatic cancer. *Chin J Hepatobiliary Surg* 2002;8:515-523
- 2 Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 1999;189:1-7
- 3 Berberat PO, Friess H, Kleeff J, Uhl W, Buchler MW. Prevention and treatment of complications in pancreatic cancer surgery. *Dig Surg* 1999;16:327-336
- 4 Takada T. Surgery for carcinoma of the pancreas in Japan. Past, present, and future aspects. *Digestion* 1999;60(Suppl 1):114-119
- 5 Ishikawa O, Ohigashi H, Yamada T, Sasaki Y, Imaoka S, Nakaizumi A, Uehara H, Tanaka S, Takenaka A. Radical resection for pancreatic cancer. *Acta Gastroenterol Belg* 2002; 65:166-170

- 6 张怡杰, 唐岩, 胡先贵, 胡志浩, 刘瑞, 金钢, 邵成浩. 区域淋巴结廓清在胰头癌根治术中的应用. *中华肝胆外科杂志* 2003;9:463-465
- 7 Mu DQ, Peng SY, Wang GF. Significance of extended radical resection for cancer of pancreatic head. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004;26:173-176
- 8 Mu DQ, Peng SY, Wang GF. Risk factors influencing recurrence following resection of pancreatic head cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:906-909
- 9 Henne-Bruns D, Vogel I, Luttes J, Kloppel G, Kremer B. Surgery for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head:staging, complications, and survival after regional versus extended lymphadenectomy. *World J Surg* 2000;24:595-601
- 10 Nakao A, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Harada A, Nomoto S, Ekmel T, Yamashita K, Hatsuno T. The role of extended radical operation for pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:949-952
- 11 Launois B, Stasik C, Bardaxoglou E, Meunier B, Champion JP, Greco L, Sutherland F. Who benefits from portal vein resection during pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer? *World J Surg* 1999;23:926-929
- 12 Hashimoto N, Yasuda T, Haji S, Nomura H, Ohyanagi H. Comparison of the functional and morphological changes in the pancreatic remnant between pylorus-preserving pancreatoduodenectomy and pancreatoduodenectomy. *Hepatogastroenterology* 2003;50:2229-2232
- 13 Yamaguchi K, Tanaka M, Chijiwa K, Nagakawa T, Imamura M, Takada T. Early and late complications of pylorus-preserving pancreatoduodenectomy in Japan 1998. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999;6:303-311
- 14 van Berge Henegouwen MI, van Gulik TM, DeWit LT, Allema JH, Rauws EA, Obertop H, Gouma DJ. Delayed gastric emptying after standard pancreaticoduodenectomy versus pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy:an analysis of 200 consecutive patients. *J Am Coll Surg* 1997;185:373-379
- 15 Yamaguchi K, Kishinaka M, Nagai E, Nakano K, Ohtsuka T, Chijiwa K, Tanaka M. Pancreatoduodenectomy for pancreatic head carcinoma with or without pylorus preservation. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1479-1485
- 16 Seiler CA, Wagner M, Sadowski C, Kulli C, Buchler MW. Randomized prospective trial of pylorus-preserving vs. Classic duodenopancreatectomy (Whipple procedure):initial clinical results. *J Gastrointest Surg* 2000;4:443-452
- 17 Heise JW. Surgical technique and outcome in pancreatic carcinoma. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2000;89:2003-2010
- 18 Karpoff HM, Klimstra DS, Brennan MF, Conlon KC. Results of total pancreatectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *Arch Surg* 2001;136:44-47
- 19 Dresler CM, Fortner JG, McDermott K, Bajorunas DR. Metabolic consequences of (regional) total pancreatectomy. *Ann Surg* 1991;214:131-140
- 20 Wagner M, Z'graggen K, Vagianos CE, Redaelli CA, Holzinger F, Sadowski C, Kulli C, Zimmermann H, Baer HU, Buchler MW. Pylorus-preserving total pancreatectomy. Early and late results. *Dig Surg* 2001;18:188-195
- 21 Sugiyama M, Atomi Y. Pylorus-preserving total pancreatectomy for pancreatic cancer. *World J Surg* 2000;24:66-70
- 22 刘祥德, 董家鸿. 腹腔镜胰腺外科的应用现状与展望. *中华外科杂志* 2002;40:792-794
- 23 Durup Scheel-Hincke J, Mortensen MB, Qvist N, Hovendal CP. TNM staging and assessment of resectability of pancreatic cancer by laparoscopic ultrasonography. *Surg Endosc* 1999;13:967-971
- 24 John TG, Wright A, Allan PL, Redhead DN, Paterson-Brown S, Carter DC, Garden OJ. Laparoscopy with laparoscopic ultrasonography in the TNM staging of pancreatic carcinoma. *World J Surg* 1999;23:870-881
- 25 Zhao ZW, He JY, Tan G, Wang HJ, Li KJ. Laparoscopy and laparoscopic ultrasonography in judging the resectability of pancreatic head cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:609-611
- 26 Rothlin MA, Schob O, Weber M. Laparoscopic gastro-and hepaticojejunostomy for palliation of pancreatic cancer: a case controlled study. *Surg Endosc* 1999;13:1065-1069
- 27 Gagner M, Pomp A. Laparoscopic pancreatic resection: Is it worthwhile? *J Gastrointest Surg* 1997;1:20-26
- 28 Regine WF, John WJ, McGrath P, Strodel WE, Mohiuddin M. The feasibility of dose escalation using concurrent radiation and 5-fluorouracil therapy following pancreaticoduodenectomy for pancreatic carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000;7:53-57
- 29 Mehta VK, Fisher GA, Ford JM, Oberhelman HA, Vierra MA, Bastidas AJ, Poen JC. Adjuvant radiotherapy and concomitant 5-fluorouracil by protracted venous infusion for resected pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1483-1487
- 30 Shinchi H, Takao S, Noma H, Matsuo Y, Mataka Y, Mori S, Aikou T. Length and quality of survival after external-beam radiotherapy with concurrent continuous 5-fluorouracil infusion for locally unresectable pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:146-150
- 31 Aristu J, Canon R, Pardo F, Martinez-Monge R, Martin-Algarra S, Manuel Ordonez J, Villafranca E, Moreno M, Cambeiro M, Azinovic I. Surgical resection after preoperative chemoradiotherapy benefits selected patients with unresectable pancreatic cancer. *Am J Clin Oncol* 2003;26:30-36
- 32 Wang YW, Lou JC, Xue HZ. Effect of intraoperative and post-operative radiotherapy and chemotherapy for intermediate and advanced pancreatic head carcinoma. *Ai Zheng* 2003;22:520-522
- 33 Dobelbower RR, Merrick HW, Khuder S, Battle JA, Herron LM, Pawlicki T. Adjuvant radiation therapy for pancreatic cancer:a 15-year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;39:31-37
- 34 Ceha HM, van Tienhoven G, Gouma DJ, Veenhof CH, Schneider CJ, Rauws EA, Phoa SS, Gonzalez Gonzalez D. Feasibility and efficacy of high dose conformal radiotherapy for patients with locally advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* 2000;89:2222-2229
- 35 周桂霞, 陈国雄, 崔书祥, 赵卫东, 杨东. 体部立体定向适形放射治疗胰腺癌的临床探讨. *中华肝胆外科杂志* 2001;7:415-417
- 36 Lee JM, Jin GY, Goldberg SN, Lee YC, Chung GH, Han YM, Lee SY, Kim CS. Percutaneous radiofrequency ablation for inoperable non-small cell lung cancer and metastases: preliminary report. *Radiology* 2004;230:125-134
- 37 Hu D, Ren Y, Wang C. Percutaneous radiofrequency ablation treatment of hepatocellular cancer. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:1046-1049
- 38 陈夷, 吴孟超, 陈汉, 张智坚, 高也陶. 经皮肝穿刺射频消融术对肝癌的疗效观察. *中华肿瘤杂志* 2003;25:88-90
- 39 Merkle EM, Haaga JR, Duerk JL, Jacobs GH, Brambs HJ, Lewin JS. MR Imaging-guided radio-frequency thermal ablation in the pancreas in a porcine model with a modified clinical C-arm system. *Radiology* 1999;213:461-467
- 40 Matsui Y, Nakagawa A, Kamiyama Y, Yamamoto K, Kubo N, Nakase Y. Selective thermocoagulation of unresectable pancreatic cancers by using radiofrequency capacitive heating. *Pancreas* 2000;20:14-20
- 41 田伏洲, 戴睿武, 郑然, 李旭, 蔡忠红, 高晓美, 罗皓. 选择性多极射频热缓释仪治疗不能切除的胰腺癌. *中华外科杂志* 2003;41:716
- 42 Lutz MP, Koniger M, Mucbe R, Ellenrieder V, Steinkamp M, Adler G, Gress TM. A phase II study of weekly 24-h infusion of high-dose 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer. *Z Gastroenterol* 1999;37:993-997
- 43 Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer:a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-2413
- 44 Karasek P, Skacel T, Kocakova I, Bednarik O, Petruzalka L, Melichar B, Bustova I, Spurny V, Trason T. Gemcitabine

- monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a prospective observational study. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:581-586
- 45 Marantz A, Jovtis S, Almira E, Balbiani L, Castilla JL, Fein L, Lewi D, Pascon G, Pinkevicius R, Uranga G, Abal M, Muino M, Reale M, Agosto S. Grupo de tumores gastrointestinales. Phase II study of gemcitabine, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2001;28(3 Suppl 10):44-49
- 46 Barone C, Cassano A, Corsi DC, Pozzo C, Longo R, Schinzari G, Quirino M, Battelli C, Basso M. Weekly gemcitabine and 24-hour infusional 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer: a phase I-II study. *Oncology* 2003;64:139-145
- 47 Stathopoulos GP, Syrigos K, Polyzos A, Fountzilias G, Rigatos SK, Ziras N, Potamiannou A, Tsiakopoulos I, Androulakis N, Aravantinos G, Athanasiadis A, Papakotoulas P, Georgoulas V. Front-line treatment of inoperable or metastatic pancreatic cancer with gemcitabine and capecitabine: an intergroup, multicenter, phase II study. *Ann Oncol* 2004;15:224-229
- 48 Jing Z, Nan KJ, Zhang XZ, Ruan ZP, Guo H, Xu R. Therapeutic effects of systemic chemotherapy on advanced pancreatic cancer patients. *Ai Zheng* 2004;23:439-442
- 49 Novarino A, Chiappino I, Bertelli GF, Heouaine A, Ritorto G, Addeo A, Bellone G, Merlano M, Bertetto O. Phase II study of cisplatin, gemcitabine and 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2004;15:474-477
- 50 Kim TW, Kang HJ, Ahn JH, Lee K, Chang HM, Kang YK, Lee JS. Phase II study of gemcitabine, UFT and leucovorin in patients with advanced pancreatic cancer. *Acta Oncol* 2002;41:689-694
- 51 Petty RD, Nicolson MC, Skaria S, Sinclair TS, Samuel LM, Koruth M. A phase II study of mitomycin C, cisplatin and protracted infusional 5-fluorouracil in advanced pancreatic carcinoma: efficacy and low toxicity. *Ann Oncol* 2003;14:1100-1105
- 52 Scheithauer W, Schull B, Ulrich-Pur H, Schmid K, Raderer M, Haider K, Kwasny W, Depisch D, Schneeweiss B, Lang F, Kornek GV. Biweekly high-dose gemcitabine alone or in combination with capecitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: a randomized phase II trial. *Ann Oncol* 2003;14:97-104
- 53 Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB 3rd. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern cooperative oncology group trial E2297. *J Clin Oncol* 2002;20:3270-3275
- 54 Beger HG, Link KH, Gansauge F. Adjuvant regional chemotherapy in advanced pancreatic cancer: results of a prospective study. *Hepatogastroenterology* 1998;45:638-643
- 55 石海峰, 金征宇, 周智强, 杨宁, 刘巍, 潘杰, 蔡力行, 赵玉沛. 经动脉灌注盐酸吉西他滨和 5-氟尿嘧啶治疗中晚期胰腺癌的疗效分析. *中华放射学杂志* 2002;36:1072-1074
- 56 Tsuchida T, Kijima H, Hori S, Oshika Y, Tokunaga T, Kawai K, Yamazaki H, Ueyama Y, Scanlon KJ, Tamaoki N, Nakamura M. Adenovirus-mediated anti-K-ras ribozyme induces apoptosis and growth suppression of human pancreatic carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2000;7:373-383
- 57 Kijima H, Yamazaki H, Nakamura M, Scanlon KJ, Osamura RY, Ueyama Y. Ribozyme against mutant K-ras mRNA suppresses tumor growth of pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2004;24:559-564
- 58 Bouvet M, Bold RJ, Lee J, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ, McConkey DJ, Chandra J, Chada S, Fang B, Roth JA. Adenovirus-mediated wild-type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 1998;5:681-688
- 59 Hwang RF, Gordon EM, Anderson WF, Parekh D. Gene therapy for primary and metastatic pancreatic cancer with intraperitoneal retroviral vector bearing the wild-type p53 gene. *Surgery* 1998;124:143-150
- 60 Makinen K, Loimas S, Wahlfors J, Alhava E, Janne J. Evaluation of herpes simplex thymidine kinase mediated gene therapy in experimental pancreatic cancer. *J Gene Med* 2000;2:361-367
- 61 Carrio M, Romagosa A, Mercade E, Mazo A, Nadal M, Gomez-Foix AM, Fillat C. Enhanced pancreatic tumor regression by a combination of adenovirus and retrovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Ther* 1999;6:547-553
- 62 Wang J, Lu XX, Chen DZ, Li SF, Zhang LS. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:400-403
- 63 赵亚刚, 杜标炎, 张宏斌, 周兰, 周梅花. 逆转录病毒介导单纯疱疹病毒-胸苷激酶基因对胰腺腺癌细胞的杀伤作用. *中华普通外科杂志* 2002;17:740-742
- 64 Kasuya H, Nishiyama Y, Nomoto S, Hosono J, Takeda S, Nakao A. Intraperitoneal delivery of hrR3 and ganciclovir prolongs survival in mice with disseminated pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 1999;72:136-141
- 65 Motoi F, Sunamura M, Ding L, Duda DG, Yoshida Y, Zhang W, Matsuno S, Hamada H. Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus. *Hum Gene Ther* 2000;11:223-235
- 66 Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Then F, Dauer M, Endres S, Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Res* 2001;61:6445-6450
- 67 唐朝晖, 邹声泉, 邱文洪, 杨想平, 裘法祖. 白介素-18与癌细胞裂解物修饰的树突状细胞疫苗对胰腺癌的免疫治疗作用. *中华实验外科杂志* 2003;20:590-592
- 68 Gjertsen MK, Buanes T, Rosseland AR, Bakka A, Gladhaug I, Soreide O, Eriksen JA, Moller M, Baksaas I, Lothe RA, Saeterdal I, Gaudernack G. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001;92:441-450
- 69 Abdel-Wahab M, El-Shennawy F, Agha S, Ragab E, Fathi O, Sultan A, Elghawalby N, Ezzat F. Evaluation of cell mediated immunity in advanced pancreatic carcinoma before and after treatment with interleukin-2 (IL-2). *Hepatogastroenterology* 1999;46(Suppl 1):1293-1296
- 70 Ogawa T, Kusumoto M, Mizumoto K, Sato N, Nagai E, Ikubo A, Aoki Y, Tanaka M. GM-CSF gene therapy using adenoviral vector in hamster pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000;7:306-311

酵母双杂交技术筛选 HCV F 蛋白结合蛋白基因

黄燕萍, 成军, 王琳, 杨倩, 杨瑗, 白桂芹, 刘敏, 张树林

黄燕萍, 成军, 王琳, 杨倩, 杨瑗, 白桂芹, 刘敏, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 丙型肝炎病毒(HCV)F蛋白是一个新的HCV基因产物, 其生物学特性目前尚不明确, 我们应用酵母双杂交系统技术进行筛选F蛋白结合蛋白基因。

方法: 构建F蛋白诱饵质粒, 转化酵母AH109后与含肝细胞cDNA文库质粒的酵母Y187进行配合, 在涂有X- α -gal营养缺陷型培养基(SD/-Trp-Leu-His-Ade)上筛选生长。挑选蓝色克隆, 提取此酵母克隆的质粒, 转化大肠杆菌提取质粒DNA后测序, 进行生物信息学分析。

结果: 筛选出36个与F蛋白特异性相互作用的克隆, 其中11个为人类酶原颗粒蛋白, 5个锌指蛋白, 6个SL15蛋白, 2个过氧化物酶体离子蛋白酶, 1个补体调节蛋白因子, 2未知功能基因。

结论: 克隆到的基因对以后研究F蛋白的功能有一定提示作用。

黄燕萍, 成军, 王琳, 杨倩, 杨瑗, 白桂芹, 刘敏, 张树林. 酵母双杂交技术筛选HCV F蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1701-1704
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1701.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属黄病毒科, 基因组为单股正链RNA, 长度约为9.6千碱基对(kb), 编码一个约3010个氨基酸残基(aa)组成的多蛋白, 在病毒和宿主细胞蛋白酶的共同裂解作用下, 至少切割产生10个病毒基因编码产物: C、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B。F蛋白是HCV基因组RNA核心蛋白编码序列表达的一个17 ku蛋白, 与核心蛋白有一个重叠的编码序列(5-485 nt)^[1-3], 其生物学功能尚不明确。我们通过酵母双杂交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 寻找可与F蛋白相互作用的蛋白, 为揭示F蛋白潜在的生物学功能提供依据^[4-5]。

1 材料和方法

1.1 材料 Saccharomyces cerevisiae AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)、预转化入酵母的对照质粒pGBKT7-53(AH109)、编码DNA-BD/鼠p53融合蛋白、pTD1-1(Y187)、质粒pACT2中编码AD/SV40大T抗原融合蛋白、预转化的cDNA肝文库(Y187)、质粒pACT2表达AD/cDNA文库融合蛋白(PT3183-1), pGBKT7-BD克隆载体、pGADT7-AD克隆载体、pGBKT7-53对照质粒、pGBKT7-Lam对照质粒, 酵母YPDA培养基、SD/-Trp培养基、SD/-Leu培养基、SD/-Trp/-Leu培养基、SD/-Trp/-Leu/-His培养基、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基、X- α -半乳糖苷酶(Gal)等均购自Clontech公司; 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 F蛋白的酵母表达载体pGBKT7-F由本室构建, 用醋酸锂法^[6]转入酵母细胞AH109后, 在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上培养, 无集落生长, 排除其自身激活作用。挑取在SD/-Trp培养基上的转化子, 即pGBKT7-F(AH109), 基数大于 1×10^{12} 细胞/L, 与肝细胞cDNA文库混合, 30 轻摇配合过夜, 24 h后铺板SD/-Trp/-Leu/-His25块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade25块。同时进行阳性对照实验及文库滴定。生长12-16 d后把长出的大于2 mm的酵母集落, 在铺有X- α -半乳糖苷酶的SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落。

1.2.2 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的Lyticase法提取酵母质粒。提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 与含有氨苄青霉素(SOB)平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序。阳性克隆DNA测序后, 提交GenBank比对, 进行生物信息学分析。

2 结果

2.1 筛选克隆 Bgl I 酶切鉴定 因质粒pACT2内含有2个Bgl I酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 故使用该内切酶消化将释放出所筛选到的肝细胞文库的基因片断(图1)。中出现的各个大小不同的DNA片断证实我们筛选的克隆为阳性克隆, 而非配合后在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基生长的假阳性克隆。

2.2 cDNA测序与同源性分析 挑选36个克隆测序, 与GenBank数据库进行比较。36个克隆中有35个均与已知基因的部分序列高度同源(97-100%), 这些已知基因

包括人类酶原颗粒蛋白、人类 SL15 蛋白、人类锌指蛋白 83、人类锌, α 2- 糖蛋白 1、人类过氧化物酶体离子蛋白酶、人类补体调节蛋白因子 1、人类血管

紧张素原、人类唾液酸转移酶、人类丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶抑制剂、人类组织蛋白酶和人类玻璃体结合蛋白等共 11 种, 2 个为未知功能基因(表 1).

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
1	人类酶原颗粒蛋白 16	11	99
2	人类 SL15 蛋白	6	99-100
3	人类锌指蛋白 83	5	100
4	人类锌 α 2- 糖蛋白 1	4	99
5	人类过氧化物酶体离子蛋白酶	2	100
6	人类补体调节蛋白因子 1	1	98
7	人类血管紧张素原(丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶抑制剂, clade A- α 1 抗蛋白酶, α 1- 抗胰蛋白酶)	1	97
8	人类唾液酸转移酶(β 半乳糖苷酶 α -2, 6 唾液酸转移酶)	1	97
9	人类 C1 抑制剂, 丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶抑制剂	1	99
10	人类组织蛋白酶 B	1	99
11	人类玻璃体结合蛋白(血清传播因子, 促生长因子)	1	100
12	人类未知基因	2	98-99

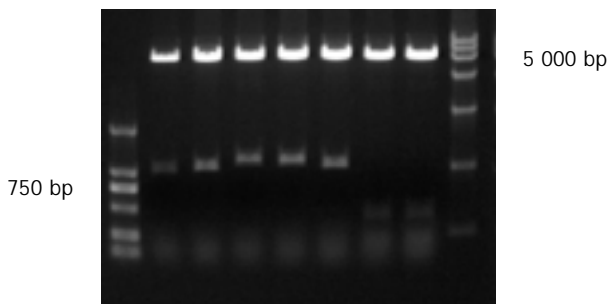


图 1 部分不同的克隆 BglI 酶切鉴定.

3 讨论

丙型肝炎病毒是输血后肝炎主要的病原体, 常导致严重肝病, 包括肝硬化和肝细胞癌. 由于缺乏有效的体外复制系统和适当的 HCV 感染的动物模型, 阻碍了其有关发病机制、病毒复制以及防治策略的研究. HCV 核心蛋白构成了病毒的核衣壳成分, 同时也是重要的调节因子, 大量证据表明核心蛋白可以直接调节细胞内信号传导、参与宿主的免疫应答、影响细胞凋亡信号, 反式调节病毒及细胞内的一些基因的转录和干扰脂类代谢, 其分子机制之一就是病毒与宿主蛋白质之间的相互作用^[7-18]. F 蛋白是一个新的 HCV 基因产物^[1-3]. 编码 F 蛋白的开放阅读框与核心蛋白的编码序列重叠, 是翻译过程中核糖体阅读框发生 -2/+1 位漂移产生的, 与核心蛋白具有相同的 N- 端序列. F 蛋白与核心蛋白、NS5A 相似, 亚细胞定位于内质网^[19-22], 但显示比核心蛋白有更多的序列差异性, 核心蛋白的突变导致患者逃避宿主免疫反应, 可能触发了细胞的恶性转化. 核心蛋白的某些功能是否是 F 蛋白的作用, F 蛋白对病毒的侵入、是否调控 HCV RNA 的复制, 是否参与病毒的形态形成及在病毒生命周期中调节细胞

功能是否发挥重要作用, 值得进一步研究.

病毒蛋白与肝细胞蛋白之间相互作用是病毒致病的关键之一, 他们的相互作用介导病毒进入肝细胞, 他们的网络作用可改变蛋白的正常生物学功能, 影响病毒自身的复制、持续感染和致病. 酵母双杂交系统是分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用的一种有效的基因分析方法, 为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法. 酵母双杂交系统³^[23-25]的原理是利用 α 型和 α 型酵母配合形成二倍体细胞内诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用, 他有三个报告基因用来筛选及严格的对照, 阳性率达到 95%, 假阳性率为 5% 以下. 我们在实验中根据此技术构建了 pGBKT7-F 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HCV F 基因, 与预转化的酵母肝细胞 cDNA 文库进行双杂交筛选, 得到真正阳性克隆 36 个, 进行测序分析. 其中 34 个为已知基因序列, 2 个未知功能基因序列.

我们筛选到了大量相同蛋白(11 个相同克隆), 人类酶原颗粒蛋白 16(ZG16). ZG16 在胰腺细胞中大量表达, 是酶原颗粒内部表面部分膜蛋白基质的连接蛋白, 已经证明由硫酸蛋白分解素、糖蛋白和植物凝集素 ZG16P 组成的部分膜蛋白基质在酶原颗粒形成中对酶原限制及选择是非常重要的, ZG16 影响着蛋白合成率、分泌性蛋白细胞内的转运率及酶原的成熟^[26-29]. 有研究表明 HCV 感染和其所致的慢性肝病与糖尿病有明显的相关性^[30-31], 糖耐量降低与丙型肝炎严重程度有关. 我们实验结果表明 HCV F 蛋白与 ZG16 相互作用, 为揭示 HCV F 蛋白的功能、HCV 致病机制及与糖尿病的关系的研究提供了新的线索.

我们筛选到的另一种重要蛋白是锌 α_2 糖蛋白(ZAG). ZAG 存在于精液及其他体液中, 肝细胞被认为是血浆 ZAG 的主要来源. 肿瘤可以诱导正常前列腺或其他分泌性上皮分泌内源性的 ZAG, 前列腺癌、乳腺癌及汗腺瘤均含有 ZAG. 有研究证实 ZAG 产物与肿瘤分化状态相关, 肿瘤 ZAG 产物可引起全身性的 ZAG 浓度增加, ZAG 可诱导脂肪分解, 导致恶病质. 人和动物实验表明 ZAG 是前列腺癌潜在的血清标志物, ZAG 表达是否可预示风险和疾病恶化^[32]. 玻璃体结合蛋白. 属非胶原蛋白, 又被称为血清传播因子、S 蛋白和上皮细胞移动因子, 是人类血浆和血清中的糖蛋白、粘连蛋白, 他也存在于不同的疏松结缔组织中, 特别是弹性纤维中. 玻璃体结合蛋白通过在细胞玻璃体结合蛋白特异性细胞表面受体的细胞结合域 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列相互作用而结合到细胞上. 他可调节血凝固和补体诱导的细胞溶解, 结合了基质的玻璃体结合蛋白在调节细胞周围蛋白溶解起着重要作用. 玻璃体结合蛋白可促进许多正常和新生物细胞的细胞附着、传播、增生及分化^[33-34]. C1 抑制物(C1INH)是血清中高度糖基化的一种蛋白质, 含糖量高达 35-49%. 与其他几种丝氨酸蛋白酶抑制物 (serpin) 超家族成员 (α_1 抗胰蛋白酶、 α_1 抗糜蛋白酶及抗凝血酶 等) 约有 30% 的氨基酸同源性. C1INH 可与活化的 C1r 或 C1s 结合形成稳定的复合物而导致 C1 丝氨酸蛋白酶失活. C1INH 能防止在缺乏抗体时, C1 以很低但仍有一定速率出现的自发激活. C1INH 还可抑制凝血因子 a、a、激肽释放酶及纤溶酶, 因而其在凝血、激肽和纤溶系统中也有重要的调节作用^[35-36].

唾液酸转移酶是糖基转移酶家族中的成员, 存在于高尔基体中, 具有催化细胞黏附分子-神经节苷酯聚唾液酸化的功能, 神经节苷酯是一类膜结合的含唾液酸的糖鞘脂, 是细胞黏附和体外培养恶性细胞生长的重要因子^[37]. 近年糖鞘脂作为信号分子直接参与信号传导或通过影响其他膜蛋白的机制研究是热点, 他将促使我们对细胞识别、信号传递、神经发育进一步认识.

除此之外, HCV F 还与补体调节蛋白因子 1、人类过氧化物酶体离子蛋白酶、人类组织蛋白酶 B 及 2 个推定蛋白基因有相互作用. 我们筛选到的一些结合蛋白分别与糖代谢, 免疫调节, 肿瘤发生、发展等有密切关系. 这些结合蛋白的发现, 为揭示 HCV F 生物学功能、HCV 致病机制及其恶性转化的原因提供了新的研究线索.

4 参考文献

- 1 Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, Mavromara P. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 2002;277:17713-17721
- 2 Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001;7:710-721
- 3 Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frame shift. *EMBO J* 2001;20:3840-3848

- 4 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 陆荫英, 夏小兵, 李莉, 杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. *军医进修学院学报* 2002;23:1-3
- 5 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002;82:673-677
- 6 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
- 7 Kunkel M, Watowich SJ. Biophysical characterization of hepatitis C virus core protein: implications for interactions within the virus and host. *FEBS Lett* 2004;557:174-180
- 8 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang L, Duan H, Lu Y, Yang J, Liu Y, Xia X, Wang G, Dong J, Li L, Zhong Y, Hong Y, Chen J. Screening and cloning gene of hepatocyte protein interacting with hepatitis C virus core protein. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:351-353
- 9 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein—a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 10 Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Lim SG, Tan YH, Hong WJ. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 2001;290:224-236
- 11 成军. 丙型肝炎病毒致病的分子生物学机制. *解放军医学杂志* 2003;28:23-27
- 12 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
- 13 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
- 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 刘重阳, 刘为纹, 陈东风, 杨建民, 房殿春. 丙型肝炎病毒核心蛋白对细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:1125-1128
- 16 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
- 17 Monto A. Hepatitis C and steatosis. *J Semin Gastrointest Dis* 2002;13:40-46
- 18 Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 2001;33:1358-1364
- 19 Brass VE, Bieck R, Montserret B. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2002;277:8130-8139
- 20 Okamoto K, Moriishi K, Miyamura T, Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2004;78:6370-6380
- 21 Mclauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J EMBO* 2002; 21:3980-3988
- 22 Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292:198-210
- 23 Osman A. Yeast two-hybrid assay for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 2004;270:403-422
- 24 Miller J, Stajlgjar I. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. *Methods Mol Biol* 2004;261:247-262
- 25 Xia XB, Cheng J, Wang G, Yang JZ, Liu Y, Dong J, Wang L, Li K. Expression of human augmentor of liver regeneration in *Pichia pastoris*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:743-746
- 26 Kalus I, Hodel A, Koch A, Kleene R, Edwardson JM, Schrader M. Interaction of syncollin with GP-2, the major membrane

- protein of pancreatic zymogen granules, and association with lipid microdomains. *Biochem J* 2002;362:433-442
- 27 Hodel A, An SJ, Hansen NJ, Lawrence J, Wasle B, Schrader M, Edwardson JM. Cholesterol-dependent interaction of syncollin with the membrane of the pancreatic zymogen granule. *Biochem J* 2001;356:843-850
- 28 Schmidt K, Schrader M, Kern HF, Kleene R. Regulated apical secretion of zymogens in rat pancreas: Involvement of the GPI-anchored glycoprotein GP-2, the lectin ZG16p and cholesterol-glycosphingolipid enriched microdomains. *J Biol Chem* 2001;276:14315-14323
- 29 Braun M, Thevenod F. Photoaffinity labeling and purification of ZG-16p, a high-affinity dihydropyridine binding protein of rat pancreatic zymogen granule membranes that regulates a K(+)-selective conductance. *Mol Pharmacol* 2000;57:308-316
- 30 Arao M, Murase K, Kusakabe A, Yoshioka K, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Tagaya T, Yamanouchi K, Ichimiya H, Sameshima Y, Kakumu S. Prevalence of diabetes mellitus in Japanese patients infected chronically with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2003; 38:355-360
- 31 邵清, 成军, 白雪帆. 丙型肝炎病毒与2型糖尿病关系的研究. 世界华人消化杂志 2004;12:143-145
- 32 Hale LP, Price DT, Sanchez LM, Demark-Wahnefried W, Madden JF. Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:846-853
- 33 Stawowy P, Kallisch H, Veinot JP, Kilimnik A, Prichett W, Goetze S, Seidah NG, Chretien M, Fleck E, Graf K. Endoproteolytic activation of alpha(v) integrin by proprotein convertase PC5 is required for vascular smooth muscle cell adhesion to vitronectin and integrin-dependent signaling. *Circulation* 2004;109:770-776
- 34 Faucheux N, Schweiss R, Lutzow K, Werner C, Groth T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* 2004; 25:2721-2730
- 35 Sim RB, Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 2004; 32:21-27
- 36 Toomayan GA, Chen LE, Jiang HX, Qi WN, Seaber AV, Frank MM, Urbaniak JR. C1-esterase inhibitor and a novel peptide inhibitor improve contractile function in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery* 2003;23:561-567
- 37 陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 e 抗原肝细胞结合蛋白新基因 E-36 基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2004;12:66-69

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

• 研究快报 •

HBV 核心蛋白结合蛋白 1 编码基因 C1 的克隆化

蔺淑梅, 成军, 陈天艳, 王琳, 刘敏, 张树林

蔺淑梅, 成军, 陈天艳, 王琳, 刘敏, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室
北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

个氨基酸残基(aa)组成. 经核苷酸序列数据库 (GenBank)和蛋白质一级结构序列数据库(SwissProt)同源序列的搜寻, 与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性, 表明我们克隆的C1基因属于未知功能新基因.

结论: 成功克隆了HBV核心蛋白结合蛋白新基因C1.

蔺淑梅, 成军, 陈天艳, 王琳, 刘敏, 张树林. HBV 核心蛋白结合蛋白 1 编码基因 C1 的克隆化. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1704-1707

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1704.asp>

摘要

目的: 对乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白结合蛋白1的基因C1进行克隆化研究.

方法: 对应用酵母双杂交技术筛选的白细胞中与HBV核心蛋白结合的新蛋白基因, 利用分子生物学与生物信息学技术相结合的方法获得新基因的编码序列, 根据GenBank中的序列信息设计引物, 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长编码序列, 并经测序证实, 命名该新基因为C1, 在GenBank中注册, 注册号为AY555145.

结果: C1基因编码区为366个核苷酸(nt), 编码产物由121

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是严重危害我国人民身体健康的致病因子^[1-10]. HBV基因组全长在3200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链DNA病毒. HBV基因组划分出4个开放读码框架, 分别命名为S、C、P、X区. HBV核心抗原(HBcAg)由乙型肝炎病毒C基因的C区编码, 由183个氨基酸残基(aa)组成, 分子量为21-22 kD. HBcAg是组成核壳的主要成分, 在HBV的生活周期中, 病毒核心抗原、病毒mRNA和DNA聚合酶共同构成核心颗粒, 在核心颗粒中完成病毒DNA的合成. HBcAg具有保护病毒mRNA, 防止其被RNA酶降解的作用, 对于乙肝病毒前基因组RNA的装配、基因组DNA的合成具有重要作用, 还与病毒成熟、识别包膜蛋白以及病毒向细胞

外释放等过程密切相关^[11-13]。在介导免疫应答方面, HBcAg特异性CD4⁺ T细胞免疫应答是清除HBV的重要反应^[14-15];另外, B细胞刺突尖部有HBcAg的抗原决定簇,可产生相应的体液免疫反应^[13]。我们利用酵母双杂交技术对白细胞cDNA文库中与HBcAg相互作用的蛋白进行研究,获得了一种能与HBV核心蛋白结合的新蛋白,将编码该蛋白的基因命名为C1,对其进行克隆化研究,为今后更加广泛深入地研究新基因生物学功能打下基础,并为乙型肝炎发病机制提供了新研究方向。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料和试剂 AH109酵母菌株、预转化的cDNA白细胞文库(Y187)、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基、X- α -gal购于Clontech公司。感受态大肠杆菌DH5 α 为本室保存, Taq酶、pGEM-T载体及RT-PCR试剂盒购自Promega公司。玻璃奶回收试剂盒购自博大公司。HBV核心蛋白结合蛋白1的基因C1扩增引物合成及DNA序列测定由上海生工生物工程技术有限公司承担。

1.2 未知功能基因序列的确定 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与HBV核心蛋白结合蛋白的基因。用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV核心蛋白编码基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞cDNA文库质粒pACT2的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 挑选真阳性菌落17个克隆并测序, 与GenBank数据库进行初步比较, 对其中的一个未知功能基因, 以生物信息学技术对其编码基因序列进行确定。

1.3 多聚酶链反应(PCR)扩增C1基因 根据C1的全长编码基因, 设计上下游引物。上游引物: 5' -GAA TTC ATG GAG GAG GTC ATA C-3', 下游引物: 5' -GGA TCC TTA CCA GGG ACA CAG T-3'。提取HepG2细胞的总RNA, 进行反转录, 以反转录产物为模板进行PCR, PCR参数如下: 94 5 min 预变性, 94 50 s 变性, 61 50 s 退火, 72 50 s 延伸, 共35个循环, 72 再延伸10 min。

1.4 克隆目的片段 将PCR产物在12 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与pGEM-T载体连接, 转化DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37 培养15 h。挑取阳性菌落, 增菌。提取质粒进行限制性酶切分析鉴定, 选择经鉴定的菌落送测序。

2 结果

2.1 HBV核心蛋白结合蛋白1的基因C1序列和编码产物序列 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), 发现

其中一个新基因与GenBank中注册的已知功能基因序列没有同源。电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因, 将该未知功能基因命名为乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白1基因(C1)。编码基因序列全长为366个核苷酸, 编码产物由121个氨基酸残基组成(图1)。新基因的核苷酸序列在GenBank中登录, GenBank注册号为AY555145。

```

ATG GAG GAG GTC ATA CAA GCA GGC CTG GCC
M E E V I Q A G L A
CAG TGG TCC AGA CAG AAG GGC CTG GCC TTG
Q W S R Q K G L A L
CCC TGG GAC AGA ACC AGA GGC CAT CCT GAT
P W D R T R G H P D
GTT CCC TGG AGA AAT CTC ACC TCC TCA CCC
V P W R N L T S S P
ACC AGG CCA TTG GCC CAG CCT GCC GGA AGC
T R P L A Q P A G S
TGC ATG CCA GCG GAG CCC AGC CCT GCT GCC
C M P A E P S P A A
CAC TAC CAC CAG CTC CAT GTG CAC CTC CAG
H Y H Q L H V H L Q
CTC TTG CCC TCT GAC TTG TCT GAG CGT CCC
L L P S D L S E R P
GGG CTT AGG CTG GCC CCA CTG GCC CTG GTG
G L R L A P L A L V
GAG GTG GGG ATG ACT CTC CCA GTG CCA CAG
E V G M T L P V P Q
AAA CTG GCT CCT GGG CGG CAA CTG TGT CCC
T P L P H V T Q Q Q
ACT CCC CTC CCC CAC GTA ACC CAG CAA CAG
K L A P G R Q L C P
TGG TAA
W *

```

图1 C1基因的核苷酸序列及编码产物一级结构序列。

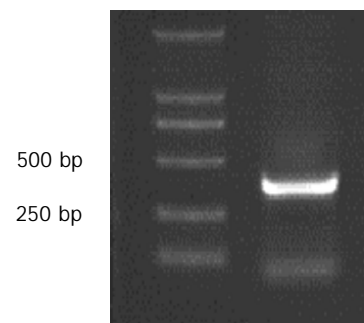


图2 C1基因的RT-PCR产物凝胶电泳图。

2.2 C1的RT-PCR结果 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, PCR反应后经1.2%琼脂糖凝胶电泳, 可见长度为366 bp的电泳条带, 见图2。PCR产物与T-载体

连接,转化大肠杆菌,提取质粒进行酶切鉴定后送测序.测序结果完全符合C1的拼接序列,表明我们已成功得到C1基因编码序列.

3 讨论

蛋白质之间的相互作用是很多生命现象的基础,基因是通过蛋白质之间的相互作用而实现其功能的,因此基因表达的蛋白质功能的研究尤显重要.酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法,他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了一种新的遗传学方法.酵母双杂交系统通过将两个推定相互作用的蛋白X和Y被分别融合到一酵母转录激活因子GAL4的结合域(BD)和激活域(AD)上,X与Y的相互作用重构了激活因子,导致下游报告基因的转录,产生容易探测到的表型.本研究中所用的Clontech公司的酵母双杂交系统-3,其在下游有3种报告基因分别为组氨酸、腺苷和半乳糖苷酶(LacZ),加上两种载体中分别带有的亮氨酸、色氨酸,使得真阳性菌落能在铺有X- α -半乳糖苷并缺乏上述4种氨基酸营养的培养板上生长并呈现出蓝色.因为增加了报告基因的种类,采用了多重选择性培养基的筛选,使假阳性的概率大大降低,筛选结果的真阳性率可达95%^[7,16-18].

HBV感染后本身并不直接致细胞病变,而是由于宿主的免疫应答引起病变.HBV可侵犯外周血单个核细胞(PBMC)并在其内复制,从而影响PBMC的功能^[19-23],多年来的研究认为,HBV感染慢性化主要与机体免疫功能紊乱有关.HBcAg有高免疫原性,几乎所有HBV感染者均产生抗-HBc,HBcAg通过B细胞表面受体轻重链的FR1-CDR1连接区域结合而激活B细胞产生抗体^[13],同时还是细胞毒T淋巴细胞(CTL)免疫应答的靶抗原,针对HBcAg的细胞免疫应答在病毒清除中起重要作用^[24].HBV核心蛋白与白细胞中的蛋白之间的相互作用在HBV感染及慢性肝炎的发病过程中起着重要的作用.

我们利用酵母双杂交技术,已成功筛选到一系列与乙肝病毒蛋白及丙肝病毒蛋白相结合的蛋白基因,其中,也包括了一些未知功能蛋白的基因^[24-28].我们在真核表达载体pGBKT7中构建pGBKT7-HBV core 诱饵质粒并在酵母菌株AH109中表达了HBV核心蛋白基因,与转化了人白细胞cDNA文库的酵母菌株Y187进行配合,筛选出与之相互作用的蛋白基因17种,其中包括HBV核心蛋白结合蛋白C1这一未知功能的新基因,在GenBank中未发现同源序列.确定一个新基因的编码序列,研究该基因的表达与调控,编码蛋白的结构与功能,确定新基因的生物学和医学意义,是医学分子生物学研究领域一项具有挑战性的工作^[4].根据GenBank的信息,电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因,将该未知功能基因命名为C1.我

们设计了新基因C1的上下游引物,并成功地从HepG2细胞的mRNA中逆转录出该基因的完整序列,说明该基因也能在HepG2细胞中表达.PCR反应产物经T-A克隆测序完全符合计算机分析结果,这表明我们已顺利得到了C1编码序列.C1的开放读码框架(ORF)长度为366bp,编码121个氨基酸残基.新基因的发现及克隆化研究为今后更加广泛深入地研究新基因生物学功能及乙型肝炎的发病机制奠定了基础.

4 参考文献

- 1 成军.慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究.世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 成军,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
- 3 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳.乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响.世界华人消化杂志 2003;11:472-474
- 4 成军.新基因结构与功能研究的策略.世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 5 张忠东,成军,张树林.噬菌体展示技术的原理及应用.世界华人消化杂志 2003;11:459-461
- 6 董菁,成军,黄甫竞坤,洪源,王刚,陈国凤,李莉,张玲霞,陈菊梅.乙型肝炎病毒准种个体化的研究.解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 7 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 8 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 9 Walton CM, Wu CH, Wu GY. A ribonuclease H-oligo DNA conjugate that specifically cleaves hepatitis B viral messenger RNA. *Bioconjug Chem* 2001;12:770-775
- 10 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus Assembly and Replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 11 Le Pogam S, Shih C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- 12 Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137
- 13 Lazdina U, Cao T, Steinbergs J, Alheim M, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Leroux-Roels G, Sallberg M. Molecular basis for the interaction of the hepatitis B virus core antigen with the surface immunoglobulin receptor on naive B cells. *J Virol* 2001;75:6367-6374
- 14 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
- 15 Cao T, Meuleman P, Desombere I, Sallberg M, Leroux-Roels G. In vivo inhibition of anti-hepatitis B virus core antigen (HBcAg) immunoglobulin G production by HBcAg-specific CD4(+) Th1-type T-cell clones in a hu-PBL-NOD/SCID mouse model. *J Virol* 2001;75:11449-11456
- 16 Nagpal S, Ghosn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 17 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 18 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 19 Rico MA, Quiroga JA, Subira D, Castanon S, Esteban JM,

- Pardo M, Carreno V. Hepatitis B virus-specific T-cell proliferation and cytokine secretion in chronic hepatitis B e antibody-positive patients treated with ribavirin and interferon alpha. *Hepatology* 2001;33:295-300
- 20 邢同京, 章廉, 卢桥生, 侯金林, 冯筱榕, 骆抗先. 慢性乙型肝炎用干扰素治疗的Th1/Th2应答. *中华医学杂志* 2000;80:268-270
- 21 张萍, 吴文漪, 魏来. 乙型肝炎患者外周血T辅助细胞1、2型细胞因子含量的测定及临床意义. *徐州医学院学报* 2001;21:304-306
- 22 胡章勇, 章廉, 文维群, 张明霞, 王燕军, 钱毅, 骆抗先. 干扰素治疗对慢性乙型肝炎患者CTL活性的影响. *中华免疫学杂志* 2002;18:59-61
- 23 戴炜, 余卫业, 姜荣龙. 慢性重型肝炎外周血单个粒细胞内干扰素和白细胞介素的表达及意义. *中华肝脏病杂志* 2001;9(增刊):64-65
- 24 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因C-12的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1122-1125
- 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 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:15-18
- 27 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. *世界华人消化杂志* 2003;11:422-425
- 28 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5B结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. *解放军医学杂志* 2003;28:768-770

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

• 研究快报 •

应用基因表达谱芯片技术筛选NS3TP1转染细胞差异表达基因

纪冬, 成军, 刘妍, 王建军, 郭江

纪冬, 成军, 刘妍, 王建军, 郭江, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, 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: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

胞后差异表达基因, 为进一步阐明NS3TP1蛋白可能的生物学功能及HCV的致病机制提供理论依据。

纪冬, 成军, 刘妍, 王建军, 郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选NS3TP1转染细胞差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1707-1711

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1707.asp>

摘要

目的: 应用基因芯片技术检测丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白3(NS3)反式激活基因1(NS3TP1)的表达对肝母细胞瘤细胞HepG2基因表达谱的影响, 进一步NS3TP1蛋白可能的分子生物学功能。

方法: 设计并合成NS3TP1基因序列特异性的引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增NS3TP1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(-)-NS3TP1. 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, 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1152个基因表达谱的筛选中, 发现有26个基因表达水平显著上调, 14个基因表达水平显著下调。

结论: 应用基因表达谱芯片技术成功筛选了NS3TP1转染细

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒, 在大多数感染人群中表现为持续感染, 常导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌^[1-10]. 虽然HCV致病机制尚不完全清楚, 但病毒基因组编码的蛋白与肝细胞蛋白之间的相互作用肯定起着关键的作用. HCV基因组具有一个长约9400 bp的单一开放读码框(ORF), 编码一个多肽前体, 在病毒及肝细胞酶的作用下进行剪切, 产生至少10种具有不同功能的蛋白. 其中HCV非结构蛋白3(NS3)具有丝氨酸蛋白酶、三磷酸核苷酶(NTPase)和解旋酶(helicase)的功能, 在HCV多聚蛋白的成熟和病毒复制过程中发挥重要作用, 并且对于宿主多种基因具有反式激活作用, 影响细胞的功能, 诸如细胞增生、凋亡, 甚至是HCV的致癌作用^[11-15]. 我们对NS3反式激活基因进行筛选和克隆化研究^[16-19], 发现了NS3蛋白上调一些基因的表达, 并且包括一些未知功能基因, 其中之一命名为NS3TP1, 利用生物信息学技术确定其ORF, 并对其进行了克隆化研究, 顺利得到了NS3TP1基因编码序列, 该新基因的ORF长度为1932个核苷酸(nt), 编码产物由642个氨基酸残基(aa)组成(GenBank号: AY116969)^[20].

为了探索 NS3TP1 的生物学功能, 深入了解 HCV NS3 蛋白的反式激活作用, 我们构建了 NS3TP1 基因的真核表达载体, 应用基因表达谱芯片技术^[21], 筛选 NS3TP1 基因转染细胞后差异表达的基因, 检测 NS3TP1 蛋白的表达对肝细胞基因表达谱的影响, 推测其在体内可能存在功能的线索, 为研究 HCV 的致病机制及探索新基因的功能提供了新的方向.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 α 由本室保存; pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; FuGENE6 转染试剂购自 Roche 公司; mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 \times PCR Enzyme Mix, Advantage PCR Cloning 试剂盒均购自 Clontech 公司; T7, SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega. 人类基因组分类 I 芯片包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、细胞信号转导相关基因等 1 152 个 cDNA, 由上海联合基因有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 设计合成 NS3TP1 基因序列特异性引物(上游: 5' - GAT ATC AAT GTG TGG CAT TTG TTG -3' 下游: 5' - GGA TCC TGT TAC ATT GTG AAT CAC -3', 在引物的两端分别引入了 EcoRV 和 BamHI 酶切位点(划线部分), 引物由上海博亚公司合成. 使用 25 μ L 反应体系, 以 HepG2 细胞 cDNA 为模板, 放入 PE 9600 PCR 仪中扩增. 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min. 9 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果. 扩增的 NS3TP1 蛋白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(-)-NS3TP1. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS3TP1 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 芯片制备 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 NS3TP1 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. 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 SSC+2 g/L SDS 杂交液中. 包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 g/L 溶解于 3 \times SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、

室温干燥(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用 2 g/L SDS, 水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用. 将基因芯片和杂交探针在 95 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 $^{\circ}$ C 杂交 15-17 h. 依次以 2 \times SSC+2 g/L SDS, 0.1 \times SSC+2 g/L SDS, 0.1 \times SSC 洗涤 10 min, 室温晾干. 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 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 NS3TP1 蛋白的表达载体构建 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS3TP1 经过限制性内切酶分析和核苷酸序列的测定, 证实含有完整的开放读码框, 序列准确无误.

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 实验组和对照组总 RNA 的吸光度 A260/A280 分别为 2.045 和 1.995, 热稳定实验 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20 $^{\circ}$ C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA, 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 在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 40 条, 其中 26 条基因表达增强(表 1), 14 条基因表达降低(表 2).

表 1 NS3TP1 蛋白上调基因类型

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	2.009	KIAA0009 gene product
2	2.012	肿瘤差异表达 1(TDE1)
3	2.057	泛素特异性蛋白酶 1(USP1)
4	2.064	甘氨酸胺基转移酶(GATT)
5	2.080	cAMP 应答元件结合蛋白 CRE-BPa
6	2.093	cullin 2 (CUL2)
7	2.104	早老因子 2(阿尔茨海默病 4) (PSEN2)
8	2.121	胱冬肽酶 6(caspase 6)
9	2.131	组织蛋白酶 K(CTSK)
10	2.149	维生素 A 反应性细胞骨架相关蛋白(JWA)
11	2.195	FYN 结合蛋白(FYB)
12	2.210	TRAIL 受体 2
13	2.215	可溶性鸟苷酸环化酶 3(GUCY1B3)

14	2.262	乳酸脱氢酶 B
15	2.263	M 期磷蛋白(MPHOSPH1)
16	2.268	转化生长因子(TGF) β 受体 1(TGF- β RI)
17	2.360	SMAP-3 蛋白
18	2.371	固醇 - C5- 脱氢酶
19	2.402	谷氨酸盐受体
20	2.411	[角]鲨烯环氧酶(SQLE)
21	2.428	FKBP 相关蛋白(FAP48)
22	2.528	转录因子 7(T- 细胞特异性, HMG 盒) (TCF7)
23	2.537	B- 细胞慢性淋巴细胞性白血病 10(BCL10)
24	2.263	CD24 抗原(小细胞肺癌簇 4 抗原)
25	2.923	胆囊收缩素型 -A 受体
26	3.129	cAMP 依赖的蛋白激酶(PRKAR2B)

表 2 NS3TP1 蛋白下调基因类型

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	0.367	金属蛋白酶的抑制因子 1
2	0.426	金属硫蛋白 1G(MT1G)
3	0.431	免疫球蛋白(CD79A)结合蛋白 1 (IGBP1)
4	0.444	调钙蛋白的结合蛋白质 1(CALD1)
5	0.453	RNA 结合蛋白 S1, 丝氨酸富含结构域(RNPS1)
6	0.455	RAC1 配体(POR1)
7	0.459	RAS 同源基因家族成员 C (ARHC)
8	0.464	DEAD/H(Asp-Glu-Ala-Asp/His)盒蛋白(DDX21)
9	0.465	KIAA0943 蛋白
10	0.471	SUMO-1 激活酶亚单位 1(SAE1)
11	0.486	突触素样蛋白(SYPL)
12	0.490	谷胱甘肽 S- 转移酶 M3(GSTM3)
13	0.498	精氨酸琥珀酸盐合成酶(ASS)
14	0.499	G 蛋白途径抑制子 1(GPS1)

3 讨论

HCV NS3 不仅和病毒复制和成熟相关,而且他可以反式激活宿主细胞内多种基因表达,从对肝细胞的生长、代谢、甚至是恶性转化产生重要影响,尽管在 HCV 蛋白尤其是 NS3 的结构、功能上积累了很多数据,可是关于他们在细胞内的靶位及影响却知之甚少,还处在一个逐渐摸索的阶段.前一阶段,我们运用抑制性消减杂交技术构建出 HCV NS3 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库,并发现了一些新基因^[22-23],其中一个命名为 NS3TP1,对其进行克隆化研究,为深入研究 NS3 蛋白的生物学功能迈出了可喜的一步.对于一个新蛋白来说,由于以往对其没有认识,需要对他的表达调控、翻译后修饰、生物功能以及相互作用等方面进行研究,这是一项有挑战性的工作,这种思路有望对 HCV 感染的诊断、预后及疗效判断等提出新的参考.为进一步研究 NS3TP1 这一新基因的功能,明确 HCV NS3 在丙型肝炎发病机制中的作用,我们构建 NS3TP1 基因真核表达

载体 pcDNA3.1(-)-NS3TP1,利用基因芯片技术筛选 NS3TP1 转染细胞差异表达基因,推测其在体内可能存在功能的线索.结果表明,26 种基因的表达水平显著上调,14 种基因的表达水平显著下调.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,使得对 NS3TP1 蛋白在机内的作用有了更进一步的了解,对 NS3 蛋白功能和复杂性、多样性也有了更加深刻的体会.

分析上调基因, cAMP 应答元件结合蛋白 CRE-BPa 是 CRE-BP1 家族的新成员,含有推定的金属指状结构和由碱性氨基酸簇和亮氨酸拉链组成的 DNA 结合功能域, CRE-BPa 能特异性的与 CRE 结合形成同源二聚体,与转录因子 c-JUN 或 CRE-BP1 结合成异源二聚体,是 CRE 依赖的转录反式激活因子^[24]. 转化生长因子 β 受体 1(TGF- β RI) 是丝氨酸/苏氨酸激酶膜受体家族的成员, TGF- β RI 激酶过表达,能促进多种信号传导途径的激活,对于肿瘤细胞的迁移,以及重要的致瘤事件如 Smad2/Smad3 的磷酸化是必需的^[25-26]. B 淋巴细胞表面的分化抗原 CD24 是 B 细胞表面的信号转导分子,能够调节多种信号活化的应答,能诱导 B 淋巴细胞凋亡,下游信号分子是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 以及细胞外信号调节激酶 1 (ERK1) 的活化^[27-29]. 研究还发现, CD24 抗原是肝细胞癌细胞中高度表达的基因,与 p53 基因突变及肿瘤分化高度相关, CD24 抗原是潜在的肝细胞肿瘤早期标志基因^[30]. B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 10 (BCL10) 是作为低度 B 细胞淋巴瘤相关基因得到鉴定的,是一种含有胱冬肽酶募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD) 的蛋白,同时属于黏膜相关淋巴组织 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) B 淋巴瘤中鉴定的断裂位点的基因,在淋巴细胞中抗原受体介导的 NF- κ B 激活过程中是必需的. BCL10 是一种介导细胞凋亡信号转导的因子,主要的分子机制就是通过不同的磷酸化修饰,与 cIAP 结合替代与 TRAF2 结合^[31-35]. FKBP 相关蛋白 (FAP48) 是细胞内与免疫调节有密切关系的蛋白,可以与肽基脯氨酰异构酶 FK506 结合蛋白 59 (FK506-binding protein 59, FKBP59) 和 FKBP12 蛋白结合,由于其 Mr 48 000,故命名为 FKBP 相关蛋白 (FAP48),此 3 种蛋白均具有大环内酯类分子的结合位点,可能是这些免疫抑制剂药物受体的天然的共同配体分子. FAP48 与 FKBP 分子之间的结合可被大环内酯类物质 FK506 所阻断,说明免疫亲和素分子中的结合位点与 FK506 的结合位点相重叠. FAP48 的过表达可以抑制细胞的增生,在免疫调节及临床疾病的发生、发展过程中具有十分重要的作用^[36-40]. 我室应用基因芯片研究 HBV 截短型表面抗原中蛋白 (MHBS¹)、HBxAg、HCV NS3 等反式激活蛋白的调节基因时,均发现 FAP48 可以明显上调,与本实验一起,提示了肝炎病毒蛋白与细胞内 FAP48 蛋白的表达水平密切相关,可能是 HBV、HCV 感染慢性的的重要机制之一^[41-43].

在下调基因中,钙调素结合蛋白1(CALD1)、金属硫蛋白1G(MT1G)、金属蛋白酶的抑制因子1等与体内金属代谢有关。DEAD/H盒蛋白DDX21是推定的重要的RNA解旋酶,参与众多细胞的RNA二级结构加工过程,如翻译起始、核糖体RNA合成及加工过程,DDX21在肿瘤组织中低表达,而在正常组织中有显著的高水平表达,NS3TP1对DDX21的表达有下调作用,提示NS3TP1蛋白在一定程度上可能下调细胞核糖体RNA加工与合成^[44]。

随着后基因组时代的到来,越来越多的未知功能蛋白质被发现,对新蛋白的生物学功能、与其他蛋白质间的相互作用以及他们在疾病发生、发展、转化过程中的变化规律的研究成为今天生命科学最重要的热点之一,同时由于新技术的不断创新,使一系列的研究成为可能^[45]。利用基因表达谱芯片能进行大规模筛选的优点,我们从1152中基因中筛选出NS3TP1基因转染细胞差异表达的基因,基于上述结果的提示,使我们可以设计相应的实验去进行更深入的研究,为更加全面地了解新基因NS3TP1的功能作铺垫,也为更多新基因功能研究工作积累了经验。

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 Tomei L, Altamura S, Bartholomew L, Bisbocci M, Bailey C, Bosserman M, Cellucci A, Forte E, Incitti I, Orsatti L, Koch U, De Francesco R, Olsen DB, Carroll SS, Migliaccio G. Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. *J Virol* 2004;78:938-946
- 3 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 4 Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37:50-54
- 5 Thelu MA, Drouet E, Hilleret MN, Zarski JP. Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol* 2004;72:396-405
- 6 巨立中, 成军, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒复制模型系统. 世界华人消化杂志 2003;11:1954-1956
- 7 Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM, Barnes E, Willberg CB, Semmo N, Walker BD, Phillips R, Klenerman P. Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *J Immunol* 2004;172:1744-1753
- 8 Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9:1657-1661
- 9 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;11:1014-1017
- 10 Bahr MJ, el Menuawy M, Boeker KH, Musholt PB, Manns MP, Lichtinghagen R. Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 2003;23:420-425
- 11 He QQ, Cheng RX, Sun Y, Feng DY, Chen ZC, Zheng H. Hepatocyte transformation and tumor development induced by hepatitis C virus NS3 c-terminal deleted protein. *World J Gastroenterol* 2003;9:474-478
- 12 Wang W, Lahser FC, Yi M, Wright-Minogue J, Xia E, Weber PC, Lemon SM, Malcolm BA. Conserved C-terminal threonine of hepatitis C virus NS3 regulates autoproteolysis and prevents product inhibition. *J Virol* 2004;78:700-709
- 13 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
- 14 Wu MX. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis* 2003;8:11-18
- 15 Lehoux S, Tedgui A. All strain, no gain: stretch keeps proliferation at bay via the NF-kappaB response gene iex-1. *Circ Res* 2003;93:1139-1141
- 16 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 17 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:456-458
- 18 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活SV40病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2003;28:44-46
- 19 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 杨倩, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3与乙型肝炎病毒X蛋白协同反式激活作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:47-49
- 20 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 王春花, 党晓燕. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活基因1的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:237-240
- 21 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 22 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004;12:1-5
- 23 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 24 Nomura N, Zu YL, Maekawa T, Tabata S, Akiyama T, Ishii S. Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J Biol Chem* 1993;268:4259-4266
- 25 Itoh S, Thorikay M, Kowanzet M, Moustakas A, Itoh F, Heldin CH, ten Dijke P. Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem* 2003;278:3751-3761
- 26 Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Zhou B. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells. *J Biol Chem* 2002;277:39703-39712
- 27 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型和丙型肝炎病毒对MEKK1蛋白信号转导途径的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:162-165
- 28 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对MAPKKK蛋白信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1959-1962
- 29 纪冬, 成军. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对MKP蛋白信号转导影响的研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:200-202
- 30 Huang LR, Hsu HC. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res* 1995;55:4717-4721
- 31 成军, 刘妍, 杨倩. 丙型肝炎病毒蛋白对Bcl-10蛋白信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1948-1951
- 32 Thome M, Tschopp J. Bcl10. *Curr Biol* 2002;12:R45
- 33 Ruland J, Duncan GS, Elia A, del Barco Barrantes I, Nguyen L, Plyte S, Millar DG, Bouchard D, Wakeham A, Ohashi PS, Mak TW. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 2001;104:33-42
- 34 Muto A, Ruland J, McAllister-Lucas LM, Lucas PC, Yamaoka S, Chen FF, Lin A, Mak TW, Nunez G, Inohara N. Protein kinase C-associated kinase (PKK) mediates Bcl10-independent NF-kappa B activation induced by phorbol ester. *J Biol Chem* 2002;277:31871-31876
- 35 Yui D, Yoneda T, Oono K, Katayama T, Imaizumi K, Tohyama M. Interchangeable binding of Bcl10 to TRAF2 and cIAPs regulates apoptosis signaling. *Oncogene* 2001;20:4317-4323
- 36 成军, 刘妍, 杨倩, 王建军, 洪源, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对FAP48信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1962-1965
- 37 Sinars CR, Cheung-Flynn J, Rimerman RA, Scammell JG, Smith DF, Clardy J. Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:868-873

- 38 Vermeer H, Hendriks-Stegeman BI, van der Burg B, van Buul-Offers SC, Jansen M. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:277-284
- 39 Krummrei U, Baulieu EE, Chambraud B. The FKBP-associated protein FAP48 is an antiproliferative molecule and a player in T cell activation that increases IL2 synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2444-2449
- 40 Neye H. Mutation of FKBP associated protein 48 (FAP48) at proline 219 disrupts the interaction with FKBP12 and FKBP52. *Regul Pept* 2001;97:147-152
- 41 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-933
- 42 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11:920-924
- 43 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:943-946
- 44 Valdez BC, Yang H, Hong E, Sequitin AM. Genomic structure of newly identified paralogue of RNA helicase II/Gu: detection of pseudogenes and multiple alternatively spliced mRNAs. *Gene* 2002;284:53-61
- 45 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较. 世界华人消化杂志 2004;12:327-331

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

• 研究快报 •

基因表达谱芯片筛选双环醇作用HepG2细胞后的差异表达基因

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C030114020, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片技术了解双环醇在肝细胞中可能上调或下调的基因, 了解其可能的调节功能线索。

方法: 以双环醇处理 HepG2 细胞, 同时以二甲基硫氧化物(DMSO)处理的相同细胞系作为对照; 24 h后制备细胞裂解液, 提取 mRNA. 应用基因表达谱芯片技术对差异表达 mRNA 进行检测和分析。

结果: 经基因表达谱芯片分析, 12 种基因的表达水平上调, 9 种基因的表达水平下调。

结论: 筛选到的一些与细胞周期、蛋白质的翻译合成、能量代谢、体内免疫调节、细胞凋亡及细胞内的信号传导方面的起重要作用及肿瘤发生相关的基因, 推测了双环醇可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 基因表达谱芯片筛选双环醇作用 HepG2 细胞后的差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1711-1714
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1711.asp>

0 引言

百赛诺(双环醇片)是由中国医学科学院药物研究所研发,北京协和药厂生产,经国家药品监督管理局批准上市的国家一类抗肝炎化学合成新药,是我国第一个有自主知识产权的国家一类新药.双环醇对各种原因引起的肝损伤有明显的保护作用,近年来广泛应用于病毒性肝炎的治疗中.我们应用基因表达谱芯片技术,筛选双环醇作用人肝癌细胞系HepG2细胞后差异表达基因,并应用生物信息学(bioinformatics)技术对差异表达的基因进行分析.双环醇作用HepG2细胞后差异表达基因的研究,为深入了解双环醇在肝细胞内的调节作用机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系 HepG2 细胞由本室保存,细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Gibco 公司.双环醇为二甲基硫氧化物(DMSO)水溶液.在35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞,细胞生长至对数期时分别将双环醇及DMSO加入细胞培养液中,使双环醇终浓度达到 1×10^{-5} mol/L,24 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 方法

1.2.1 总 RNA 提化及 mRNA 纯化 使用 Trizol 试剂一步法提取双环醇及 DMSO 处理的 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 28 s、18 s 条带变化.以

Qiagen 公司 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化得 mRNA. 操作按说明书进行, 并行电泳检测.

1.2.2 探针标记 参照 Schena et al^[1] 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.

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

1.2.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95 °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、1 g/L × SSC +2 g/L SDS、1 g/L × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因 (24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点) 对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 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.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照 (8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素 (呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素 (呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选出差异常表达基因共 94 条, 占 8.15%, 其中 38 条基因表达增强, 56 条基因表达降低.

2.3 双环醇下调基因类型在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为双环醇的下调基因. 我们发现 9 种基因的表达水平下调 (表 1).

表 1 双环醇下调基因类型

编号	Cy5/Cy3	基因名称
1	0.461	成纤维细胞生长因子受体 1 (FGFR1)
2	0.463	核膜层蛋白 B 受体 (LBR)
3	0.469	DEAD/H 框蛋白
4	0.470	鸟苷酸环化酶 1 (GUCY1)
5	0.479	丝分裂素激活蛋白激酶激酶的激酶 2 (MAP3K2)
6	0.483	磷蛋白
7	0.485	脂酰辅酶 A 氧化酶
8	0.489	内皮素 1 (EDN1)
9	0.498	RNA 结合性基序蛋白 (RBM)

2.4 双环醇上调基因 双环醇上调基因类型在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.00 以上, 就判断为双环醇的上调基因. 我们发现 12 种基因的表达水平上调 (表 2).

表 2 双环醇上调基因类型

编号	Cy5/Cy3 比值	基因名称
1	2.005	B- 细胞 CLL/ 淋巴瘤 10 (BCL10)
2	2.021	FYN- 结合蛋白 (FYB)
3	2.025	乳酸脱氢酶 B,
4	2.039	FKBP- 相关蛋白 (FAP48),
5	2.084	细胞分裂周期蛋白 23 (CDC23)
6	2.591	甘氨酸胺基转移酶 (GATM)
7	2.092	白血病抑制因子受体 (LIFR)
8	2.106	二乙基对硝基苯磷酸酯酶 2
9	2.210	DnaJ 样热激蛋白 40 (HLJ1)
10	2.360	肿瘤坏死因子受体 (TNFR)
11	2.456	Cofilin 蛋白
12	2.484	CAMP 依赖性蛋白激酶

3 讨论

百赛诺 (双环醇片) 对于肝细胞损伤具有保护作用^[1-3]. 对慢性丙型肝炎有很好的改善临床症状和降低转氨酶的作用, 长期服用, 无明显不良反应, 耐受性好^[4]. 此外, 双环醇还对肾缺血-再灌注损伤有保护作用^[5]. 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. 我们分别应用双环醇及其溶剂 DMSO 处理 HepG2 细胞, 使双环醇终浓度达到 1×10^{-5} mol/L, 24 h 后收获细胞, 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, 12 种基因的表达水平上调, 9 种基因的表达水平下调, 在下调的基因中, 包括一些蛋白质体内合成、肿瘤发生、脂类代谢及信号传导相关的基因. 核膜层蛋白 B 受体 (LBR)、RNA 结合性基序蛋白 (RBM)、DEAD/H 框蛋白参与细胞核的转录、复制、翻译等生物学功能. 内皮素 1 (EDN1) 为强有力的血管收缩剂, 还具有多种生物学效应, 包

括血液动力学、心肌、肾脏、内分泌、平滑肌收缩和促细胞分裂效应等。也调节基因表达和培养的血管和非血管细胞的生长。可能参与体内微管结构的生长和补偿性改造。其对细胞核信号的传递可能在细胞分化和发育中起关键作用^[6-10]。成纤维细胞生长因子受体1(FGFR1)由一些T细胞产生,并对这些T细胞起到刺激作用。这些受体使T细胞响应在损伤和炎症刺激后成纤维细胞生长因子的表达。并且与T细胞受体有相互作用^[11]。与前列腺癌的进展相关^[12],还有人认为其水平的增高为癌前病变的指标^[13]。介导富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白对内皮细胞增生和骨骼成肌细胞分化的抑制作用^[14]。与碱性成纤维细胞生长因子有高亲和性,通过阻断FGFR1相关的血管发生,可能对抑制肿瘤的生长具有一定的作用^[15]。鸟苷酸环化酶1(GUCY1)为催化cGMP合成的酶,直接或间接对各式各样的刺激进行应答,包括激素和神经递质^[16-19]。丝分裂素激活蛋白激酶激酶2(MAP3K2)是MAP激酶家族成员,参与细胞内信号转导途径。脂酰辅酶A氧化酶参与脂肪酸的 β 氧化,与脂类代谢相关。

在上调的基因中,包括一些与细胞周期、凋亡、能量代谢及免疫相关的基因。细胞分裂周期蛋白23(CDC23):与细胞的染色质相关,将细胞增生和DNA的复制之间联系起来,通过刺激微染色体复合物的磷酸化作用参与细胞分裂周期前复合物的活化作用,在DNA复制的起始阶段起重要作用^[20-22]。Cofilin蛋白是人T细胞中的一种胞质磷蛋白,是一种小分子的肌动蛋白结合蛋白,受辅助刺激信号的调节,去磷酸化后易位至细胞核。DnaJ样热激蛋白40(HLJ1)为一种伴侣蛋白,多在心脏、骨骼肌和胰腺中表达^[23]。甘氨酸脒基转移酶(GATM)、乳酸脱氢酶B在肌酸和糖类代谢中起重要作用。白血病抑制因子受体(LIFR)为体内免疫抑制因子的受体。BCL10:为细胞内的一种蛋白成分,与细胞凋亡相关,对核因子 κ B(NF- κ B)的激活有重要作用,在许多淋巴瘤和实体肿瘤中均发现其基因的突变或缺失,因此推测其缺失或突变可能为这些肿瘤发生的基因基础^[24-26]。FAP48是细胞内与免疫调节有密切关系的蛋白类型^[27]。这种蛋白与肽基脯氨酰异构酶、FK506结合蛋白59(FKBP59)和FKBP12蛋白之间能够结合,具有大环内酯类分子的结合位点,可能是这些免疫抑制剂药物受体的天然的共同配体分子^[28-29]。FYN-结合蛋白(FYB):可上调整合素蛋白介导的细胞黏附功能和肥大细胞内炎性递质的释放,参与炎症和变态反应的过程^[30]。二乙基对硝基苯磷酸酯酶2:为一种酯酶,与HDL相关,可降低LDL脂质过氧化的敏感性^[31]。在氧化应激作用下可表达增加,起到抗氧化酶的作用减轻氧化损伤并减弱巨噬细胞泡沫结构的形成^[32-33]。CAMP依赖性蛋白激酶(CPKA)参与调节体内多种蛋白的功能,具有抑制凋亡^[34]、提高细胞的活动力^[35]、提高自然杀伤(NK)细胞的细胞毒作用^[36]、调节丘脑后部加压素的表达^[37]、抑制细胞外信号调节激酶(Erk)和p38丝分裂素蛋白激酶(MAPK)的

活性等作用。

通过对上述双环醇激活相关基因的分析,我们发现应用双环醇刺激细胞后,一些与细胞周期、蛋白质的生物合成、能量代谢、体内免疫调节、细胞凋亡及细胞内的信号传导方面的起重要作用及肿瘤发生相关的基因表达增高或降低,提示双环醇在维持细胞稳定、促进损伤细胞修复及提高机体免疫力,抗肿瘤方面可能有一定作用。关于双环醇具体的体内作用机制仍需要进一步的实验来证实。

4 参考文献

- 1 李焯,戴国炜,李燕,刘耕陶.双环醇对扑热息痛引起小鼠肝脏能量代谢和线粒体功能障碍的影响.药理学报 2001;36:723-726
- 2 赵冬梅,刘耕陶.双环醇对刀豆蛋白A所致小鼠肝细胞核DNA损伤的保护作用.中华医学杂志 2001;81:844-848
- 3 Lu H, Li Y. Effects of bicyclol on aflatoxin B1 metabolism and hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:942-945
- 4 姚光弼,计焱焱,周霞秋,王勤环,吴婉芬.双环醇治疗慢性丙型肝炎的临床研究.中华医学杂志 2002;82:958-960
- 5 赵冬梅,孙韬,李燕.双环醇对大鼠肾脏缺血-再灌注损伤的保护作用.药理学报 2002;37:412-414
- 6 Hughes PM, Anthony DC, Ruddin M, Botham MS, Rankine EL, Sablone M, Baumann D, Mir AK, Perry VH. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:1276-1286
- 7 Erdem M, Erdem A, Erdem O, Yildirim G, Memis L, Himmetoglu O. Immunohistochemical localization of endothelin-1 in human placenta from normal and growth-restricted pregnancies. *Pediatr Dev Pathol* 2003;6:307-313
- 8 Chauhan BC, LeVatte TL, Jollimore CA, Yu PK, Reitsamer HA, Kelly ME, Yu DY, Tremblay F, Archibald ML. Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:144-152
- 9 Andrzejewska A, Dlugosz JW. The endothelin-1 receptor antagonists ameliorate histology and ultrastructural alterations in the pancreas and decrease trypsinogen activation in severe taurocholate pancreatitis in rats. *Int J Exp Pathol* 2003;84:221-229
- 10 Fratz S, Geiger R, Kresse H, Roemer G, Hennig M, Sebening W, Hess J. Pulmonary blood pressure, not flow, is associated with net endothelin-1 production in the lungs of patients with congenital heart disease and normal pulmonary vascular resistance. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1724-1729
- 11 Byrd VM, Kilkenny DM, Dikov MM, Reich MB, Rocheleau JV, Armistead WJ, Thomas JW, Miller GG. Fibroblast growth factor receptor-1 interacts with the T-cell receptor signalling pathway. *Immunol Cell Biol* 2003;81:440-450
- 12 Freeman KW, Gangula RD, Welm BE, Ozen M, Foster BA, Rosen JM, Ittmann M, Greenberg NM, Spencer DM. Conditional activation of fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1, but not FGFR2, in prostate cancer cells leads to increased osteopontin induction, extracellular signal-regulated kinase activation, and in vivo proliferation. *Cancer Res* 2003;63:6237-6243
- 13 Brandline S, Beyer I, Eck M, Bernhardt W, Hensel F, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP. Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer Res* 2003;63:2052-2061
- 14 Motamed K, Blake DJ, Angello JC, Allen BL, Rapraeger AC, Hauschka SD, Sage EH. Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: a role for protein kinase A. *J Cell Biochem* 2003;90:408-423
- 15 He QM, Wei YQ, Tian L, Zhao X, Su JM, Yang L, Lu Y, Kan B, Lou YY, Huang MJ, Xiao F, Liu JY, Hu B, Luo F, Jiang Y, Wen YJ, Deng HX, Li J, Niu T, Yang JL. Inhibition of tumor growth with a vaccine based on xenogeneic homologous fibroblast growth factor receptor-1 in mice. *J Biol Chem* 2003;278:21831-21836

- 16 Nakane M, Hsieh G, Miller LN, Chang R, Terranova MA, Moreland RB, Kolasa T, Brioni JD. Activation of soluble guanylate cyclase causes relaxation of corpus cavernosum tissue: synergism of nitric oxide and YC-1. *Int J Impot Res* 2002;14:121-127
- 17 Pyatakova NV, Khropov YV, Churakov AM, Tarasova NI, Serezhenkov VA, Vanin AF, Tartakovskiy VA, Severina IS. Derivatives of benzotetrazine-1, 3-dioxide are new NO-donors, activators of soluble guanylate cyclase, and inhibitors of platelet aggregation. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:329-334
- 18 Mizusawa H, Hedlund P, Brioni JD, Sullivan JP, Andersson KE. Nitric oxide independent activation of guanylate cyclase by YC-1 causes erectile responses in the rat. *J Urol* 2002;167:2276-2281
- 19 Semple-Rowland SL, Tepedino M, Coleman JE. Pinopsin mRNA levels are significantly elevated in the pineal glands of chickens carrying a null mutation in guanylate cyclase-1. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;97:51-58
- 20 Gregan J, Lindner K, Brimage L, Franklin R, Namdar M, Hart EA, Aves SJ, Kearsley SE. Fission yeast Cdc23/Mcm10 functions after pre-replicative complex formation to promote Cdc45 chromatin binding. *Mol Biol Cell* 2003;14:3876-3887
- 21 Lee JK, Seo YS, Hurwitz J. The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2334-2339
- 22 Hart EA, Bryant JA, Moore K, Aves SJ. Fission yeast Cdc23 interactions with DNA replication initiation proteins. *Curr Genet* 2002;41:342-348
- 23 Mohri K, Ono S. Actin filament disassembling activity of *Caenorhabditis elegans* actin-interacting protein 1 (UNC-78) is dependent on filament binding by a specific ADF/cofilin isoform. *J Cell Sci* 2003;116:4107-4118
- 24 Miao J, Kusafuka T, Udatsu Y, Okada A. Mutation analysis of the BCL10 gene in childhood solid malignancies. *Med Pediatr Oncol* 2002;39:543-546
- 25 Kawano T, Iwase S, Nakayama R, Horiguchi-Yamada J, Kobayashi M, Yamada H. Lack of BCL10 mRNA mutation in lymphoid malignancies. *Anticancer Res* 2002;22:305-309
- 26 Park YK, Park HR, Kim YW, Chi SG, Unni KK. Lack of Bcl10 mutations in malignant cartilaginous tumors. *Int J Mol Med* 2002;9:217-219
- 27 Vermeer H, Hendriks-Stegeman BI, van der Burg B, van Buul-Offers SC, Jansen M. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:277-284
- 28 Neye H. Mutation of FKBP associated protein 48 (FAP48) at proline 219 disrupts the interaction with FKBP12 and FKBP52. *Regul Pept* 2001;97:147-152
- 29 Krummrei U, Baulieu EE, Chambrud B. The FKBP-associated protein FAP48 is an antiproliferative molecule and a player in T cell activation that increases IL2 synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2444-2449
- 30 Geng L, Pfister S, Kraeft SK, Rudd CE. Adaptor FYB (Fyn-binding protein) regulates integrin-mediated adhesion and mediator release: differential involvement of the FYB SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11527-11532
- 31 Ikeda Y, Suehiro T, Ohsaki F, Arai K, Kumon Y, Hashimoto K. Relationships between polymorphisms of the human serum paraoxonase gene and insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;60:79-85
- 32 Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:468-474
- 33 Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-44449
- 34 Porcellini A, Messina S, De Gregorio G, Feliciello A, Carlucci A, Barone M, Picascia A, De Blasi A, Avvedimento EV. The expression of the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor and the cAMP-dependent protein kinase RII beta regulatory subunit confers TSH-cAMP-dependent growth to mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 2003;278:40621-40630
- 35 Glenn HL, Jacobson BS. Cyclooxygenase and cAMP-dependent protein kinase reorganize the actin cytoskeleton for motility in HeLa cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;55:265-277
- 36 Bariagaber AK, Whalen MM. Decreased adenylyl cyclase and cAMP-dependent protein kinase activities inhibit the cytotoxic function of human natural killer cells. *Hum Immunol* 2003;64:866-873
- 37 Wong LF, Harding T, Uney J, Murphy D. cAMP-dependent protein kinase A mediation of vasopressin gene expression in the hypothalamus of the osmotically challenged rat. *Mol Cell Neurosci* 2003;24:82-90

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

• 研究快报 •

大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的人同源基因是一种新型琥珀酸脱氢酶的亚单位编码基因

成军, 王刚, 刘妍, 邵得志, 张玲霞, 陈菊梅

成军, 王刚, 刘妍, 邵得志, 张玲霞, 陈菊梅, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
 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: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 应用分子生物学和生物信息学方法, 寻找、克隆大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的人同源基因, 阐明 LRRP1 基因的结构和功能, 为研究肝脏再生调节的分子生物学机制奠定基础。

方法: 利用美国国立卫生研究院建立的核苷酸数据库

(GenBank)以及相应的核苷酸序列同源性搜索分析软件(BLASTN),以大鼠的LRRP1的cDNA序列作为参照,对于人的同源性cDNA序列进行搜索分析,寻找人的LRRP1的同源基因序列.利用蛋白质一级结构序列的数据库以及相应的同源蛋白序列的搜索分析,阐明人LRRP1蛋白质一级结构与已知蛋白序列的同源性,从而根据蛋白质一级结构的相似性,对于新克隆基因进行功能方面的预测分析.应用在线软件的分析,对于人LRRP1蛋白质一级结构序列进行分析预测,分析其氨基末端序列是否具有信号肽序列,以判断人LRRP1蛋白是否是一种可以分泌表达的蛋白;同样对人LRRP1蛋白质一级结构序列进行在线软件的分析,对于人LRRP1蛋白质分子结构中的潜在的糖基化位点以及其他类型的修饰位点进行预测.

结果:人的LRRP1的编码基因由480 nt组成,编码产物由159 aa组成.人LRRP1的蛋白质一级结构序列与人琥珀酸脱氢酶亚单位D、牛琥珀酸脱氢酶亚单位D高度同源,同源性分别为79%(126/159),78%(123/156).人LRRP1是一种分泌蛋白,在其分子结构中具有N-糖基化位点、蛋白激酶C磷酸化位点和豆蔻脂化修饰位点.

结论:人LRRP1蛋白是一种新型的琥珀酸脱氢酶的亚单位编码基因.

成军,王刚,刘妍,邵得志,张玲霞,陈菊梅.大鼠肝再生相关基因LRRP1的人同源基因是一种新型琥珀酸脱氢酶的亚单位编码基因.世界华人消化杂志2004;12(7):1714-1717

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1714.asp>

0 引言

肝脏是一种具有极强的再生能力的器官之一.正常肝脏一般都处于静止状态,但是如果出现肝脏损伤的情况,如肝脏部分切除(手术)、化学性肝损伤(药物中毒)、病毒感染后的肝损伤(各种急、慢性病毒性肝炎)、肝脏肿瘤(肝细胞癌)等原因造成肝脏细胞损伤和坏死,都可以立即诱发和启动肝脏的再生过程^[1-3].肝脏损伤和再生的过程涉及到非常复杂的分子生物学机制,研究肝脏再生的分子生物学机制,探索参与肝脏再生过程的因素及其调节作用,对于肝脏疾病的防治、探索新型的治疗方法和药物具有十分重要的意义.为了研究在肝再生过程中参与的新的基因,我们首先建立了肝脏部分切除的大鼠模型,对于静止期肝脏和再生过程中的肝脏的基因表达谱,利用抑制性消减杂交(SSH)技术进行筛选^[4-6],获得了一系列与肝脏再生相关的基因类型,其中包括大鼠肝脏再生相关蛋白1(LRRP1)^[7].为了研究不同种属生物LRRP1的同源基因,探索其生物学功能,我们利用生物信息学(bioinformatics)技术^[8-10]对于大鼠LRRP1的人的同源基因进行了研究和分析,发现人LRRP1是一种琥珀酸脱氢酶的新的亚单位.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠LRRP1的基因克隆化的基本过程见文献.人LRRP1的基因克隆化利用不同种属生物基因同源的原理,利用美国国立卫生研究院(NIH)的生物工程研究所(NCBI)建立的核苷酸数据库 GenBank 进行同源基因序列的比对和搜索,发现cDNA序列AY358788与我们克隆的大鼠的LRRP1的cDNA序列有高度的同源性.AY358788基因序列是基因组研究计划中的一部分,并不是功能性的克隆化策略,也不清楚AY358788这一基因存在的真实性和生物学功能.从核苷酸序列同源性的比对结果来看,AY358788基因与我们的LRRP1基因序列有着高度的同源性,认为AY358788就是大鼠LRRP1的人的同源基因序列.

1.2 方法 以人的LRRP1蛋白质一级结构序列作为参照,应用蛋白质一级结构序列的数据库进行分析(<http://www.ncbi.nlm.gov.nih/blast/swissprot>),在蛋白质一级结构序列的常用数据库Swissprot数据库中发现了人的LRRP1与人的琥珀酸脱氢酶亚单位D和牛的琥珀酸脱氢酶亚单位D高度同源.因为人LRRP1的蛋白质一级结构与人的琥珀酸脱氢酶D亚单位的序列高度同源,但又不完全一致,因而对于人LRRP1的结构和功能的预测具有非常重要的价值.目前根据已知蛋白信号肽序列的性质和比较结果,建立了蛋白信号肽序列的预测方法和计算机软件系统,我们应用在线软件系统<http://www.stepec.gr/cgi-synaptic/sigfind>,对于人LRRP1蛋白质信号肽序列进行预测分析.对于人LRRP1蛋白质潜在修饰位点序列的计算机预测,应用的软件系统是<http://us.expasy.org/prosite>.

2 结果

2.1 人LRRP1的基因克隆化 利用生物信息学技术,发现在核苷酸序列数据库 GenBank 中存在与大鼠LRRP1的同源的来源于人的基因序列.其中一段cDNA序列与大鼠LRRP1的基因序列高度同源,从而确定为人的LRRP1,即大鼠LRRP1的人的同源基因.对于人LRRP1的基因序列及其编码产物的一级结构进行分析,结果表明人LRRP1的编码基因序列为480 nt,编码产物由159 aa组成(图1).

```
ATG GCG GTT CTC TTA AAG CTG GGC GTT CTC
M A V L L K L G V L
TGC AGT GGC CAA GGA GCT CGA GCT CTC CTA
C S G Q G A R A L L
CTC CGA AGC CGG GTG GTC AGA CCC GCT TAT
L R S R V V R P A Y
GTG TCA GCA TTT CTC CAG GAC CAG CCT ACC
V S A F L Q D Q P T
CAA GGA CGG TGT GGT ACC CAG CAC ATT CAC
Q G R C G T Q H I H
CTG TCA CCA AGC CAC CAC TCT GGT TCC AAG
L S P S H H S G S K
```

```

GCT GCA TCT CTC CAC TGG ACC AGT GAG AGG
A A S L H W T S E R
GTT GTC AGT GTT CTG CTC TTG GGG CTG ATC
V V S V L L L G L I
CCT GCT GGG TAC TTG AAT CCC TGC TCT GTG
P A G Y L N P C S V
GTG GAC TAC TCT CTG GCT GCA GCC CTC ACC
V D Y S L A A A L T
CTG CAC AGT CAC TGG GGC CTT GGA CAA GTG
L H S H W G L G Q V
GTT ACC GAC TAC GTT CAT GGG GAC ACC CTG
V T D Y V H G D T L
CCG AAG GCT GCC AGG GCA GGC CTC TTG GCA
P K A A R A G L L A
CTC TCA GCT TTG ACC TTT GCT GGG CTT TGC
L S A L T F A G L C
TAC TTC AAT TAC CAC GAT GTC GGC ATC TGC
Y F N Y H D V G I C
AGA GCG GTT GCC ATG CTG TGG AAG CTC TGA
R A V A M L W K L *

```

图1 大鼠肝再生相关基因LRRP1的人同源基因及其编码产物一级结构序列。

2.2 人LRRP1蛋白同源序列的分析 以人的LRRP1蛋白质一级结构序列作为参照,对于蛋白质一级结构序列的数据库(<http://www.ncbi.nlm.gov.nih/blast/swissprot>)进行搜寻,发现人LRRP1的蛋白质一级结构序列与人琥珀酸脱氢酶亚单位D、牛琥珀酸脱氢酶亚单位D高度同源,同源性分别为79% (126/159), 78% (123/156),表明人LRRP1属于琥珀酸脱氢酶亚单位D的一个新的同源蛋白(图2),其基本功能就是构成琥珀酸脱氢酶。

2.3 人LRRP1蛋白的信号肽序列分析 利用生物信息学技术的在线分析(<http://www.stepc.gr/cgi-synaptic/sigfind>),对于人LRRP1的潜在的信号肽序列进行分析,发现人LRRP1蛋白质序列中的氨基末端45个氨基酸残基(MAVLLKLGVLCSGQGARALLLSRVVVRPAYV

SAFLQDQPTQGRCG)组成了人LRRP1的信号肽序列,表明人LRRP1是一种可以分泌的蛋白类型。

2.4 人LRRP1蛋白质结构中潜在修饰位点的分析 利用在线软件(<http://us.expasy.org/prosite/>)对于人LRRP1蛋白质一级结构中存在的潜在的修饰位点进行分析,结果表明:在人LRRP1蛋白分子结构中,第68-70位的氨基酸残基序列(SER)存在潜在的蛋白激酶C(PKC)的磷酸化位点;在89-92 aa(SVVD)存在酪蛋白激酶II磷酸化位点;在8-13 aa(GVLCSG)、58-63 aa(GSKAAS)、78-83 aa(GLIPAG)、108-113 aa(GQVVTD)和148-153 aa(GICRAV)分别存在潜在的N-豆蔻脂化位点。

3 讨论

许多与细胞周期、细胞凋亡和细胞信号转导相关的基因几乎都参与了肝脏再生的分子生物学调节机制和过程^[11-15]。我们采用肝脏70%手术切除后12h时间点,此时的基因表达对于早期阶段肝脏再生过程的调控具有十分重要的意义。由于本项研究旨在发现肝脏再生过程中相关的新的基因序列,因此我们采用的技术途径和方法主要是抑制性消减杂交(SSH, suppression subtractive hybridization)技术。这种SSH技术,对于2个具有可比性的系统的基因表达谱进行比较研究,但是对于研究的对象基因又没有先决条件,所以是一种十分有效的研究技术途径,这一点优于基因表达谱新技术,因在基因表达谱芯片技术研究中,芯片制备时点样的基因类型就决定了表达谱芯片的检测范围,因而不利于发现更多的新的基因类型。我们对于大鼠70%肝脏部分切除模型的基因表达谱进行分析,发现了一种新的基因,命名为LRRP1,本文应用生物信息学技术,确定了人LRRP1的核苷酸和蛋白质一级结构序列。利用在线软件分析结果表明,人LRRP1是一种分泌性的蛋白类型,在其蛋白质一级结构的氨基末端有一段由45 aa组成的信号肽序列。对于已知蛋白序列数据库的搜索结果表明,人LRRP1是一种新型的琥珀酸脱氢酶复合体亚单位分子。在人LRRP1分子结构中,还存在着潜在的N-糖基化位点、PKC磷酸化位点和豆蔻脂化位点等。

人 LRRP1:	1	MAVLLKLGVLCSGQGARVXLLRSWVVRHAYVSAFLQDQPTQGRCGTQHIHLSPSHHSGSK	60
人 SH-D:	1	MAVLWRLSAVCGALGGRALLRTPVVRPAHISAFLQDRPIPEWCGVQHIHLSPSHHSGSK	60
牛 SH-D:	1	MAVLWRLSVLCAKEGRALFLRTPVVRPALVSAFLQDRPAQGWCGTQHIHLSPSHHSGSK	60
人 LRRP1:	61	AASLHWTSERVVSLLLLGLIPAGYLNPCSVVDYSLAAALTLHSHWGLGQVVTDYVHGDTL	120
人 SH-D:	61	AASLHWTSERVVSLLLLGLLPAAYLNPCSAMDYSLAAALTLHGHWGLGQVVTDYVHGDA	120
牛 SH-D:	61	AASLHWTGERVVSLLLLGLIPAAAYLNPCSAMDYSLAATLTLHSHWGLGQVVTDYVHGDAV	120
人 LRRP1:	121	PKAPRAGLLALSAPTFAGLCYFNHYHDVGICRAVAMLWKL	159
人 SH-D:	121	QKAAKAGLLALSALTFAGLCYFNHYHDVGICKAVAMLWKL	159
牛 SH-D:	121	QKAAKTGLLVLSAFTFAGLCYFNHYHDVGICKAVAMLWKL	159

图2 人LRRP1与人、牛琥珀酸脱氢酶蛋白质一级结构的序列比较。人LRRP1:大鼠肝再生相关基因LRRP1的人同源基因编码产物;人SH-D:人琥珀酸脱氢酶亚单位D;牛SH-D:牛琥珀酸脱氢酶亚单位D。

在肝脏再生的调节机制中,一系列的生长因子参与这一复杂的调节过程,如肝细胞生长因子(HGF)、肝再生增强因子(ALR)、表皮生长因子(EGF)等.特别是ALR在肝脏再生中的作用近年来受到了广泛的重视.寻找与肝脏再生相关的新型蛋白药物,利用基因重组技术表达纯化促进肝脏再生的新型药物,具有十分重要的意义.我们利用基因工程技术,经过发酵和蛋白质纯化等过程,制备了重组的人ALR蛋白,在体内实验中发现这种生长因子蛋白可以显著减轻四氯化碳引起的小鼠的急性肝损伤,为进一步推进重组ALR的产业化,奠定了坚实的基础^[16-19].

4 参考文献

- 1 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003; 11:373-377
- 2 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-761
- 3 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004; 12:1-5
- 4 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 5 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选丙型肝炎病毒NS3蛋白反式激活基因1的反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12:843-846
- 6 党晓燕, 成军, 邓红, 王建军, 杨倩, 刘妍, 纪冬, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术克隆HCV NS3蛋白反式激活基因2的上调基因. 世界华人消化杂志 2004;12:847-850
- 7 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因LRRP1的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 8 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 牛丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. 中国人兽共患病杂志 2003;19:73-76
- 9 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 猪丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. 生物学杂志 2003; 20:10-13
- 10 成军, 李克, 王琳, 刘妍, 钟彦伟, 李莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6猴同源基因的克隆化与序列分析. 中西医结合肝病杂志 2003;14:354-357
- 11 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 钟彦伟. 大鼠肝再生增强因子基因组DNA的克隆化与序列分析. 临床肝胆病杂志 2001;17:36-37
- 12 董菁, 成军, 刘友昭, 王勤环, 王刚, 施双双. 大鼠肝再生增强因子假基因的克隆化与序列分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:105-107
- 13 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 14 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
- 15 成军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 肝再生增强因子的作用机制. 临床肝胆病杂志 2002;18:146-148
- 16 王永华, 成军, 洪源, 王琳, 刘妍, 张健, 李克. 重组人肝再生增强因子对小鼠CCl₄中毒性肝损伤的治疗作用. 世界华人消化杂志 2004;12:859-861
- 17 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Liu Y, Duan HJ, Hong Y, Wang G, Li L, Zhang LX. Cloning and expression of the gene of human augmenter of liver regeneration in yeast cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:87-91
- 18 Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS, Wang G, Si CW. Cloning and analysis of the genomic DNA sequence of augmenter of liver regeneration from rat. *Chin Med Sci J* 2002;17:63-67
- 19 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y, Li L, Zhang LX, Chen JM. Screening of augmenter of liver regeneration-binding proteins by yeast-two hybrid technique. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:81-84

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

• 研究快报 •

酵母双杂交筛选白细胞中新基因NS3TP6结合蛋白基因

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 卢成哲, 梁耀东, 刘敏, 李强

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

白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710039
卢成哲, 中国人民解放军解放军第206医院CT室 吉林省通化市 134001
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白3(NS3)反式调节靶基因编码产物NS3TP6

蛋白结合蛋白的基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV NS3TP6蛋白基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提取质粒, 转化入大肠杆菌, 提取质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出HCV NS3TP6蛋白基因并在酵母细胞中表达 配合后选出在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基和铺有X-α-半乳糖(X-α-gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落共7个, 其中3个人类白细胞CD14抗原, 1个人类免疫球蛋白轻链, 3个人类推定蛋白基因

(AC124014, AC097504, AC023785).

结论: 成功克隆出 NS3TP6 蛋白的结合蛋白, 为进一步研究 HCV 的作用提供了新线索.

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 卢成哲, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交筛选白细胞中新基因 NS3TP6 结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7): 1717-1720

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1717.asp>

0 引言

目前, 丙型肝炎病毒(HCV)感染 还缺乏特异有效的治疗措施^[1-5], 探索新型防治 HCV 感染的新方法刻不容缓. 目前关于HCV感染及其致病的分子生物学机制研究还有相当多的未知领域. 探索防治HCV感染的新技术, 必须从 HCV 致病的分子生物学机制入手.

丙型肝炎病毒(HCV)是单股正链RNA病毒, 其中非结构蛋白 NS3 基因编码为 70 kD 的 NS3 蛋白(631 aa)是一种多功能蛋白质, 具有丝氨酸蛋白酶、三磷酸核苷酸酶(NTPase)和 RNA 解旋酶(helicase)的功能, 在 HCV 复制及表达产物多蛋白裂解加工上起重要作用^[6-10]. 研究表明^[11-15], HCV NS3 蛋白还可能通过反式激活作用, 调控细胞内多种病毒及细胞基因的转录, 在 HCV 致病(癌)过程中起着重要的作用. 我们应用微矩阵(microarray)技术对于表达 HCV NS3 载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 阐明了 NS3 蛋白反式激活作用的部分靶基因, 同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 NS3 蛋白反式激活作用的新靶基因, 即丙型肝炎病毒 NS3 蛋白反式激活基因 6(NS3TP6 Genbank NM_025190), 为进一步研究 HCV NS3TP6 蛋白与免疫系统的关系, 我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中与 HCV NS3TP6 蛋白结合蛋白基因^[16-24]. 从而为 HCV NS3 蛋白反式激活作用的新靶基因(HCV NS3TP6)研究提供新的方向.

1 材料和方法

1.1 材料 *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、cDNA 淋巴文库, 酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基 SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌(DH5 α), 本室保存.

1.2 方法 HCV NS3TP6 的酵母表达载体 pGBKT7-HCV NS3TP6 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109 由本室构建. cDNA 白文库进行增菌后, 提出质粒, 转化入酵母细胞(Y187), 经文库滴定, 确定文库细胞计数大于 1×10^{12} /L. 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于 1×10^{12} /L)与淋巴文库混合, 30 轻摇配合过夜, 24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 16 d 后把长出的大于 3 mm 的酵母集落, 在铺

有 X- α -半乳糖苷酶的 QDO 上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在 QDO 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落. 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落经 BglIII 酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 进行核苷酸序列同源性比对, 进行生物信息学分析.

2 结果

cDNA 测序与同源性分析初步结果配合后筛选出在 4 缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基和铺有 X- α -gal 的 4 缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 7 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较, 结果(见表 1).

表 1 cDNA 测序与同源性分析初步结果

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	人类白细胞 CD14 抗原	96-99%	3
2	人类免疫球蛋白 lambda 轻链	95%	1
3	人类推定蛋白 1	98%	1
4	人类推定蛋白 2	98%	1
5	人类推定蛋白 3	94%	1

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^[22-30]. 病毒的基因表达调节与真核细胞相似^[31-33], 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, 即病毒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. 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)调节两种. 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基因的转录活性的调节, 增强子序列对启动子转录活性的调节都属于此类. 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). 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. 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. HCV 感染肝细胞之后, 也存在复杂的反式调节作用, 临床和实验研究显示 HCV 感染与肝细胞癌

(HCC)发生发展过程密切相关,其中病毒NS3蛋白起到重要的作用.HCV NS3蛋白对细胞信号转导途径,尤其是血清应答元件(SRE).激活蛋白1(AP-1)、血清应答因子(SRF)等信号转导途径具有增强作用.Sakamuro et al 研究显示^[34],NS3 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,直接证明了HCV NS3蛋白的恶性转化潜能.NS3还可能通过解旋酶活性诱导肝细胞基因组的不稳定性,甚至发生突变.另外,NS3能与蛋白激酶A(PKA)催化亚单位特异结合,可能干扰RNA与细胞内信号转导过程,严重干扰细胞正常功能.刘妍 et al 研究表明NS3基因重组表达载体在HepG2细胞中表达相应的蛋白^[35],对SV40早期启动子具有反式激活作用,从而使SV40启动子下游的CAT基因表达增强.这些都是HCV NS3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,说明HCV NS3蛋白的反式激活功能在HCV致病中发挥重要的作用,研究其作用分子生物学机制有助于理解HCV感染的慢性化和致癌作用机制.我们应用微矩阵(microarray)技术对于表达HCV NS3载体转染的HepG2细胞进行研究,阐明了NS3蛋白反式激活作用的部分靶基因,同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了NS3蛋白反式激活作用的新靶基因,即丙型肝炎病毒NS3蛋白反式激活基因6(NS3TP6 Genank NM_025190),为进一步研究HCV NS3TP6蛋白与免疫系统的关系,我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中与HCV NS3TP6蛋白结合蛋白基因^[36-40].

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA相互作用的一种有效的基因分析方法,他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法.酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白X和Y分别融合到一酵母转录激活因子的BD和AD上,X与Y的相互作用重构了激活因子,从而导致下游“报告基因”的转录,产生容易探测到的表型^[41-46].我们使用的是酵母双杂交系统^[33].实验中我们在真核表达载体pGBK-T7中构建pGBT7-HCV NS3TP6诱饵质粒并在酵母菌株AH109中表达了HCV NS3TP6基因,与转化人白细胞cDNA文库的酵母菌株Y187进行配合,筛选出与之相互作用的蛋白基因5种,其中包括人类白细胞CD14抗原,人类免疫球蛋白轻链,3种人类推定蛋白基因(AC124014,AC097504,AC023785).人类免疫球蛋白轻链的功能是识别抗原,在细胞信号传导中起重要的作用.人类白细胞CD14抗原是内毒素或脂多糖受体(LPS),与肝细胞和免疫细胞的凋亡和HCV感染后免疫障碍有关^[47-53].Caradonna et al 研究表明LPS可特异性地与单核/巨噬细胞表面受体CD14结合^[47],在HCV感染的患者内毒素血症致肝细胞损伤的过程中起着重要的作用.Mammaev et al 研究表明CD14的表达与肝细胞凋亡正相关^[48],经 α 干扰素治疗,CD14的表

达降低.Nakamoto et al 用CD14+单核细胞与CD8+和CD4+T淋巴细胞共孵育的方法^[49],得出CD8+和CD4+T淋巴细胞下降的结果,其研究表明CD14的表达与CD8+和CD4+T淋巴细胞的凋亡有关.

通过以上结果提供的这些线索,我们可以进行更深入的研究,进一步弄清各种蛋白与HCV NS3TP6的相互作用及HCV NS3TP6确切的作用,为寻找阻断HCV感染及HCC发生的有效方法探索新道路.当然,这些结合蛋白的发现只是研究病毒蛋白功能的一个起点,在极其复杂的体内环境中,需要更多的实验证据来揭示这种结合的生物学意义.

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 成军,李莉.清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制.世界华人消化杂志 2002;10:73-76
- 3 成军,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
- 4 成军.慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义.世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 5 成军.新基因结构与功能研究的策略.世界华人消化杂志 2003;11:373-377
- 6 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
- 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 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
- 9 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,陆荫英,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 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
- 11 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
- 12 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
- 13 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
- 14 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟.酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因.世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 15 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞.酵母双杂交技术筛选HBcAg肝细胞结合蛋白基因.世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 16 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞.HBcAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆.世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 17 夏小兵,成军,王刚,杨继珍,刘妍,董菁,王琳,李克.人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达.世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 18 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
- 19 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
- 20 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
- 21 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因LRRP1的克隆化. *世界华人消化杂志* 2002;10:165-168
- 22 Hohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Yano A, Nakamura N, Ikehara Y. Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem* 2001;276:45298-45306
- 23 Rao MA, Cheng H, Quayle AN, Nishitani H, Nelson CC, Rennie PS. RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2002;277:48020-48027
- 24 Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* 1998;143:1041-1052
- 25 Wang D, Li Z, Messing EM, Wu G. Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem* 2002;277:36216-36222
- 26 Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M. Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37:50-54
- 27 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 28 Nagpal S, Ghosn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 29 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 30 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 31 Zhong Y, Cheng J, Wang G, Shi SS, Zhang LX, Li L, Chen JM. The preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its application in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867
- 32 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li Li, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein- a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 33 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
- 34 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:378-384
- 35 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选Hcbp6人源单链可变区抗体. *世界华人消化杂志* 2003;11:389-393
- 36 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:399-403
- 37 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- 38 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因10的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:935-938
- 39 成军, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:920-924
- 40 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:930-934
- 41 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因10的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:925-929
- 42 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. *世界华人消化杂志* 2003;11:880-889
- 43 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:943-946
- 44 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:939-942
- 45 Caradonna L, Mastronardi ML, Magrone T, Cozzolongo R, Cuppone R, Manghisi OG, Caccavo D, Pellegrino NM, Amoroso A, Jirillo E, Amati L. Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of hepatitis C virus infection. *Curr Pharm Des* 2002;8:995-1005
- 46 Mammaev SN, Lukina EA, Lugovskaia SA, Levina AA, Shul'pekova IuO, Pochtar' ME, Ivashkin VT. Cytokine production in patients with chronic viral hepatitis C during treatment with interferon-alpha. *Klin Lab Diagn* 2001;8:45-48
- 47 Nakamoto Y, Kaneko S, Kobayashi K. Monocyte-dependent cell death of T lymphocyte subsets in chronic hepatitis C. *Immunol Lett* 2001;78:169-174
- 48 Voiculescu CL, Balasoiu M, Turculeanu A, Radu C, Avramescu C, Radu E. Different patterns of some systemic immunological cell markers in HIV only, and HIV/hepatitis C-infected children. *Pediatr AIDS HIV Infect* 1996;7:31-36
- 49 Kolarski V, Petrova D, Naumova E, Mikhailova A, Teokharov P, Dzhonova D, Todorov A, Slavchev B, Diankova L. The systemic and local immune responses in patients with alcoholic liver cirrhosis depending on hepatitis C viral infection (HCV). *Vutr Boles* 1999;31:23-27
- 50 Jirillo E, Greco B, Caradonna L, Satalino R, Amati L, Cozzolongo R, Cuppone R, Manghisi OG. Immunological effects following administration of interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C virus (chCV) infection. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1996;18:355-374
- 51 Holzer TJ, Heynen CA, Kennedy MM, Peterson DA. Altered lymphocyte phenotypes and proliferative responses in chimpanzees infected with hepatitis C virus. *J Med Primatol* 1991;20:295-301
- 52 Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3898-3894
- 53 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活SV40病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2003;28:44-46

针刺对胃黏膜损伤家兔表皮生长因子、生长抑素及生长抑素受体基因表达的影响

易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平

易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平, 湖南中医学院针灸推拿系 湖南省长沙市 410007

国家自然科学基金资助课题, No. 30171136

湖南省教育厅资助课题, No. 01A013

项目负责人: 易受乡, 410007, 湖南省长沙市韶山中路 113 号, 湖南中医学院针灸推拿系. yishouxian@yahoo.com

电话: 0731-5381161 传真: 0731-5557891

收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-18

摘要

目的: 为了证实针刺足阳明经对胃黏膜损伤的保护作用, 对表皮生长因子(EGF)、生长抑素(SS)及生长抑素受体基因(SSR₁ mRNA)表达影响, 从多层次探讨经-脏腑相关的特异性。

方法: 40 只家兔随机分为: A 对照组, B 胃溃疡模型组, C 足阳明胃经(胃经)组, D 足少阳胆经(胆经)组, E 足太阳膀胱经(膀胱经)组。乙醇灌胃造成家兔胃溃疡模型后, 采用经络刺激仪对 C - E 组分别针刺胃经、胆经、膀胱经(穴) 7 d。治疗结束后测定以上各组胃黏膜损伤指数, 用放射免疫及 RT-PCR 法分别测定胃黏膜 EGF、SS 及 SSR₁ mRNA 表达。

结果: 模型组 EGF 含量(73.6 ± 14.8)较正常组(91.3 ± 14.9)明显降低(P < 0.01); 胃黏膜损伤指数(24.88 ± 6.29)、SS 含量(2978.6 ± 587.6)及 SSR₁ mRNA 表达(2.56 ± 0.25)较正常组(8.50 ± 2.98)、(1852.4 ± 361.7)、(1.04 ± 0.36)显著升高(P < 0.01)。胃经组 EGF(92.2 ± 6.7)、胃黏膜损伤指数(10.88 ± 3.23)、SS 含量(1 800.2 ± 488.1)及 SSR₁ mRNA 表达(1.07 ± 0.08)与模型组比较有显著差异(P < 0.01)。但胆经及膀胱经组与模型组比较上述指标未得到改善, 与胃经组比较有显著差异(P < 0.01 或 0.05)。

结论: 针刺足三阳经对家兔胃黏膜损伤的保护作用以胃经组的作用最强, 其机制可能是通过调整有关脑肠肽及生长抑素受体基因表达有关。上述结果为经-脏腑相关的特异性提供了一定实验依据。

易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平. 针刺对胃黏膜损伤家兔表皮生长因子、生长抑素及生长抑素受体基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12(7):1721-1723

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1721.asp>

0 引言

在以往的研究中发现, 针刺足阳明经穴对家兔胃黏膜损伤有明显的保护作用^[1], 为进一步探讨其作用机制

及经脉作用的特异性, 本研究以实验性胃溃疡家兔为模型, 比较了针刺足阳明、足少阳及足太阳等不同经脉(穴位)对家兔胃黏膜损伤指数、相关脑肠肽及胃黏膜生长抑素受体基因表达的影响, 力求从多层次、多水平探讨足阳明经与胃相关的规律性。

1 材料和方法

1.1 材料 TRIZOL 试剂(GZBCO BRL 公司), 逆转录试剂盒, Tag DNA 聚合酶(Progmege 公司)。表皮生长因子(EGF)和生长抑素(SS)放免试剂盒由北京华英放免技术研究所提供。Eppendorf 低温冷冻离心机, Strategene Eagle Eye 图像分析处理系统(美国 STRATAGENE 公司), 玄手牌经络疏通仪(中国和平经济技术咨询公司)

1.2 方法

1.2.1 实验性胃溃疡模型制备 采用乙醇造模法^[2]。动物禁食 48 h, 用无水乙醇按 2.35 mL/kg 体重剂量灌胃造模, 24 h 后恢复普通饮食, 对照组用等量生理盐水灌胃。

1.2.2 动物分组及处理方法 新西兰纯种家兔 40 只, 体重 1.5-2.5 kg, 月龄 3-4 mo, 雌雄兼用, 由本院实验动物中心提供。将 40 只家兔随机分为 5 组, 每组 8 只。即 A: 空白对照组(空白组); B: 胃溃疡模型组(模型组); C: 针刺足阳明经穴组(胃经组); D: 针刺足少阳经穴组(胆经组); E: 针刺足太阳经穴组(膀胱经组)。A 组采用生理盐水灌胃, B-E 组采用无水乙醇灌胃造模, 造模后 C-E 组分别针刺胃经、胆经及膀胱经各 7 d。疗程结束后各组动物处死, 摘取胃黏膜作指标检测。

1.2.3 穴位定位与针刺方法 穴位定位参照《实验针灸学》^[3]常用实验动物的针灸穴位定位及拟人比照法^[4]制订。足阳明经取“内庭”、“解溪”、“足三里”、“梁丘”、“天枢”、“梁门”6 个穴位为刺激点, 其他经脉均以此为参照, 选取同水平段上相应部位的穴(点)为对照刺激点。针刺方法: 采用玄手牌经络疏通仪行循经逐点动态刺激法^[5]。仪器启动后进入编程状态: 选择单向运行时序, 步进速度为 0.5 s。刺激参数选择双向脉冲、连续波, 频率 50 Hz, 波宽 0.5 ms。将仪器输出夹分别夹在沿体表所选经脉穴位固定的 6 根不锈钢的针柄上, 使刺激兴奋顺序由下肢传向躯干, 反复运行, 输出强度控制在“2-3”档之间。针刺每日 1 次, 每次刺激时间均为 30 min, 连续 7 d。

1.2.4 指标检测

1.2.4.1 胃黏膜损伤指数 针刺治疗 7 d 后动物处死, 剖腹取出胃, 从幽门至贲门剪开胃, 清洗胃内容物, 依

照 Guth 记分法^[9]计算胃黏膜损伤指数。

1.2.4.2 EGF、SS 测定 胃黏膜组织匀浆后,按试剂盒要求处理标本,采用放射免疫法检测 EGF、SS 含量。

1.2.4.3 SSR₁ mRNA 表达水平测定 SSR₁ mRNA 表达水平采用 RT-PCR 法: (1)RNA 的提取与纯化:用消毒手术刀切取胃黏膜组织1小块,置于盛有液氮的研钵中研磨成细粉,采用 Trizol 试剂盒,以一步法提取组织总 RNA。电泳可见明显的 28S、18S、5S rRNA 条带,所有样本总 RNA 的 A260/A280 比值在 1.7-1.95 之间。(2)逆转录(RT)反应:以 Oligo(dT)₁₈ 为引物(30 pmol/L)于 65 °C, 5 min 逆转录 2 μg 总 RNA 样品中的 mRNA 为 cDNA, 20 μL 逆转录反应体系中含 20 u RNA 酶抑制剂(Promega 公司)、0.5 mmol/L dNTP, 10 u AMV 逆转录酶及 5 × RT 缓冲液。(3)聚合酶链反应(PCR):用下列引物(由上海博亚公司提供)进行 PCR 反应。SSR₁(生长抑素受体有 5 个亚型,本实验只做胃黏膜表达最强的第 1 个,即 SSR₁)有义引物为: 5' -CAAGACGACGCCACCGTGAGCCA-3', 反义引物为: 5' -GGGGTTGGCACAGCTGTTG-3'; 内对照亲环素蛋白(Cyclophilin, cyc)有义引物为: 5' -CCATCGTGTCAATCAAGGACTTCAT-3', 反义引物为: 5' -TTGCCATCCAGCCAGGAGGTCT-3'。50 μL PCR 反应体系中含 10 × PCR 反应缓冲液 5 μL, MgCl₂ 1.5 mol/L, dNTP 200 μmol/L, 模板 cDNA 5 μL, 特异引物均为 0.1 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 3 u, 石蜡油覆盖。SSR₁ 和 cyc cDNA 的 PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 26 个循环; 经最后一次循环后于 72 °C 再延伸 5 min。(4)电泳:取 10 μL × PCR 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, SSR₁ 产物为 66 bp, cyc 产物为 216 bp, 经溴乙锭染色后,紫外灯下照相,并经图像识别分析系统进行电泳条带光密度扫描, SSR₁ mRNA 的相对表达水平用 SSR₁/cyc 的比值计算。

统计学处理 所有数据均以 mean±SD 表示,用 SPSS10.0 软件进行统计学处理。组间比较若方差齐时选择 LSD 法, 方差不齐时选择 DunnettT3 法进行方差分析和两两比较, P < 0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 针刺对胃黏膜损伤指数影响 模型组胃黏膜损伤指数最高,与空白对照组比较具有显著性差异(P < 0.01)。电针治疗后,胃经组与模型组比较,损伤指数明显降低(P < 0.01),而其他各针刺组与模型组比较,无显著性差异(P > 0.05)。各电针治疗组之间比较,胃经组损伤指数明显低于针刺足少阳、足太阳经组(P < 0.01)(表 1)。说明:针刺足阳明经穴能显著降低实验性胃溃疡家兔胃黏膜损伤指数。

2.2 针刺对胃黏膜 EGF 及 SS 含量的影响 空白组胃黏膜 EGF 含量明显高于模型组,SS 含量明显低于模型组,且均有显著性差异(P < 0.01)。胃经组胃黏膜 EGF 含量明显

高于模型组及其他各针刺组,SS 含量明显低于模型组及其他各针刺组(P < 0.01 或 P < 0.05)(表 2)。说明:针刺足阳明经穴使胃溃疡家兔胃黏膜 EGF 含量明显升高,使 SS 含量明显降低。

表 1 各组胃黏膜损伤指数比较(mean±SD)

组别	n	胃黏膜损伤指数(记分法)
空白组	8	8.50 ± 2.98 ^b
模型组	8	24.88 ± 6.29 ^d
胃经组	8	10.88 ± 3.23 ^b
胆经组	8	19.38 ± 3.66 ^d
膀胱经组	8	24.13 ± 1.64 ^d

^bP < 0.01 vs 模型组; ^dP < 0.01 vs 胃经组。

表 2 各组胃黏膜 EGF、SS 含量比较(mean±SD)

组别	n	EGF(pg/mL)	SS (mIU/mL)
空白组	8	91.3 ± 14.9 ^b	1 852.4 ± 361.7 ^b
模型组	8	73.6 ± 14.8 ^d	2 978.6 ± 587.6 ^d
胃经组	8	92.2 ± 6.7 ^b	1 800.2 ± 488.1 ^b
胆经组	8	74.9 ± 9.0 ^d	2 441.0 ± 488.1 ^{ac}
膀胱经组	8	65.4 ± 12.8 ^d	2 592.7 ± 426.8 ^d

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 模型组; ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 胃经组。

2.3 针刺对胃黏膜 SSR₁ mRNA 表达的影响 空白组胃黏膜 SSR₁ mRNA 表达强度明显低于模型组,且二者有显著性差异(P < 0.01)。比较针刺不同经脉组对胃黏膜 SSR₁ mRNA 表达的影响,其减低程度依次为针刺足阳明经组 > 针刺足少阳经组 > 针刺足太阳经组,与胃经组比较有显著差异(P < 0.05 或 P < 0.01)(表 3)。说明:针刺足阳明经穴对实验性胃溃疡家兔生长抑素受体基因表达的抑制作用最强。

表 3 各组胃黏膜 SSR₁ mRNA 表达的比较(SSR₁/cyc)

组别	n	mean±SD
空白组	3	1.04 ± 0.36 ^b
模型组	3	2.56 ± 0.25 ^d
胃经组	3	1.07 ± 0.08 ^b
胆经组	3	1.73 ± 0.16 ^{ab}
膀胱经组	3	2.39 ± 0.39 ^d

^bP < 0.01 vs 模型组; ^aP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 胃经组。

3 讨论

细胞保护(Cytoprotection)是指某些物质具有防止或明显减轻有害物质对消化道上皮细胞损伤和致坏死作用的能力,也包括拮抗溃疡作用。本研究显示针刺足阳明

经穴可降低胃黏膜损伤指数,说明对胃黏膜损伤具有一定的保护作用。

EGF 主要由唾液腺、十二指肠勃氏(Brunner)腺及胰腺分泌^[7],具有较强的抗酸性,能抵抗胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶的破坏,抑制胃酸、胃蛋白酶分泌,增加胃黏膜细胞黏液产生,刺激黏膜上皮细胞增生,增加黏膜 DNA 合成,防止溃疡的形成^[8-10]。临床显示 EGF 可使胃、十二指肠溃疡愈合速度明显加快^[11-13]。本研究发现,针刺足阳明经穴能显著升高实验性胃溃疡家兔胃黏膜 EGF 的含量,且与模型组及其他各针刺组比较,有显著性差异。说明针刺足阳明经可能通过调整 EGF 促进胃黏膜的修复。

生长抑素是消化道中主要起抑制作用的激素,能抑制胃肠激素的释放与活性。生长抑素受体(SSR)广泛存在于胃肠道及中枢神经系统中,由5个亚型组成,其中 SSR₁ 在胃的表达最强。SS 由这些受体介导抑制胃泌素、组胺及胃酸的分泌,在胃酸的调节中起十分重要的作用。SS 还可抑制消化道血流及胃肠上皮细胞的增生^[14-16]。SS 在溃疡病中的变化,结果报告不一^[17-18]。认为溃疡病 SS 降低的理由是溃疡病胃黏膜 SS 贮存量及释放量减低,不足以制约胃酸,以至呈现高胃酸状态而引起溃疡;认为 SS 水平升高的理由是高胃酸状态反馈性刺激所出现的代偿机制,机体企图藉此加强对胃酸的抑制。本研究结果显示实验性胃溃疡家兔 SS 及 SSR₁ 表达升高,可能是由于代偿反馈所致。

Konturek et al^[19]发现胃黏膜 SS 可发挥生长抑制作用,拮抗许多 EGF 等生长因子的营养作用,抑制胃黏膜、胃肠上皮细胞增生和黏膜的愈合,因而在很大程度上抑制了实验性大鼠溃疡的愈合。Pfeiffer et al^[20]也发现:大鼠实验性胃溃疡愈合过程中表皮生长因子受体表达增多,而生长抑素受体表达减少,在溃疡灶部位甚至是持久性缺乏。本研究显示针刺足阳明经后 SS 及 SSR₁ 表达均较模型组低,一方面可能是由于针刺减轻了溃疡损伤,因而代偿反馈作用减弱;另一方面提示在溃疡愈合过程中,SS 对细胞增生作用减弱,意味着允许生长因子的营养性充分表现,从而促进溃疡愈合,对修复过程中是有益的表现^[21]。

本研究比较了针刺足三阳经穴对实验性胃溃疡家兔胃黏膜损伤保护作用的强弱,结果表明针刺足阳明经穴作用最强,足少阳经穴次之,足太阳经穴作用最差。说明:足阳明经与胃关系最为密切,足少阳经次之,足太阳经与胃的联系不密切。这一结果与传统经络理论及针灸临床实践相吻合,同时也再次证实了足阳明经与胃的相关特异性。

4 参考文献

- 1 严洁,常小荣,刘建华,邓常青,李铁浪,李江山,易受乡,林亚平.电针足阳明经穴对家兔胃黏膜损伤防御性保护作用的研究.中国针灸 2001;21:350-352
- 2 常小荣,严洁,李江山,林亚平,易受乡.针刺足阳明经穴对兔胃黏膜损伤前后胃运动功能的影响.中国针灸 2002;22:675-677
- 3 林文注,王佩.实验针灸学.第1版.上海:上海科学技术出版社,1999:279-291
- 4 易受乡,阳仁达,严洁,常小荣,林亚平,臧敬跃.逐点动态刺激足阳明经对大鼠胃黏膜损伤保护作用的实验观察.湖南中医学院学报 1996;16:53-56
- 5 易受乡,阳仁达,严洁,常小荣,林亚平,臧敬跃.胃经循经逐点动态刺激对家兔胃排空影响的观察.湖南中医学院学报 1995;15:50-53
- 6 Cuth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCL gastric lesions in the rats. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979;76:88-93
- 7 Konturek JW, Bielanski W, Konturek SJ, Bogdal J, Oleksy J. Distribution and release of epidermal growth factor in man. *Gut* 1989;30:1194-1200
- 8 贾赤宇,陈璧. EGF, TGFβ₁, 抗 TGFβ₁ 中和抗体对大鼠深度烫伤创面愈合的影响. 第四军医大学学报 1999;20:427-430
- 9 Brazozowski T, Konturek SJ, Majka J, Dembinski A, Drozdowicz D. Epidermal growth factor, Polyamines, and prostaglandins in healing of stress-induced gastric lesions in rats. *Dig Dis Sci* 1993;38:276-283
- 10 Kelly SM, Hunter JO. Epidermal growth factor stimulates synthesis and secretion of mucus glycoproteins in human gastric mucosa. *Clin Sci (Lond)* 1990;79:425-427
- 11 Reeves JR, Richards RC, Cooke T. The effects of intracolonic EGF on mucosal growth and experimental carcinogenesis. *Br J Cancer* 1991;63:223-226
- 12 Challacombe DN, Wheeler EE. Trophic action of epidermal growth factor on human duodenal mucosa cultured in vitro. *Gut* 1991;32:991-993
- 13 杨春梅,陈寿坡.表皮生长因子对大鼠胃黏膜的保护作用及机制探讨.中华消化杂志 1996;16:200-203
- 14 McIntosh CHS. Gastrointestinal somatostatin: Distribution, secretion and physiological significance. *Life Sciences* 1985;37:2043-2058
- 15 Corness JD, Demchysyn LL, Seeman P, Van Tol HH, Srikant CB, Kent G, Patel YC, Niznik HB. A human somatostatin receptor (SSTR3), Located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptide. *FEBS Lett* 1993;321:279-284
- 16 陈元方, Yamada T. 胃肠肽类激素基础与临床. 第1版,北京.北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:257-266
- 17 冷恩仁,桂先勇,徐有奇,曹克荣,袁立功.胃十二指肠溃疡患者血浆生长抑素、胃泌素水平分析.第三军医大学学报 1991;13:387-388
- 18 黄跃,陈宏斌,林国伟,李剑英,张娅东,陈生兰,张明诚.胃黏膜组织激素与胃癌、消化性溃疡的相关性研究.胃肠病学和肝病杂志 2002;11:156-158
- 19 Konturek SJ, Brzozowski T, Dembinski A, Warzecha Z, Konturek PK, Yanaihara N. Interaction of growth hormone-releasing factor and somatostatin on ulcer healing and mucosal growth in rats:role of gastrin and epidermal growth factor. *Digestion* 1988;41:121-128
- 20 Pfeiffer A, Kromer W, Friemann J, Ruge M, Herawi M, Schatzl M, Schwegler U, May B, Schatz H. Muscarinic receptors in gastric mucosa are increased in peptic ulcer disease. *Gut* 1995;36:813-818
- 21 王承党,萧树东,莫剑忠,张德中.氩对实验性胃溃疡大鼠胃黏膜生长抑素受体表达的影响.中华消化杂志 1998;18:124-125

大鼠急性坏死性胰腺炎心肌组织中巯基物质的抗氧化作用

梁丕霞, 吕 栋, 李瑞军

梁丕霞, 吕栋, 李瑞军, 首都医科大学附属北京天坛医院消化内科
北京市 100050
项目负责人: 梁丕霞, 100050, 北京市天坛西里6号院, 都医科大学附属北京天坛医院消化内科. liangpixia@Medmail.com.cn
电话: 010-67016611-2359
收稿日期: 2004-03-26 接受日期: 2004-04-15

摘要

目的: 探讨巯基物质在急性坏死性胰腺炎(ANP)时在心肌组织中抗氧化作用.

方法: 大鼠随机分为A组生理盐水组; B组巯基物质处理组; C组假手术组. 各组大鼠检测心肌组织内过氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量; 观察光镜下胰腺组织、电镜下心肌组织形态学改变.

结果: B组心肌组织SOD含量明显低于C组(分别于4、6、12 h的 50.3 ± 9.6 、 57.2 ± 9.1 、 62.4 ± 7.3 比 83.1 ± 8.6 、 82.4 ± 9.4 、 82.6 ± 9.2 , $P < 0.01$), 高于A组(37.3 ± 5.6 、 41.3 ± 7.1 、 44.5 ± 8.0 , $P < 0.05$); B组心肌组织丙二醛含量均明显高于C组(分别于4、6、12 h的 1.0256 ± 0.0325 、 0.7956 ± 0.0351 、 0.6012 ± 0.0415 比 0.3171 ± 0.0632 、 0.2951 ± 0.0265 、 0.3025 ± 0.0712 , $P < 0.01$), 低于A组(1.5126 ± 0.1032 、 1.3025 ± 0.0856 、 0.9213 ± 0.0578 , $P < 0.05$); B组胰腺组织及心肌组织病理改变较A组减轻, 腹水量亦少于A组.

结论: ANP时心肌组织SOD减少, MDA含量增加明显; 在ANP时外源性巯基物质可作为氧自由基清除剂在减轻心肌组织氧化应激反应中发挥作用.

梁丕霞, 吕栋, 李瑞军. 大鼠急性坏死性胰腺炎心肌组织中巯基物质的抗氧化作用. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1724-1725

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1724.asp>

0 引言

急性坏死性胰腺炎是临床常见危重病, 常伴有心、脑、肺、肾等多器官损害, 其死亡率高. 胰腺炎的发病机制是胰蛋白酶、氧自由基、炎性递质等多因素共同参与的, 氧自由基对急性胰腺炎时胰腺细胞的损伤作用相当重要, 巯基物质做为氧自由基清除剂可保护胰腺细胞免受氧自由基的损伤, 减轻胰腺病变. 胰腺炎时心肌细胞同样可受到损伤, 但心肌损伤与氧自由基、巯基物质有无内在联系目前研究尚少, 本研究旨在探讨巯基物质(硫普罗宁)在急性坏死性胰腺炎时, 作为氧自由基清除剂在减轻心肌组织氧化应激反应中发挥的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠, 质量250-300 g, 由首都医科大学动物中心提供. 牛磺胆酸钠购自美国Sigma公司. 注射用硫普罗宁(商品名凯西莱)由新谊药业股份有限公司生产. 低温高速离心机(3 000 r/min)、7 220分光光度仪、低温冰箱、恒温水浴箱、组织匀浆机由北京神经外科研究所提供. 采用传统的Aho^[1]逆行胰胆管注射诱导模型. 实验前, 大鼠禁食12 h, 自由饮水. 100 mg/L水合氯醛ip麻醉(4 mL/kg). 经上腹正中切口进入腹腔, 用微量注射泵以2.4 mL/h恒定速度逆行由胰胆管末端向胰胆管内注射50 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg).

1.2 方法 将81只大鼠随机分为3组, 每组27只. A组急性坏死性胰腺炎生理盐水组; B组急性坏死性胰腺炎巯基物质(硫普罗宁)处理组; C组正常对照组(假手术组). 其中B组在诱发ANP前1 h及30 min, 术后30 min硫普罗宁(300 mg/kg)sc; A组用等量生理盐水替代. 各组动物模型分别在诱发ANP后4、6、12 h后处死. 胰头部分送光镜检查; 将心肌组织1 mm³放入20 g/L戊二醛固定液中送电镜检查; 其余心肌组织取3 mm×3 mm迅速在低温下制备成组织匀浆, 用高速离心机离心10 min, 取上清液放入低温冰箱中保存(0℃冰箱可保存24 h)待测过氧化物歧化酶活力(黄嘌呤氧化酶法, 单位kNU/g)和丙二醛(硫代巴比妥酸法, 单位umoL/g)含量.

统计学处理 SPSS统计软件对各组数据进行统计学处理. 各组数据结果以均数±标准差表示. 各组间及各时间点各数据进行配对t检验.

2 结果

A组胰腺组织4 h胰腺表面可见大小不一的出血灶, 腹腔内大量血性腹水, 腺小叶结构凌乱实质中大片出血坏死灶, 间质中可见炎性细胞浸润; 6 h后胰腺表面及大网膜表面出现皂化灶, 胰腺组织病变严重, 间质中可见较多炎性细胞浸润; 12 h皂化灶增加, 钙化明显, 炎性细胞浸润进一步加重. B组胰腺组织改变4、6、12 h与A组比较有所减轻, 腹水量比A组少, 胰腺组织病变、腺小叶结构改变及出血坏死灶比A组减轻, 且坏死灶多为小灶性坏死, 间质中炎性细胞浸润减少, C组为正常胰腺组织. 电镜下A组4 h心肌组织少量线粒体嵴模糊, 肌纤维溶解不明显; 6 h线粒体增多、变性, 嵴电子密度增高, 肌纤维断裂或纤维间距增宽; 12 h线粒体增多, 伴有肌丝断裂. B组4 h线粒体结构大致正常, 肌纤维大致正常; 6 h线粒体结构尚清晰, 固缩变性少, 嵴相对增多, 肌纤维间隙增宽部分溶解; 12 h线粒体增

生, 嵴结构尚正常, 肌纤维未见明显溶解; C组正常心肌组织结构。

2.1 心肌组织过氧化物歧化酶活力 A, B两组于各时间点均明显低于C组($P < 0.01$); B组明显高于A组($P < 0.05$, 表1)。

表1 心肌组织过氧化物歧化酶活力变化(mean \pm SD, k NU/g, $n=27$)

分组	4	6	12
A(胰腺炎)	37.3 \pm 5.6 ^b	41.3 \pm 7.1 ^b	44.5 \pm 8.0 ^b
B(凯西莱)	50.3 \pm 9.6 ^{ba}	57.2 \pm 9.1 ^{ba}	62.4 \pm 7.3 ^{ba}
C(对照)	83.1 \pm 8.6	82.4 \pm 9.4	82.6 \pm 9.2

^b $P < 0.01$, 比C组; ^a $P < 0.05$, 比A组。

2.2 心肌组织丙二醛含量 A, B两组于各时间点均明显高于C组($P < 0.01$); B组明显低于A组($P < 0.05$, 表2)。

表2 心肌组织丙二醛含量变化 (mean \pm SD, $\mu\text{mol/g}$, $n=27$)

分组别	4	6	12
A(胰腺炎)	1.5 126 \pm 0.1 032 ^b	1.3 025 \pm 0.0 856 ^b	0.9 213 \pm 0.0 578 ^b
B(凯西莱)	1.0 256 \pm 0.0 325 ^{ba}	0.7 956 \pm 0.0 351 ^{ba}	0.6 012 \pm 0.0 415 ^{ba}
C(对照)	0.3 171 \pm 0.0 632	0.2 951 \pm 0.0 265	0.3 025 \pm 0.0 712

^a $P < 0.05$, 比A组; ^b $P < 0.01$, 比C组。

3 讨论

急性胰腺炎(AP)是临床常见急症之一^[2-4], 尤其是急性出血坏死性胰腺炎(ANP)临床表现危重, 死亡率^[5-6]。近年来, 急性胰腺炎合并其他脏器损伤的研究^[7]以及抗氧化剂在急性胰腺炎时发挥的作用受到人们的重视^[8]。

急性胰腺炎时可出现不同程度的心血管并发症, 轻者心率增快、心功能不全, 重者可出现室颤、心跳骤停、心梗等严重并发症。急性胰腺炎时产生心肌损伤的机制尚不完全清楚, 急性胰腺炎时胰腺组织中MDA浓度明显升高, SOD活性明显减低^[9], 血浆中MDA浓度明显升高, SOD活性明显减低, 氧自由基参与了ANP的病变, 与多器官损伤的严重程度呈正相关^[10]。心肌组织中SOD活性及MDA浓度变化报道甚少。本研究证实, ANP可导致的心肌损伤, 表现为心肌细胞线粒体变性, 嵴电子密度增高, 肌纤维断裂或纤维间距增宽; ANP时心肌组织中SOD活性明显减低, MDA浓度增高。预先给予外源巯基物质(硫普罗宁)可以使这种改变

减轻; 光镜下胰腺的病理变化及电镜下心肌组织的病理变化均明显减轻。巯基物质(硫普罗宁)是一种含有游离巯基的甘氨酸衍生物, 被广泛应用于各种肝脏疾病、放化疗术后。巯基物质是体内一种重要的氧自由基清除剂, 应用他可通过清除氧自由基来治疗急性胰腺炎^[11]。本研究中可见, 预先使用巯基药物的B组, 可减轻ANP时胰腺组织和心肌组织的氧化应激反应, 病理检查可见胰腺和心肌组织损伤明显减轻, 心肌组织中具有特异性清除超氧阴离子自由基的SOD活性较A组增加, 氧自由基攻击肺细胞膜产生的终末产物MDA含量较A组明显减低, 细胞损伤及炎症有所减轻。使用巯基药物-硫普罗宁作为氧自由基清除剂可减轻胰腺和心肌组织的损伤。

总之, ANP时氧自由基对胰腺细胞损伤的同时也可导致心肌损伤, 预先使用硫普罗宁, 可使ANP时腹水量明显减少; 保护胰腺细胞的同时保护心肌组织; 为巯基物质在ANP中应用, 以保护胰腺细胞的同时保护心肌组织, 预防和治疗ANP时合并的器官损伤建立新的思路提供依据。

4 参考文献

- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in rats. Sodium Taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:411-416
- Slavin J, Ghaneh P, Sutton R, Hartley M, Rowlands P, Garvey C, Hughes M, Neoptolemos J. Management of necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2001;7:476-481
- Mao EQ, Tang YQ, Zhang SD. Effects of time interval for hemofiltration on the prognosis of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:373-376
- 金世龙, 候庆福, 顾红光, 王仁云, 廖维健. 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎120例. *世界华人消化杂志* 2003;11:494-496
- 夏时海, 全金梅, 乔爱军, 张伟龙, 任万英, 郭萍, 赵晓曼. 生长抑素衍生物善宁加倍剂量治疗重症急性胰腺炎的疗效研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1157-1161
- Wang H, Li WQ, Zhou W, Li N, Li JS. Clinical effects of continuous high volume hemofiltration on severe acute pancreatitis complicated with multiple organ dysfunction syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:2096-2099
- 谷俊朝, 秦兆寅, 王宇. 实验性大鼠急性坏死性胰腺炎合并肺损害TXA₂, PGI₂的变化. *世界华人消化杂志* 1999;7:275
- 谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 袁海锋. 抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子- κ B和一氧化氮合酶的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:711-713
- Dabrowski A, Chwiecko M. Oxygen radicals mediate depletion of pancreatic sulfhydryl compounds in rats with erulein-induced acute pancreatitis. *Digestion* 1990;47:15-19
- 王万祥, 赵海平, 寿乃延, 杨成旺. 氧自由基等相关递质与急性坏死性胰腺炎的关系. *华人消化杂志* 1998;6(特刊7):480-481
- 张在兴, 孙家邦, 李非, 张淑文, 崔叶青, 孙海晨, 刘爽. 一氧化氮胰腺保护作用与巯基物质和氧自由基的关系. *中华外科杂志* 2000;38:928-930

结直肠癌患者血清 p53 抗体检测的意义

张宏, 丛进春, 陈春生, 乔雷, 苏琪, 冯勇, 刘恩卿

张宏, 丛进春, 陈春生, 乔雷, 苏琪, 冯勇, 刘恩卿, 中国医科大学附属第二医院普外科 辽宁省沈阳市 110004
 项目负责人: 张宏, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院普外科. zhanghong1203@yahoo.com.cn
 电话: 024-83955074 传真: 024-23896876
 收稿日期: 2004-03-11 接受日期: 2004-04-05

摘要

目的: 通过对结直肠癌患者血清 p53 抗体的检测, 分析其与临床病理特征的关系, 探讨其作为一种新的肿瘤标志物的临床意义。

方法: 选择 2002-04/2003-01 手术治疗的结直肠癌患者 132 例和同期非肿瘤患者 36 例为研究对象。用 ELISA 法定性检测血清 p53 抗体。

结果: 结直肠癌组中 53 例(40.2%)血清 p53 抗体阳性, 而对照组仅 1 例(2.9%)阳性。血清 p53 抗体与患者的性别, 年龄, 肿瘤位置及大小无关, 其阳性率在高分化腺癌为 17%, 中分化腺癌为 42%, 低分化腺癌为 64% ($P=0.0007$)。肝脏转移患者的血清 p53 抗体阳性率显著高于无肝转移患者 (75% vs 37%, $P=0.0098$)。发生淋巴结转移的患者, 血清 p53 抗体阳性率为 52%, 而没有淋巴结转移患者的阳性率为 33% ($P=0.0261$)。在不同的 Dukes 分期中, 血清 p53 抗体的阳性率分别为 A 期 14%, B 期 30%, C 期 44%, D 期 78% ($P=0.0013$)。

结论: 血清 p53 抗体可以反映结直肠癌的恶性生物学行为, 有助于临床判定病情, 监测疗效。

张宏, 丛进春, 陈春生, 乔雷, 苏琪, 冯勇, 刘恩卿. 结直肠癌患者血清 p53 抗体检测的意义. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1726-1727
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1726.asp>

0 引言

结直肠癌发生 P53 基因突变者 60-70%, 而且突变频率与肿瘤的恶性生物学行为相关。血清 p53 抗体与 p53 基因突变显著相关, 从而开辟了检测 p53 基因突变的新途径^[1-3]。而且血清学检测 p53 抗体这一方法还具有取材方便, 性质稳定, 操作简便的优点, 更受到众多学者的瞩目。我们通过对结直肠癌患者血清 p53 抗体的定性检测, 分析其与临床病理特征的关系, 探讨其作为一种新的肿瘤标志物的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-04/2003-01 手术治疗结直肠癌患者 132 例和同期非肿瘤患者 36 例。结直肠癌组平均年龄

64.8(32-87)岁, 男 74 例, 女 58 例。右半结肠癌 43 例, 左半结肠癌 33 例, 直肠癌 56 例。所有病例术前未采取化疗和/或放疗, 术后经病理组织学检查证实诊断。其中高分化腺癌 35 例, 中分化腺癌 69 例, 低分化腺癌 28 例。Dukes A 期 7 例, B 期 64 例, C 期 43 例, D 期 18 例。对照组平均年龄 65.3(33-75)岁, 男 19 例, 女 17 例。急性阑尾炎 9 例, 腹股沟疝 11 例, 腹部闭和伤 7 例, 单纯性下肢静脉曲张 3 例, 混合痔 6 例。

1.2 方法 术前 1 h 采取外周静脉血 10 mL, 室温静置 30 min, 4℃ 下 1 500 r/min 离心 10 min, 取上清放置 -80℃ 冰箱保存备用。血清 p53 抗体 ELISA 试剂盒为德国 Dianova 公司生产(购于 Cosmobio 公司), 严格按照说明书的要求操作。p53 抗体效价指数(titre index)大于 10% 为阳性。

统计学处理 计量指标用 t 检验, 计数指标用 mean±SD 检验。所有统计分析用 Statview version 5.0.1 (SAS institute Inc 产品) 统计软件处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血清 p53 抗体阳性率 在 132 例结直肠癌患者中 53 例(40.2%)血清 p53 抗体呈阳性, 而对照组仅 1 例(2.9%)阳性, 两组间有显著的差异 ($P < 0.0001$)。

2.2 p53 抗体与结直肠癌临床病理特征 血清 p53 抗体的出现与结直肠癌患者的年龄, 性别及肿瘤的大小、位置、大体形态无关, 而与肿瘤的分化程度, 有无肝脏转移或淋巴结转移及 Dukes 分期有关(表 1)。血清 p53 抗体的阳性率在高分化腺癌为 17%, 中分化腺癌为 42%, 低分化腺癌为 64% ($P=0.0007$)。在发生肝脏转移的患者, 血清 p53 抗体的阳性率为 75%, 而没有肝脏转移的患者中阳性率为 37%。统计学显示有显著差异 ($P=0.0098$)。在淋巴结转移的患者, 血清 p53 抗体的阳性率为 52%, 而在没有淋巴结转移的患者中阳性率为 33% ($P=0.0261$)。在不同的 Dukes 分期中, 血清 p53 抗体的阳性率分别为 A 期 14%, B 期 30%, C 期 44%, D 期 78%, 差异有显著性 ($P=0.0013$)。

表 1 结直肠癌血清 p53 抗体与临床病理特征

	p53 抗体阴性 <i>n</i> = 79 (59.8%)	p53 抗体阳性 <i>n</i> = 53(40.2%)	阳性率
年龄 (岁)	64.3 ± 10.3	65.5 ± 9.2	
男	42	32	43%
女	37	21	36%
肿瘤大小 (mm)	43.4 ± 10.4	44.3 ± 11.8	
肿块型	14	11	44%

溃疡型	48	23	32%
浸润型	17	19	53%
右半结肠	27	16	37%
左半结肠	20	13	39%
直肠	32	24	43%
高分化腺癌	29	6	17%
中分化腺癌	40	29	42% ^b
低分化腺癌	10	18	64%
肝脏转移 阴性	76	44	37%
肝脏转移 阳性	3	9	75% ^b
淋巴结转移 阴性	54	26	33%
淋巴结转移 阳性	25	27	52% ^a
Dukes A 期	6	1	14%
B 期	45	19	30%
C 期	24	19	44% ^b
D 期	4	14	78%

^aP < 0.05, ^bP < 0.01.

3 讨论

血清p53抗体是突变型p53蛋白激发人体免疫系统产生的免疫反应产物。由于p53基因错义突变而产生的突变型p53蛋白半衰期明显延长,导致其在细胞内蓄积,机体对这一非正常蛋白的免疫耐受丧失,而产生p53抗体。此外,人们发现血清p53抗体的产生还依赖于突变型p53蛋白与热休克蛋白70家族成员(HSP70)的结合。P53/HSP70复合物可作为靶抗原激发机体的自身免疫应答,产生p53抗体。p53抗体多数属于IgG,少数属于IgM。而且理化性质非常稳定,在-80℃长期保存,对抗体活性几乎无影响。这一良好的特性使其便于临床应用。血清p53抗体的阳性率在结直肠癌患者中为23-68%^[4-7],在健康人群为1-4%^[5,7-8]。我们研究显示血清p53抗体在结直肠癌中的阳性率为40.2%,在对照组的非肿瘤患者中为2.9%。这一结果充分说明血清p53抗体和结直肠癌有显著的相关性,可以作为诊断的辅助指标之一。

血清p53抗体的阳性率在肿瘤细胞组织分化程度低、伴有肝脏转移或淋巴结转移的患者中显著升高,并且与Dukes分期的进展成正相关。我们发现血清p53抗体在结直肠癌Dukes分期的各个阶段均可出现。其中在A期的阳性率为14%,B期的阳性率为30%,并且随分期的进展,阳性率呈升高趋势。这说明血清p53抗体的出现是结直肠癌的一种不良生物学特征,表明肿瘤具有更大的恶性度和侵袭性。Houbiers et al^[9]也认为血清

p53抗体与肿瘤细胞分化程度,肿瘤形态,侵袭血管等恶性生物学行为有关。Kressner et al^[10]认为血清p53抗体是独立的预后因素,术前血清p53抗体水平升高的患者生存期明显缩短。因此我们主张对于术前血清p53抗体阳性的患者,应在手术切除后采取辅助性治疗来改善预后。

总之,我们认为血清p53抗体可以反应结直肠癌的恶性生物学特征,从而有助于临床判定病情,指导治疗,监测疗效。相信随着对其研究的不断深入,血清p53抗体的应用将会有更广阔的前景。

4 参考文献

- Hammel P, Soussi T. Serum p53 antibody assay: Evaluation in colorectal cancer. *Rev Med Interne* 2000;21:167-173
- Broll R, Duchrow M, Oevermann E, Wellm C, Schwandner O, Schimmelpennig H, Roblick UJ, Bruch HP, Windhovel U. P53 autoantibodies in sera of patients with a colorectal cancer and their association to p53 protein concentration and p53 immunohistochemistry in tumor tissue. *Int J Colorectal Dis* 2001;16:22-27
- Takeda A, Shimada H, Nakajima K, Imaseki H, Suzuki T, Asano T, Ochiai T, Isono K. Monitoring of p53 autoantibodies after resection of colorectal cancer: Relationship to operative curability. *Eur J Surg* 2001;167:50-53
- Shiota G, Ishida M, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Okubo M, Katayama S, Tomie Y, Harada K, Hori K, Ashida K, Kishimoto Y, Hosoda A, Suou T, Kanbe T, Tanaka K, Nosaka K, Tanida O, Kojo H, Miura K, Ito H, Kaibara N, Kawasaki H. Circulating p53 antibody in patients with colorectal cancer. Relation to clinicopathologic features and survival. *Dig Dis Sci* 2000;45:122-128
- Takeda A, Shimada H, Nakajima K, Yoshimura S, Suzuki T, Asano T, Ochiai T, Isono K. Serum p53 antibody as a useful marker for monitoring of treatment of superficial colorectal adenocarcinoma after endoscopic resection. *Int J Clin Oncol* 2001;6:45-49
- Takeda A, Shimada H, Nakajima K, Imaseki H, Okazumi S, Takayama W, Hayashi H, Iwasaki K, Sasagawa S, Chou A, Natsume T, Kouno T, Kondou S, Maeda T, Hori S, Suzuki T, Ochiai T, Isono K. Detection of serum P53 antibodies in colorectal cancer patients and the clinical significance of post-operative monitoring. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999;26:2189-2194
- Shibata Y, Kotanagi H, Andoh H, Koyama K, Itoh H, Kudo S. Detection of circulating anti-p53 antibodies in patients with colorectal carcinoma and the antibody's relation to clinical factors. *Dis Colon Rectum* 1996;39:1269-1274
- Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJ, Kellen JA, Bunting PS. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int J Cancer* 1994;58:480-487
- Houbiers JG, van der Burg SH, van de Watering LM, Tollenaar RA, Brand A, van de Velde CJ, Melief CJ. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995;72:637-641
- Kressner U, Glimelius B, Bergstrom R, Pahlman L, Larsson A, Lindmark G. Increased serum p53 antibody levels indicate poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1848-1851

血管内皮生长因子和淋巴结微转移检测与老年胃癌预后的关系

栾复新, 王孟薇, 于国, 吕亚莉, 钟梅

栾复新, 王孟薇, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
于国, 吕亚莉, 钟梅, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853
项目负责人: 栾复新, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院南楼消化科.
电话: 010-66936595 传真: 010-66936595
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-02-24

摘要

目的: 研究老年胃癌术前活检标本血管内皮生长因子(VEGF)表达和术后淋巴结微转移的检测与老年胃癌预后的关系。

方法: 采用免疫组化法检测了92例老年胃癌VEGF和67例pN0胃癌淋巴结微转移的表达情况, 并分析他们与胃癌临床病理因素的关系及对预后的影响。

结果: VEGF蛋白阳性表达率为66.7%, 淋巴结微转移阳性率为37.3%, 且二者表达呈正相关($P < 0.05$)。VEGF蛋白表达水平与肿瘤大小、组织分化程度、浸润深度、血管癌栓、淋巴结转移及TNM分期密切相关($P < 0.01$), 淋巴结微转移与组织分化程度、浸润深度、TNM分期呈正相关($P < 0.01$)。VEGF、淋巴结微转移的表达和胃癌预后呈负相关($P < 0.01$)。

结论: VEGF表达和淋巴结微转移呈正相关, 二者与胃癌生长、浸润转移关系密切, 可作为估计老年胃癌预后的重要因素。

栾复新, 王孟薇, 于国, 吕亚莉, 钟梅. 血管内皮生长因子和淋巴结微转移检测与老年胃癌预后的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1728-1730
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1728.asp>

0 引言

胃癌淋巴结微转移(lymph node micrometastasis, LNM)是指常规HE染色未检测出的胃周淋巴结转移, 可能是导致胃癌术后复发和转移的主要原因. 新近研究表明许多肿瘤存在新生淋巴管机制, 血管内皮生长因子(VEGF)是重要的促淋巴管生成因子, 与胃癌淋巴结转移和预后密切相关. 据此, 我们检测了老年胃癌VEGF和LNM表达情况, 以探讨二者之间关系及对老年胃癌预后的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院南楼1984/2002年手术切除的老年胃癌术前活检标本92例, 早期胃癌50例, 进展期胃癌42例. 其中男87例, 女5例, 60-69岁38例, 70-79岁46例, >80岁8例, 平均(70.8 ± 7.0岁). 术后根据1997年国际抗癌联盟和美国癌症联合会修订标准, 进行临床分期, 同时选择pN0 67例(早癌46例, 进展

期癌21例)患者所切除的423枚淋巴结作为LNM检测标本, 随访时间14-210 mo, 所有病例已除外死于心脏病、肺炎或合并有其他肿瘤.另取慢性萎缩性胃炎30例作为对照。

1.2 方法 选择92例胃癌活检标本及67例阴性淋巴结石蜡包埋块, 进行4 μm连续切片, 用抗VEGF单抗(中山公司, 工作浓度1:50)进行VEGF染色. 用抗CK20单抗(中山公司, 工作浓度1:100)进行微转移检测. 本实验采用免疫组化二步法. 免疫组化染色法结果判定: VEGF以细胞质上出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 高倍镜下观察4个不同视野并计数200个癌细胞, 按阳性细胞所占的百分率分为三级, 阳性细胞<10%为(-), 阳性细胞10-50%为(+), >50%为(++). CK-20表达产物呈棕黄色颗粒, 定位于细胞质或细胞膜上, 多位于淋巴结包膜下间隙或淋巴窦内, 有时呈单个散在和2-3个及数个聚集成小团状癌细胞。

统计学处理 使用Excel2000建立数据库, Stata7.0进行统计分析, 有序变量采用非参数Wilcoxon秩和检验, 分类变量采用Person χ^2 和McNemar检验, 生存曲线采用Kaplan-meier估计法分析。

2 结果

2.1 VEGF、LNM在胃癌组织中表达 VEGF在进展期癌、早癌、慢性萎缩性胃炎表达的阳性率分别为80%、56%、16.7%, 三者均有显著性差异($P < 0.01$). 67例胃癌(pN0)中, 有淋巴微转移者35例(37.3%), 423枚阴性淋巴结中共检出微转移淋巴结34枚(8%), 其中46例早癌238枚淋巴结检出12例(26.1%)、14枚(6%), 21例进展期癌185枚淋巴结检出13例(61.9%), 20枚(10%)。

2.2 VEGF、LNM的表达与临床病理因素关系 VEGF、LNM表达与组织分化程度、浸润深度、TNM分期呈正相关($P < 0.01$), 二者的表达均与年龄、肿瘤部位无关(表1)。

2.3 VEGF、LNM表达与胃癌预后 1984/2002年19 a间手术切除胃癌92例, 死亡21例. VEGF阴性30例, 死亡2例, VEGF阳性(+)表达35例, 死亡6例, 强阳性(++)表达27例, 死亡13例, 差别有显著意义($P = 0.006$). 根据Kaplan-meier曲线估计, VEGF阳性组5 a、10 a生存率分别为68.3%、37.5%, 明显低于VEGF阴性组的100%、87.7%($P < 0.01$). pN0 67例胃癌中, 19 a死亡6例. 淋巴结微转移阴性者无1例死亡, 淋巴结微转移阳性者死亡6例, 差异有显著性($P = 0.009$). 根据Kaplan-meier曲线估计, 微转移阳性者5 a、10 a生

表1 VEGF、淋巴结微转移与临床病理因素关系

临床病理因素	VEGF			P	淋巴结微转移		P
	-	+	++		-	+	
年龄							
69	16	12	10	>0.05	17	10	>0.05
> 70	14	23	17		25	15	
肿瘤大小							
5	29	27	15	<0.01	40	22	>0.05
> 5	1	8	12		2	3	
组织分化							
癌变	5	1	0	<0.01	5	1	<0.01
高分化	12	9	1		19	2	
中分化	3	6	7		8	4	
低分化	10	19	19		10	18	
浸润深度							
黏膜	18	11	2	<0.01	26	4	<0.01
黏膜下	4	11	4		9	7	
肌层	5	3	2		6	4	
浆膜	1	2	3		1	1	
全层	2	8	16		2	7	
血管癌栓							
无	30	33	18	<0.01	42	24	>0.05
有	0	3	8		0	1	
TNM 分期							
0	14	10	1	<0.01	22	2	<0.01
	11	14	5		14	15	
	3	3	0		4	2	
	2	4	2		2	5	
	0	4	19		0	1	

存率分别为 91.6%、42.6%，而微转移阴性者 5 a、10 a 生存率为 100%、100%，差异有显著性($P < 0.01$)。

2.4 VEGF、LNM 相关性分析 VEGF 蛋白表达水平与 LNM 的检测结果呈高度正相关(一致性 $\chi^2=5.33$, $P=0.02$)。

3 讨论

胃癌的浸润和转移是造成胃癌死亡的主要原因，而血管生成则是恶性肿瘤生长和转移的基础，VEGF 是调控血管生成的主要因素。研究表明，血清 VEGF 高表达与胃癌侵袭和转移有关^[1-2]，术前活检标本和术后大体标本 VEGF 检测是胃癌术后复发有用指标^[3-4]。Minato et al^[5] 检测了 35 例老年(平均 72 岁)和 35 例中青年(平均 52 岁) VEGF 表达情况。结果发现 VEGF 表达在老年组与浆膜外侵、远处转移等临床病理因素密切相关，而在中青年组 VEGF 表达与临床病理因素无关，因而认为 VEGF 是与年龄有关的一种促血管生成因子，对判断老年胃癌预后具有重要意义。本研究发现 VEGF 可在慢性萎缩性胃炎中表达，但一般水平较低，在老年早癌表达率为

56%，随着胃癌临床分期递增而呈明显上调表达，进展期癌阳性率高达 80%。VEGF 在老年胃癌中高表达，与老年人缺血、缺氧，从而触发了大量的 VEGF 分泌有关^[6]。我们同时发现 VEGF 阳性表达与胃癌淋巴结转移、血管癌栓呈正相关，总体生存率也低于 VEGF 阴性组，提示 VEGF 可通过促进新生血管形成，刺激细胞外基质降解而使胃癌组织呈侵袭性生长，从而继发局部浸润和远处转移，VEGF 高表达是老年胃癌预后不良的有用指标。VEGF 结合 p53、bFGF、NO 等表达，可更准确的判断胃癌预后^[6-7]。

淋巴结转移是胃癌患者重要的预后因素之一，常规病理检查易发生遗漏，连续病理切片可提高微转移的检出率，由于连续切片工作量大，在临床上很难推广应用，免疫组化 CK 法可提高淋巴结微转移的检出率。Fukagawa et al^[8] 采用免疫组化 CK 法检测了 107 例 T₂N₀M₀ 胃癌 4 484 枚淋巴结，结果 35.3% 的患者、1.94% 的淋巴结有微转移。Kikuchi et al^[9] 报道阳性率更高，常规检查未发现淋巴结转移的 T₂N₀、T₃T₄N₀ 期患者，免

疫组化发现淋巴结微转移高达 33.3%、75%。我们资料表明,患者微转移率为 37.3%,淋巴结微转移率为 8%,与国外报道相仿。我们观察到淋巴结微转移位于淋巴结包膜下窦,而且与淋巴管侵犯密切相关,提示微转移可能是胃癌淋巴结转移进程中早期事件。通常认为淋巴结转移与肿瘤侵犯深度有关,本组资料表明微转移也符合这个规律,随着癌肿向深部侵犯时微转移的发生大幅度提高。低分化腺癌、印戒细胞癌的淋巴结微转移的阳性率也高,说明了弥漫性胃癌患者更易发生淋巴结微转移,与国内外报道相似^[10-11]。目前对于恶性肿瘤淋巴结微转移的临床意义仍有不同看法, Lee et al^[12]报道,淋巴结微转移的 5 a 生存率为 49%,无淋巴结微转移者为 76%($P < 0.01$),是预后的一项独立因素。Yasuda et al^[13]报道预后与淋巴结微转移数目有关, T₂T₀, T₃N₀ 期 64 例胃癌检测表明,有淋巴结微转移 5 a 生存率 66%,无转移者为 95%($P < 0.01$),微转移淋巴结 4 个以上时, 5 a 生存率明显降至 29%($P < 0.01$)。我们资料也支持淋巴结微转移与患者预后密切相关,有微转移的患者肿瘤易复发, 10 a 生存率仅为 42.6%,而无微转移的患者 10 a 生存率为 100%。有微转移的患者预后差,其原因可能在手术时就有微转移的发生,而常规检查不能发现,导致术后复发。

新近研究表明许多肿瘤存在新生淋巴管机制, VEGF-3 分布于淋巴内皮表面,可调节肿瘤淋巴管生成,胃癌细胞表达的 VEGF-3 对癌细胞向淋巴结转移起了促进作用^[14-15]。我们资料表明, VEGF 表达与淋巴结微转移密切相关,表达有明显一致性,也证实了上述观点。因此,活检标本 VEGF 检测可在术前预测淋巴结微转移, VEGF 阳性患者在术中要尽可能寻找更多淋巴结,这样有可能减少老年胃癌的复发率。术后淋巴结微转移检测,提高了诊断胃癌淋巴结转移的准确性,使得该疾病的临床病理分期及预后的评价更具科学性,同时也为术后的辅助治疗提供依据,由于淋巴结的癌转移灶对化疗药物敏感,对检出淋巴结微转移的病例,术后应积极给予化疗等措施以降低肿瘤复发率。

4 参考文献

- 1 Keyes KA, Mann L, Cox K, Treaday P, Iversen P, Chen YF, Teicher BA. Circulating angiogenic growth factor levels in mice bearing human tumors using Luminex multiplex technology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:321-327

- 2 张宏图, 胡祥. 血清中血管内皮生长因子与胃癌侵袭和转移的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:344-345
- 3 Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Kato Y, Sawada T, Chung KH. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative biopsy specimens correlates with diseases recurrence in patients with early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86:566-571
- 4 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1421-1426
- 5 Minato E, Miki C, Tanaka K, Kobayashi M, Mohri Y, Tonouchi H, Kuribayashi K, Kusunoki M. Vascular endothelial growth factor as an age-dependent prognostic factor in gastric Cancer patients. *Am J Surg* 2002;184:460-464
- 6 段伦喜, 钟德午, 胡辅珍, 赵华, 杨竹林, 易文君, 舒国顺, 华颂文. 胃癌组织 VEGF, Fltl, bFGF, P⁵³ 表达与胃癌预后的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12:546-549
- 7 Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Crau JJ, Palacin A, Castells A, Volant A, Pera M. P⁵³ and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric Cancer. *Br J Cancer* 2004;90: 206-215
- 8 Fukagawa T, Sasako M, Mann GB, Sano T, Katai H, Maruyama K, Nakanishi Y, Shimoda T. Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;15:753-760
- 9 Kikuchi Y, Tsuchiya A, Ando Y, Yoshida T, Takenosita S. Immunohistochemical detection of lymph node microinvolvement in node-negative gastric cancer. *Gastric Cancer* 1999;2:173-178
- 10 Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer* 1997;19:1069-1076
- 11 夏加增, 朱正纲, 刘炳亚, 燕敏, 尹浩然. 免疫组化检测胃癌淋巴结微转移的意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1113-1116
- 12 Lee E, Chae Y, Kim I, Choi J, Yeom B, Leong AS. Prognostic relevance of immunohistochemically detected lymph node micrometastasis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94:2807-2873
- 13 Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Inomata M, Takeuchi H, Kitano S. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9:771-774
- 14 Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1823-1829
- 15 Duff SE, Li C, Jeziorska M, Kumar S, Saunders MP, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. *Br J Cancer* 2003;89:426-430

hMSH2 在胃癌组织中的表达及其与 DNA 甲基化之间的关系

程中华, 房静远, 杨 丽, 陈 紫, 陆 嵘, 朱红音, 顾伟齐, 陈晓宇, 彭延申, 施 尧

程中华, 房静远, 杨丽, 陈紫, 陆嵘, 朱红音, 顾伟齐, 陈晓宇, 彭延申, 施尧, 上海第二医科大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001 国家自然科学基金资助项目, No. 30170413
高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金资助, No. 199946
项目负责人: 房静远, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海第二医科大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com
电话: 021-62360930
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-04-05

摘要

目的: 分析胃癌组织中 DNA 甲基化酶 Dnmt1 和 hMSH2 表达情况的相关性及与肿瘤生物学行为之间的关系。

方法: 以 real-time RT-PCR 法检测 28 例胃癌组织中 Dnmt1 和 hMSH2 mRNA 的表达 亚硫酸氢钠变性后测序分析 hMSH2 启动子区甲基化状态。

结果: 在 28 例胃癌组织中有 9 例 (32%) DNMT1 mRNA 的高表达 10 例 hMSH2 (35.7%) 的低表达在 hMSH2 低表达的胃癌组织中有 2 例存在 DNA 启动子区的高甲基化。两个基因 mRNA 的表达与胃癌生物学行为包括肿瘤大小淋巴结转移 组织学类型均无明显相关性。

结论: 胃癌组织中存在 Dnmt1 的高表达 DNA 甲基化在一定程度上参与了 hMSH2 基因表达的缺失。

程中华, 房静远, 杨丽, 陈紫, 陆嵘, 朱红音, 顾伟齐, 陈晓宇, 彭延申, 施尧. hMSH2 在胃癌组织中的表达及其与 DNA 甲基化之间的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1731-1733

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1731.asp>

0 引言

肿瘤组织多有 DNA 甲基化的紊乱. DNA 甲基化由 DNA 甲基化酶 (DNA methyltransferase Dnmt) 催化 他能够将甲基供体提供的甲基集团转移至胞嘧啶 5 位碳上形成 5-甲基胞嘧啶. DNA 甲基化酶包括参与甲基化的形成 (Dnmt3a 和 Dnmt3b 的主要作用) 和维持 (主要是 Dnmt1) 两类酶. 人类 DNA 错配修复系统 (mismatch repair system MMR) 是由一系列特异性修复 DNA 碱基错配的酶分子组成 此系统的存在能避免遗传物质产生突变保证 DNA 复制的高保真度. hMSH2 是目前研究较广泛的 DNA 错配修复基因 他的失活可导致 DNA 错配修复能力的降低 引起微卫星不稳定性 (microsatellite instability MSI) 可使癌基因激活或抑癌基因失活诱发细胞癌变^[1]. 现已发现 癌发生过程中导致错配修复基因失活的另一方式为 DNA 甲基化的改变 这种改变常伴有错配修复基因表达的丢失^[2-3]. 目前对于 hMSH2 启动子甲基化情况的研究还较少. 我们研究了胃癌组织中 DNA 甲基

化酶 Dnmt1 和 hMSH2 表达情况的相关性及与肿瘤生物学行为之间的关系并进一步分析了 hMSH2 启动子区的甲基化状态。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-05/2002-07 组织学确诊为胃癌的手术患者 28 例 临床资料完整术前均未进行任何抗肿瘤治疗. 癌组织取自肿块中央非坏死部分癌旁组织取自距癌灶边缘 5 cm 以内的黏膜组织正常组织取自距肿块 10 cm 以上的正常黏膜组织. 所有标本均经本院两位高年资病理科医生证实. 患者平均年龄 58.4 岁. 行胃癌根治术 27 例 姑息性胃大部切除术 1 例. 病理类型: 溃疡性腺癌 6 例 浸润溃疡 15 例 弥漫浸润腺癌 7 例. 临床分期: 期 2 例 - 期 26 例. 淋巴结转移: 21 例存在淋巴结转移 7 例不存在.

1.2 方法 RNA 的提取和 cDNA 的合成见文献[4]. 定量 PCR 检测 Dnmt1 hMSH2 的表达方法见文献[4]. 具体引物和探针见表 1. hMSH2 DNA 亚硫酸氢钠变性后测序. DNA 经亚硫酸氢盐修饰能够使没有甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶后者在 PCR 扩增中以胸腺嘧啶形式扩增而原有甲基化的胞嘧啶则保持胞嘧啶不变. 处理步骤: 取 5 μ g DNA 加 NaOH 至终浓度为 0.2 mol/L 37 变性 10 min. 向变性 DNA 中加入新鲜配置的 10 mmol/L 的氰醌 30 μ l 及 3 mol/L 的亚硫酸氢钠 (pH=5) 520 μ l 加入矿物油 200 μ l. 样品于 50 孵育 16 min. 修饰后的 DNA 根据说明书用 Wizerd DNA 纯化树脂 (Promega) 纯化用 50 μ l 水洗脱. 加 5.5 μ l 3 mol/L NaOH 至洗脱液室温放置 5 min. 加 17 μ l 10 mol/L 的醋酸胺 1 μ l 的糖原及 500 μ l 的 95% 冰冷乙醇过夜. 14 000 r/min 4 离心 30 min 以 70% 乙醇洗沉淀物. 真空干燥加 20 μ l 水稀释. 处理后的 DNA 行潮式 PCR 基因 bank 号 AB006445 引物序列循环 1 为: 正义 5' -TGT TTA GAA AGA AAA AGG GA-3'; 反义 5' -AAA CCT CCT CAC CTC CT-3'. 循环 2 为: 正义 5' -AAA TAT TGG GAG GAG GAG GA-3'; 反义 5' -ACC CAC TAA ACT ATT TCC CA-3'. 产物片断 357 bp 位于第一外显子上游启动子 -32 -388. 两次 PCR 反应体系均为: 3 μ l MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ l dNTP (2.5 mmol/L) 10 pmol 上下游引物模板 2 μ l. 产物送上海申友生物科技公司测序.

统计学处理 *t* 检验 χ^2 检验 相关分析法。

2 结果

2.1 Dnmt1 与 hMSH2 mRNA 的表达 定量 RT-PCR 反

表1 定量PCR的引物和探针

Gene	正义引物 (5' - 3')	反义引物(5' - 3')	探针
β -actin	CTG GCA CCC AGC ACA GAT ATG	GGA CAG CGA GGC CGA	ATC ATT GCT CCT CCT GAG
Dnmt1	GCA CCT CAT TTG CCG AAT ACA	TCT CCT GCA TCA GCC CAA ATA	AGT CCC GAG TAT GCG C
HMSH2	ATC CAA GGA GAA TGA TTG GTA TTT G	CAA AGA GAA TGT CTT CAA ACT GAG AGA	CAT ATA AGG CTT CTC CTG GC

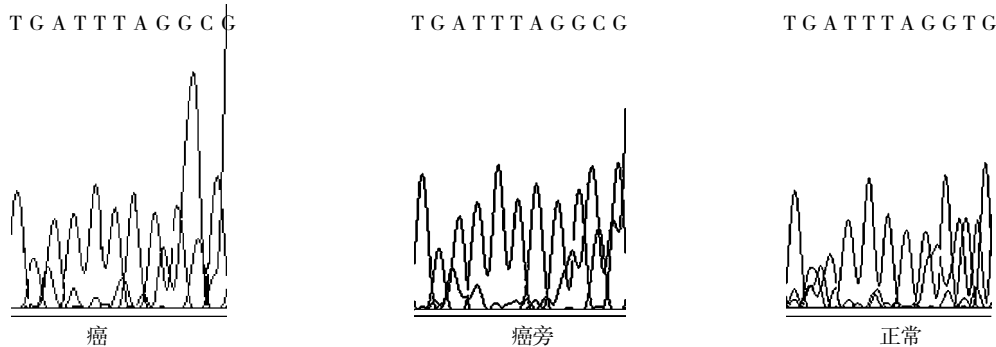


图1 hmsH2 测序结果.

应良好扩增符合要求. 28例胃癌组织中有9例(32%) Dnmt1高表达 10例(36%)不同程度的低表达; 癌组织平均Dnmt1为5.08-10.11 明显高于正常组织均值1 ($P=0.04$). hMSH2 10例(35.7%)低表达 3例(10.7%)高表达 其余无明显变化. 癌组织平均hMSH2为1.86-3.01 与正常组织无明显差异 ($P=0.14$). 在mRNA表达水平上 Dnmt1与hMSH2无显著相关性 ($P=0.53$).

2.2 hMSH2 亚硫酸氢钠测序 将10例hMSH2 mRNA低表达的样品DNA进行测序分析其启动子区甲基化情况. 用亚硫酸氢钠测序法可以检测到其中2例存在癌组织DNA启动子区的高甲基化. 测序结果见图1. 正常组织中单链DNA CpG中的未甲基化的胞嘧啶已被亚硫酸氢钠脱氨基而变成U U经PCR扩增后被T代替; 反之在癌和癌旁组织相应的甲基化序列中CpG二核苷酸中的胞嘧啶保持不变说明他们因甲基化而未被亚硫酸氢盐修饰而CpG二核苷酸以外的胞嘧啶由于未被甲基化都变成T(U).

2.3 Dnmt1 hmsH2与肿瘤生物学行为的关系 不但如我们前文所述^[4]Dnmt1转录水平与胃癌生物学行为不明确关系且hMSH2基因mRNA表达与肿瘤大小淋巴结转移组织学类型均无明显相关性.

3 讨论

基因不稳在胃癌的发生中起重要作用. 这种基因不稳可以分为二种不同的形式即染色体不稳和微卫星不稳. hMLH1和hMSH2是错配修复基因系统中最重要的成员. 胃癌hMLH1突变均发生在MSI阳性的癌组织但相当一部分MSI阳性胃癌组织并未发现hMLH1和

hMSH2基因的突变因此可能有其他机制参与了这种缺陷. 目前认为肿瘤发生过程中导致hMLH1失活的另一重要方式为DNA甲基化的改变这种改变可引起hMLH1表达的丢失^[5]. Dnmt1是体内最重要的DNA甲基化酶 他能维持DNA的甲基化修饰. 在癌细胞中Dnmt1基因表达升高往往先于高甲基化改变一般认为Dnmt1活性升高是癌组织的一个具有特征的早期分子改变. 很多肿瘤组织存在着不同程度的Dnmt1高表达^[6-7]. 但目前对于DNA甲基化是否能引起hMSH2表达缺失仍有异议^[8-9].

我们发现32的胃癌组织存在Dnmt1的高表达癌区Dnmt1的表达均值显著高于正常黏膜区 ($P=0.04$); Dnmt1的表达与肿瘤大小淋巴结转移组织学类型均无明显相关性. 这一结果与日本学者得到的结论相近^[10]. 同时我们还发现胃癌组织中的Dnmt1高表达以及DNA甲基化在一定程度上参与了hMSH2基因表达的缺失. 我们同时发现这两例存在hMSH2癌组织启动子高甲基化的病例其Dnmt1在mRNA的表达上并无明显变化我们猜测Dnmt1可能通过影响hMLH1而非hMSH2的甲基化状态从而导致微卫星不稳定并进一步参与了肿瘤的进程. 在本次实验中我们没有观察到Dnmt1和hMSH2与肿瘤各种生物学行为之间有相关性. 我们拟进一步研究DNA甲基化与微卫星不稳定之间的关系.

4 参考文献

- 1 Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, Chien HT, Hsieh LL. Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability-an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:841-846
- 2 Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J*

- Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 3 Kang GH, Lee S, Shim YH, Kim JC, Ro JY. Profile of methylated CpG sites of hMLH1 promoter in primary gastric carcinoma with microsatellite instability. *Pathol Int* 2002;52:764-768
 - 4 程中华, 房静远, 杨丽, 陈紫, 陆嵘, 陆娟, 朱红音, 顾伟齐. 人胃癌组织 DNA 甲基化酶去甲基化酶与肿瘤相关基因的表达. *中华消化杂志* 2004;24:203-206
 - 5 Sakata K, Tamura G, Endoh Y, Ohmura K, Ogata S, Motoyama T. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer* 2002;86:564-567
 - 6 Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bieche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:4415-4422
 - 7 Sato M, Horio Y, Sekido Y, Minna JD, Shimokata K, Hasegawa Y. The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 2002;21:4822-4829
 - 8 Kim HC, Kim CN, Yu CS, Roh SA, Kim JC. Methylation of the hMLH1 and hMSH2 promoter in early-onset sporadic colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:196-202
 - 9 Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Takahira T, Yamamoto H, Sakamoto A, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Possible association between tumor-suppressor gene mutations and hMSH2/hMLH1 inactivation in alveolar soft part sarcoma. *Hum Pathol* 2003;34:841-849
 - 10 Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer* 2001;91:205-212

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

• 研究快报 •

大鼠胃壁细胞的分离及纯化

李燕舞, 王建华, 王汝俊

李燕舞, 王建华, 王汝俊, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405
国家自然科学基金项目, No. 30271650
项目负责人: 王汝俊, 510405, 广东省广州市机场路 12 号, 广州中医药大学脾胃研究所.
电话: 020-36585555
收稿日期: 2004-03-11 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 建立和完善大鼠胃壁细胞分离和纯化的方法。

方法: 采用 Pronase-EDTA 酶消化法脱颈椎处死大鼠取胃制作翻转胃袋并注入消化酶溶液. 通过三步即消化-分散-纯化来完成大鼠胃壁细胞的游离和收集过程。

结果: 即时分离细胞经 HE 染色鉴别纯度达到 70% 活度经台盼兰排除实验鉴定可达到 90% 以上. 在 0-4 环境下 22 h 后细胞活度仍可达 70-80% 左右。

结论: 严格控制分离细胞操作的条件可获得较为稳定的实验结果. 包括细胞的活度和纯度。

李燕舞, 王建华, 王汝俊. 大鼠胃壁细胞的分离及纯化. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1733-1735

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1733.asp>

0 引言

壁细胞是胃底腺干细胞分化的一种终末细胞主要功能是分泌胃酸. 在一些种属包括人、猴子、兔、猫、豚鼠、牛等. 壁细胞还有分泌内因子的作用. 这对于维生素 B₁₂ 的吸收必不可少. 但对于大鼠和小鼠壁细胞的功能只有泌酸^[1]. 由于许多消化系疾病均与胃酸分

泌有关. 故对胃黏膜及壁细胞的研究必不可少. 国外 1970 年代就建立了分离壁细胞的方法^[1]. 近年国内李晓波 *et al*^[2] 建立了兔胃壁细胞的分离方法. 我室聂克 *et al*^[3] 根据 Lewin 的方法略加改善建立了大鼠胃壁细胞的分离方法. 由于壁细胞的分离较难操作. 过程较为复杂. 因此分离细胞的活率和纯度也存在较大差异. 我们在此基础上对该法进一步摸索. 有几点体会.

1 大鼠胃壁细胞的分离方法

1.1 材料 实验动物采用 SD 普通级大鼠. 雌雄均可. 200-250 g. 实验前不予禁食. 基础营养液包括: NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaHCO₃, NaCl, KCl, HEPES, Glucose. A 液: 基础液 + BSA + EDTA. B 液: 基础液 + BSA + CaCl₂ + MgCl₂. C 液: B 液 + DTT. 消化液: A 液 + pronase. 其中 A 液中 BSA 的含量由 20 g/L 减至 10 g/L. 细胞分离的数量和活率未见明显变化. HEPES 配制时应单独溶解为无色溶液. 若颜色变黄时会影响细胞分离结果. DTT 在临用前加入. 所用各种营养液均用 NaOH 调整 pH 值 7.0-7.5. 酶的用量应控制在 1 g/L. EDTA 用量为 2 mmol/L.

1.2 胃袋 脱颈椎处死动物. 剖开腹腔. 结扎贲门和幽门. 将取出的胃放入冰冷的生理盐水中. 冲洗表面. 胃底剪开一口. 用玻璃棒将胃翻转. 再置冰冷生理盐水中. 洗涤胃内容物及黏液. 在胃盲囊与胃体交界处. 结扎切口. 由胃窦部进针 (4 号) 注入消化液. 至胃袋充满为止. 若胃袋出现充血. 贲门内容物变稀等异常状况. 则对胃壁细胞的分离结果有很大影响.

1.3 消化 消化液注入胃袋应小心操作若出现漏液则影响细胞的活率. 胃袋放入A液内37℃水浴振荡(100次/min) 并通入950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂ 此时胃袋内层即浆膜面处于消化液(pronase-EDTA)的作用外层即黏膜面处于A液(EDTA+BSA)中 既保证消化酶的分​​离作用又避免了直接作用对胃黏膜细胞的损伤. 消化时间为90 min 整个消化过程分为3步 每步30 min 更换新鲜A液后重复进行每次换液须预先37℃温浴并通气以保证细胞分离过程始终处于一个较为恒定的环境.

1.4 分散 是指胃黏膜细胞由胃袋组织游离下来的过程. 此过程主要由2步组成: 一是磁力搅拌二是低速离心. 搅拌的目的是将消化过程中胃黏膜层松散的细胞从组织上游离下来离心的目的则是集中收集细胞. 搅拌时胃袋处于B液中 B液较A液多了Ca²⁺和Mg²⁺离子使分离下来的细胞所处的环境更加接近生理条件. 搅拌时间以50 min为宜且每10 min更换一次B液 更换前B液同样需要预先温浴和通气. 搅拌的速度要缓慢轻柔 以胃袋刚好可以在B液中自由旋转为宜每次搅拌后混有细胞及组织残渣的B液要经200目尼龙滤膜过滤 然后离心 离心速度控制900-1 000 r/min 离心5 min 细胞可沉于管底用C液混悬后收集因C液中含有分散细胞的DTT 且离心速度低细胞易于吹打分散 团块较少. 每次收集的细胞混悬液要放入0-4℃环境保存 此温度对细胞形态损伤较小.

1.5 细胞活率 即时分离的细胞特别是应用消化酶最大的一个缺点就是对细胞的损伤通过翻转胃袋及消化酶用量和细胞保护剂BSA用量的控制 分离细胞的活率大有提高可以达到90%以上(台盼蓝染色实验) 但随着时间的延长细胞的死亡率迅速增加. 室温操作大约2 h后细胞活率降为50%以下 这很不利于对细胞形态及功能的进一步检测. 为了对细胞活率的改善 有报道对分离胃壁细胞进行原代培养^[4] 在整个过程中 壁细胞每日的死亡率为5-10% 但因本室条件限制分离过程无法保证无菌操作细胞培养难以实现. 设想将分离细胞混悬于F12/DMEM培养基(加胰岛素 转铁蛋白 抗生素 葡萄糖 牛血清白蛋白) 在37℃恒温开放环境中并通入50 mL/L CO₂ 过夜观察细胞活率的变化发现分离2 h后细胞活率可保持80%左右 但14 h后只有个别细胞存活. 考虑是因为37℃及培养基适宜细菌繁殖对细胞的影响很大. 而0-4℃环境对细胞损伤小且不利于细菌生长 故将细胞混悬液放入0-4℃冰箱 结果发现2 h后活率大于80% 22 h后活率为70% 44 h后活率为40-50% 细胞死亡速度明显减慢. 后又观察将分离细胞混悬于C营养液中0-4℃保存 细胞的活率22 h后仍可达到70-80% 这对于进行即时分离细胞的进一步功能检测无疑是非常有利的.

2 大鼠胃壁细胞的纯化方法

由于分离出的胃黏膜细胞包括主细胞壁细胞 黏液细胞及少数内分泌细胞而胃壁细胞只占总体细胞的20-30% 为得到较高纯度的壁细胞用于实验研究是一个必须解决的问题. 李晓波曾用淘洗及离心的方法可获得较高纯度的兔胃壁细胞^[2] 但由于仪器设备及兔鼠所分离胃黏膜细胞数量多少的差异淘洗方法难以实施. Percoll作为一种细胞分离液具有对细胞损伤小的特点且易于从细胞表面洗脱,可用于对大鼠胃壁细胞的纯化分离. 我室采用400 g/L 600 g/L Percoll非连续密度梯度离心法,可得到较稳定的70%左右纯度的壁细胞.

2.1 Percoll的配制 用生理盐水或0.25 mol/L蔗糖配制,可保证细胞处于等渗环境. 我室采用生理盐水配制: 首先将Percoll原液与1.5 mol/L的NaCl 9:1混合(体积比)作为纯Percoll储存液 密度为1.130 5 g/L. 用时再根据需要用0.15 mol/L NaCl配制不同百分比浓度的Percoll.

2.2 富集壁细胞 我室以往采取恒流泵制作40-60%连续密度梯度递质离心富集壁细胞经操作发现非连续密度梯度离心细胞更容易分层收集. 在离心管中依次铺入600 g/L (1.080 g/L) 400 g/L (1.056 g/L) Percoll分离液各2 mL 再轻轻铺入细胞混悬液1 mL 细胞浓度在(1-2 × 10⁶ /L) 离心速度2 000 r/min 15 min. 细胞在不同界面出现分层分别收集40%及60%界面处细胞 台盼蓝染色鉴定活率HE染色鉴定纯度结果发现40%层界面处细胞数量较少细胞碎片较多活率低 而60%层界面处富集细胞数量较多细胞活率可达90-95% 细胞涂片经HE染色后壁细胞比例可达70%左右 且结果稳定. 陈蕾 *et al*^[4]报道大鼠壁细胞分离并培养后纯度可达到80% 可能与其采用幼年大鼠(体重100g左右)及经过培养有关.

3 讨论

细胞分离的方法通常有两种: 机械分离法和酶分离法. 与其他组织相比较比如肝或胰腺胃黏膜因细胞排列紧密而不易分离. 单纯应用机械法分离胃黏膜细胞效果并不理想. 应用胶原酶可对狗豚鼠兔的胃黏膜细胞进行成功的分离由于不同种属的动物及不同类型的蛋白水解酶对细胞分离效果影响迥异胶原酶对大鼠胃黏膜细胞的分离并不理想而Pronase(链酶蛋白酶)对分离大鼠胃黏膜细胞很有效这种酶具有广泛的消化作用与EDTA联合使用作用更加突出但对细胞的生物结构有一定影响.

大鼠胃壁细胞的分离采用pronase-EDTA酶消化法根据Lewin *et al*制作翻转胃袋并注入消化液进行细胞分离. 分离过程主要分为三步: 消化-分散-纯化. 具体来说 是指(1)pronase-EDTA消化液注入翻转胃袋并将胃袋放入营养液中37℃水浴振荡消化过程; (2)磁力搅

拌分散细胞并低速离心收集细胞过程; (3)percoll 非连续密度梯度离心富集壁细胞过程。即时分离纯化后壁细胞纯度为70% 活率90% 在0-4℃ 环境下保存22 h后活率仍可达到70-80%。

细胞分离过程往往较为烦琐需细致操作而结果也常因人因地有很大差异我室针对大鼠胃壁细胞的分离方法进行摸索在本实验室条件下已取得较为稳定的结果。壁细胞的纯化是影响细胞功能检测的关键步骤 目前国外报道应用JE-6B 淘洗系统可对狗或兔的胃黏膜细胞进行纯化获得70%纯度的壁细胞再进一步用percoll 梯度离心的方法可纯化至95-100%^[5]。Chew *et al*^[6]用Nycodens 梯度离心联合淘洗可获得95%纯度的兔壁细胞。Schepp *et al*^[7]报道应用淘洗和percoll 梯度离心的方法纯化大鼠壁细胞纯度可达到97%以上。本室在已有的实验条件下可获得大鼠壁细胞纯度70% 尚需进一步提高。

胃壁细胞分离及纯化方法的建立为泌酸相关疾病提

供了体外细胞研究模型为细胞表面受体的研究提供了基础 也使研究细胞内信息传递及药物调节成为可能 将推动我国胃酸相关疾病的研究。

4 参考文献

- 1 Chew CS. Parietal cell culture: new models and directions. *Annu Rev Physiol* 1994;56:445-461
- 2 李晓波, 钱家鸣, 陈元方. 壁细胞的淘洗分离与应用. *胃肠病学和肝病杂志* 1996;5:254-256
- 3 袁克, 王汝俊, 王建华. 大鼠胃壁细胞的分离方法. *世界华人消化杂志* 1999;7:994-995
- 4 陈蕾, 黄威权, 孙绪德, 吕宝真, 蒲若蕾. 大鼠胃壁细胞的分离及培养. *第四军医大学学报* 2002;23:769-771
- 5 Delvalle J, Tsunoda Y, Williams JA, Yamada T. Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ by secretagogue stimulation of canine gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992;262:G420-G426
- 6 Chew CS, Brown MR. Release of intracellular Ca^{2+} and elevation of inositol trisphosphate by secretagogues in parietal and chief cells isolated from rabbit gastric mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1986;888:116-125
- 7 Schepp W, Dehne K, Herrmuth H, Pfeffer K, Prinz C. Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells. *Am J Physiol* 1998;275:G1094-1105

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

• 研究快报 •

幽门螺杆菌感染儿童 HLA-DQA1 的免疫遗传学特征

黄永坤, 戚勤, 郝萍, 李海林, 文革生, 周丽芳

黄永坤, 戚勤, 李海林, 文革生, 周丽芳, 昆明医学院第一附属医院儿科 云南昆明市 650032
郝萍, 昆明医学院第一附属医院临床医学实验中心 云南昆明市 650032
项目负责人: 黄永坤, 650032, 云南省昆明市西昌路 295 号, 昆明医学院第一附属医院. hykkmynncn@hotmail.com
电话: 0871-6415908
收稿日期: 2004-04-06 接受日期: 2004-04-20

摘要

目的: 了解昆明汉族儿童中幽门螺杆菌(*H pylori*)感染率及其 HLA-DQA1 免疫遗传学特征。

方法: 用胶体金标免疫渗滤法检测 153 名 6-14 岁的学生血 *H pylori*-IgG 抗体。并用聚合酶链反应-序列特异性引物 (PCR-SSP) 技术对以血清学试验及¹³C 尿素呼气试验确诊的 34 例 *H pylori* 感染儿童及 37 例无 *H pylori* 感染儿童进行 HLA-DQA1 基因分型。

结果: 昆明儿童 *H pylori* 感染率为 34.5% 其 HLA-DQA1*0103 等位基因频率明显高于无 *H pylori* 感染儿童 (29.41% vs 9.46% $P=0.002$ $P_c=0.028$ OR=3.988 95% CI: 1.562-10.180); 而无 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0302 等位基因频率低于无 *H pylori* 感染儿童 (19.12% vs 33.78%

$P=0.049$ OR=0.463 95% CI: 0.214-1.003) 但经等位基因多项比较校正差异消失 ($P_c=0.686$)。

结论: 昆明汉族儿童 *H pylori* 感染率较高。他们在 HLA-DQA1 位点上与无 *H pylori* 感染儿童存在免疫遗传学差异 HLA-DQA1*0103 基因可能是 *H pylori* 感染的易感基因; 而 DQA1*0302 基因则是否具有免疫抵抗作用需要进一步研究。

黄永坤, 戚勤, 郝萍, 李海林, 文革生, 周丽芳. 幽门螺杆菌感染儿童 HLA-DQA1 的免疫遗传学特征. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1735-1737
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1735.asp>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori* *H pylori*) 与慢性活动性胃炎 消化性溃疡 胃黏膜相关淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤及胃癌密切相关^[1]。世界上至少有半数以上的人口有幽门螺杆菌感染但其中仅很少的一部分表现出明显的临床疾病状态其原因仍不清楚^[2]。许多研究认为这除了与 *H pylori* 菌株的毒力高低环境因素有关外 还与宿主的免疫遗传因素有关^[3]。我们用聚合酶链

反应-序列特异性引物(polymerase chain reaction-sequence specific primers PCR-SSP)技术对云南昆明 *H pylori* 感染汉族儿童及健康汉族儿童进行了 HLA-DQA1 基因分型旨在探讨在 HLA-DQA1 位点上是否存在与儿童 *H pylori* 感染相关的易感基因和抵抗基因从而了解人类是否存在易感 *H pylori* 的免疫遗传因素。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 感染的诊断参照中华医学会儿科学分会感染消化组制订的小儿慢性胃炎 消化性溃疡胃镜诊断标准^[4]。全部研究对象均来自于昆明市某中心小学三代内无血缘关系的153名汉族儿童。年龄6-14岁。三代均为汉族在昆明市出生并且生活4a以上 无慢性腹痛消化不良胃炎 消化性溃疡等 *H pylori* 感染相关疾病史及严重心肺 肾 肝 神经 营养 免疫缺陷病史近期无激素 抗生素 铋剂 质子泵阻滞剂使用史(>4 wk) 相互间无亲缘关系。整群抽样的方法取静脉血 2-3 mL 分离血浆行 *H pylori*-IgG 检测(试剂盒由福建省蓝波生物技术研究所提供) 并分别从58名血清学阳性和95名血清学阴性儿童中随机各抽出40例行¹³C 尿素呼气试验(¹³C-UBT 试剂盒由北京嘉汇彬医药技术有限公司提供)。两项皆为阳性者诊断为 *H pylori* 感染 列为实验组的有34例;二者均为阴性者则为非 *H pylori* 感染 儿童列为对照组的有37例。实验组平均年龄9.6 2.1岁 健康对照组平均年龄9.7 2.3岁 男女1 1;两组年龄 性别均无差异($P>0.05$)。血液基因组 DNA 提取试剂盒(美国 MO BIO Laboratories 公司提供) DQA SSP UNITRAY 试剂盒(包括 DQA1 23 对序列特异性引物和1个污染对照。试剂盒由美国 PEL-FREEZE SYSTEMS 公司提供) DL2000 Taq 聚合酶 琼脂糖(芬兰产)和溴乙锭均由大连宝生物公司提供。

1.2 方法 血 *H pylori*-IgG 抗体和¹³C-UBT 的检测分别按试剂盒的操作说明进行。基因组DNA制备采用血液基因组DNA提取试剂盒在常温下快速提取实验组34例和对照组37例的基因组DNA 提取方法按试剂盒所附说明进行。提取的DNA用分光光度仪测定浓度和纯度 $A_{260/280nm}$ 应在1.6-1.8;浓度在60 mg/L以上。提取的DNA于-20 保存备用。HLA-DQA1 基因分型采用 SSP UNITRAY 试剂盒扩增 HLA-DQA1 DNA 片段 PCR 反应体系 循环条件及操作方法均按所附说明。扩增产物进行20 g/L 含溴乙锭的琼脂糖凝胶电泳(130V 13 min) 结果判断借助其提供的专用读板纸在凝胶成像仪和紫外灯判读并成像。要求分子796 bp 必须存在各阳性条带必须与规定的相应分子对应。

统计学处理 用直接计算法统计 *H pylori* 感染率及实验组和对照组HLA-DQA1各等位基因的基因频率。男女儿童 *H pylori* 感染率比较及实验组和对照组间 HLA-DQA1 等位基因的比较均用 2 2 表作 χ^2 检验 等位基因比较的 P 值行等位基因多项比较校正(同一位点需

比较的等位基因数乘 P 值 即 P_c) 以 $P_c < 0.05$ 判定差异有显著性意义。

2 结果

昆明汉族儿童血 *H pylori*-IgG 阳性58人 阳性率34.5%;其中男生阳性率31.1% 女生阳性率37.8% 男女间比较无明显差异($\chi^2 = 0.748 P = 0.387$)。PCR-SSP 的 HLA-DQA1 等位基因图见图1。34例 *H pylori* 感染儿童(实验组)HLA-DQA1*0103 等位基因频率明显高于无 *H pylori* 感染儿童($P = 0.002 OR = 3.988 95\% CI = 1.562-10.180$)见表1。 P 值经等位基因多项比较校正后仍有统计学意义($P_c = 0.028$)。同时 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0302 等位基因频率低于无 *H pylori* 感染儿童($P = 0.049 OR = 0.463 95\% CI = 0.214-1.003$)。但 P 值经等位基因多项比较校正后失去统计学意义($P_c = 0.686$)。

表1 *H pylori* 感染与无感染儿童 HLA-DQA1 等位基因频率比较

HLA-DQA1	<i>H pylori</i> (+) n = 68		<i>H pylori</i> (-) n = 74		P值	P_c 值
	n	AF	n	AF		
0101	2	0.0294	2	0.027	0.932	-
0102	5	0.0735	9	0.1216	0.337	-
0103	20	0.2941	7	0.0946	0.002	0.028
0104	2	0.0294	3	0.0405	0.719	-
0105	0	0	2	0.027	0.172	-
0201	4	0.0588	2	0.027	0.347	-
30101	4	0.0588	4	0.0541	0.902	-
0302	13	0.1912	25	0.3378	0.049	0.686
0303	4	0.0588	2	0.027	0.347	-
0501	1	0.0147	2	0.027	0.61	-
0502	2	0.0294	0	0	0.137	-
0503	1	0.0147	0	0	0.295	-
0505	1	0.0147	5	0.0676	0.118	-
0601	9	0.1324	11	0.1486	0.78	-

AF 为等位基因频率。

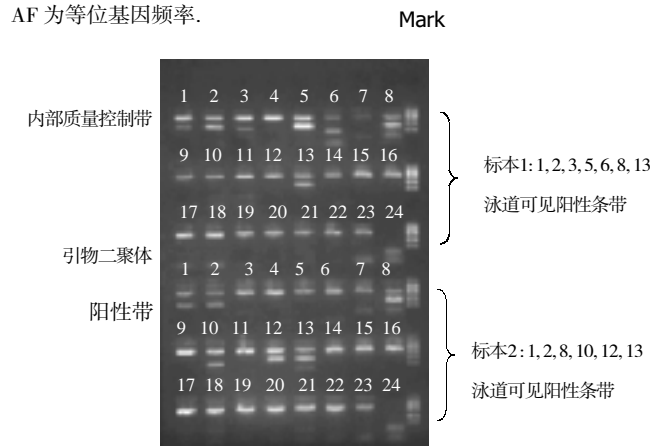


图1 昆明汉族 PCR-SSP 的 HLA-DQA1 等位基因分型图。(全图共48个泳道, 标本1和2的第24泳道为污染控制道。内控带分子为796 bp。Mark 由下向上的分子分别为100 bp 250 bp 500 bp 750 bp, 1 000 bp 和 2 000 bp)

3 讨论

我国 *H pylori* 感染流行模式为儿童易感型。我们选用目前较有发展前景的胶体金标免疫渗滤法调查昆明市某中心小学儿童 *H pylori* 感染状况。结果显示儿童的 *H pylori* 感染率为 34.5% 说明昆明汉族儿童 *H pylori* 感染率较高; 男女 *H pylori* 感染率比较无差异与文献[5-9]记载一致。近年来 *H pylori* 感染人群 HLA-II 类基因的免疫遗传学特征研究成为世界胃肠病学研究热点对 HLA-DQA1 位点的报道也较多见。许春娣 *et al*^[10] 发现 *H pylori* 血清抗体阳性无症状儿童与血清抗体阴性无症状儿童的 HLA-DQA1 等位基因频率存在异常分布。在 *H pylori* 血清抗体阳性组中 DQA1*03 等位基因频率明显低于血清学阴性组而 DQA1*0501 频率则显著高于 *H pylori* 阴性组。因此认为 DQA1*03 基因对 *H pylori* 感染可能具有免疫抵抗作用而 DQA1*0501 则可能具有易感作用。Azuma *et al*^[11] 发现 HLA-DQA1*0102 基因对 *H pylori* 感染具有抵抗保护作用尤其对 *H pylori* 感染相关性疾病如萎缩性胃炎肠化生的胃腺癌有意义; 而 DQA1*0301 可能对 *H pylori* 感染起易感作用。Magnusson *et al*^[12] 发现 DQA1*0102 等位基因与 *H pylori* 抗体血清阳性呈负相关 DRB*0601 与胃癌呈正相关但是没有 HLA 等位基因与 *H pylori* 感染和胃癌同时有相关。因此认为 HLA-DQA1*0102 等位基因可能对 *H pylori* 感染起抵抗保护作用而 HLA-DR-DQ 等位基因可能以其他方式影响胃腺癌的发生。Karhukorpi *et al*^[13] 认为 HLA-DQA1 基因和血清抗 *H pylori* 抗体无关。Santolaria *et al*^[14] 发现 HLA-DQA1*0102 和 *0103 不能改变 *H pylori* 感染的易感性以及消化性溃疡的发生。Perri *et al*^[15] 研究也得出 HLA-DQA1 可能不是通过增加 *H pylori* 感染危险性而影响胃腺癌的发生。欧洲的研究结果与亚洲的结果明显不同的原因可能与种族有关。我们以科研诊断标准(血 *H pylori*-IgG 抗体加 ¹³C-尿素呼气试验)为基础对云南昆明 *H pylori* 感染汉族儿童及无 *H pylori* 感染汉族儿童行 HLA-DQA1 分型发现 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0103 等位基因频率明显高于正常对照儿童(29.4% vs 9.5% $P=0.002$ OR=3.988 95% CI: 1.562-10.180) P 值经等位基因多项比较校正后仍有意义($P_c=0.028$), 而 *H pylori* 感染儿童 HLA-DQA1*0302 等位基因频率低于正常对照儿童(19.1% vs 33.8% $P=0.049$ OR=0.463 95% CI: 0.214-1.003) P 值经等位基因多项比较校正后失去统计学意义($P_c=0.686$)。结果表明 DQA1*0103 基因可能是 *H pylori* 感染的易感基因而 *0302 基因是否具有免疫抵抗作用需进一步证实。本研究结果与许春娣 *et al*^[10] 的接近而与日本欧洲的研究有较大的差异^[11-15]。

H pylori 感染是一个多基因疾病其人群免疫遗传

学特征的研究易受其他因素影响。无症状人群身体相对健康而儿童生活相对单一不良嗜好少因此以 *H pylori* 感染儿童为对象的研究对揭示 *H pylori* 感染人群的免疫遗传学特征具有特殊的意义。同时也将为进一步探索 *H pylori* 感染相关性患者群的免疫遗传学特征提供良好的对照。由于本研究所选择的研究对象是 6-14 岁的儿童因此进一步随访并根据疾病结局重新评估也是本课题的重要组成部分。

4 参考文献

- 1 Bjorkholm B, Falk P, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori*: resurrection of the cancer link. *J Intern Med* 2003;253:102-119
- 2 Sullivan T, Ashbury FD, Fallone CA, Naja F, Schabas R, Hebert PC, Hunt R, Jones N. *Helicobacter pylori* and the prevention of gastric cancer. *Can J Gastroenterol* 2004;18:295-302
- 3 Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002;2:28-37
- 4 中华儿科杂志 编辑委员会, 中华医学会儿科学分会感染消化学组. 小儿慢性胃炎消化性溃疡胃镜诊断标准. *中华儿科杂志* 2003;41:189
- 5 Miwa H, Go MF, Sato N. *H pylori* and gastric cancer: the Asian enigma. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1106-1112
- 6 Machado RS, Patricio FR, Kawakami E. ¹³C-urea breath test to diagnose *Helicobacter pylori* infection in children aged up to 6 years. *Helicobacter* 2004;9:39-45
- 7 Ng FH, Lai CK, Wong BC, Wong WM, Wong SY, Chow KC, Yuen ST, Leung SY, Lam SK. ¹³C-urea breath test without prior fasting and without test meal is accurate for the detection of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:834-838
- 8 Sinha SK, Martin B, Gold BD, Song Q, Sargent M, Bernstein CN. The incidence of *Helicobacter pylori* acquisition in children of a Canadian First Nations community and the potential for parent-to-child transmission. *Helicobacter* 2004;9:59-68
- 9 Rodrigues MN, Queiroz DM, Bezerra Filho JG, Pontes LK, Rodrigues RT, Braga LL. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:201-205
- 10 许春娣, 奚容平, 陈舜年, 杨玉琴, 范丽安, 徐家裕. 幽门螺杆菌感染的患儿人类白细胞抗原 DQA1 的免疫遗传学分析. *中华儿科杂志* 2000;38:746-749
- 11 Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998;82:1013-1018
- 12 Magnusson PKE, Enroth H, Eriksson I, Held M, Nyren O, Engstrand L, Hansson LE, Gyllenstein UB. Gastric cancer and human leukocyte antigen: distinct DQ and DR alleles are associated with development of gastric cancer and infection by *Helicobacter pylori*. *Cancer Res* 2001;61:2684-2689
- 13 Karhukorpi J, Ikaheimo I, Silvennoinen-Kassinen S, Tiilikainen AS, Karttunen R. HLA-DQA1 alleles and the presence of *Helicobacter pylori* antibodies. *Eur J Immunogenet* 1999;26:15-17
- 14 Santolaria S, Barrios Y, Benito R, Piazuelo E, Quintero E, Lanas A. *Helicobacter pylori* and immunogenetic factor of the host: relevance of the HLA-DQA1*0102 and *0301 alleles in peptic ulcer. *Gastroenterol Hepatol* 2001;24:117-121
- 15 Perri F, Piepoli A, Quitadamo M, Quarticelli M, Merla A, Bisceglia M. HLA-DQA1 and DQB1 genes and *Helicobacter pylori* infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. *Tissue Antigens* 2002;59:55-57

大鼠小肠移植排斥反应期移植肠 RANTES 表达的变化

杨建军, 王为忠, 王春梅, 陈丹, 季刚

杨建军, 王为忠, 季刚, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科 陕西省西安市 710033
王春梅, 陈丹, 中国人民解放军第四军医大学基础部电子显微镜中心 陕西省西安市 710033
国家自然科学基金资助项目, No. 30070742
项目负责人: 王为忠, 710033, 陕西省西安市长乐西路 15 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科. weichang@fmmu.edu.cn
电话: 029-83375261 传真: 029-83375261
收稿日期: 2004-02-28 接受日期: 2004-04-20

摘要

目的: 探讨移植肠 RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted 活化T细胞调节的正常T细胞表达和分泌的因子)的表达在小肠移植急性排斥反应中的意义以及他克莫司(FK506)对他的影响。

方法: 选用成年健康 SD和Wistar大鼠进行全小肠异位移植. 实验分4组 第1组: 非手术对照组(Wistar); 第2组: 同基因移植对照组(Wistar Wistar); 第3组: 异基因移植组(SD Wistar); 第4组: FK506治疗组[SD Wistar+FK506 (1 mg/kg⁻¹/d⁻¹ im)]. 移植术后3 5 7 d取各组大鼠移植肠标本进行病理学检查并采用免疫荧光染色和激光扫描共聚焦显微镜技术对移植肠RANTES的表达进行连续定量测定。

结果: 异基因移植组大鼠的移植肠RANTES表达在术后均非常显著高于其他3个对照组($P < 0.01$) 其动态变化与急性排斥反应的进程呈正相关; FK506治疗组大鼠移植肠RANTES的表达明显低于未治疗组($P < 0.01$)。

结论: RANTES阳性细胞在小肠移植急性排斥反应中发挥了重要作用动态检测移植肠RANTES的表达变化可能成为小肠移植急性排斥反应有效的诊断指标之一。

杨建军, 王为忠, 王春梅, 陈丹, 季刚. 大鼠小肠移植排斥反应期移植肠 RANTES 表达的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1738-1740
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1738.asp>

0 引言

同种异体移植排斥反应是影响移植植物功能和存活的最大障碍 小肠移植排斥反应的诊断与治疗尤为困难. 我们建立大鼠全小肠异位移植模型用免疫荧光染色和激光扫描共聚焦显微镜技术检测移植肠 RANTES(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted 活化T细胞调节的正常T细胞表达和分泌的因子)的表达变化探讨RANTES与急性排斥反应的关系寻求小肠移植排斥反应早期敏感的诊断指标为抗排斥治疗和免疫耐受诱导策略提供新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 选用健康成年 SD和Wistar大鼠 体质量约300 g(由第四军医大学实验动物中心提供) 进行全小肠异位移植. 将动物随机分为4组 每组移植大鼠数均为18只: 第1组 非手术对照组(Wistar); 第2组 同基因移植对照组(Wistar Wistar); 第3组 异基因移植未治疗组(SD Wistar); 第4组 异基因移植FK506治疗组[SD Wistar+FK506(每日1 mg/kg, 0-7 d im)]. 术后3 5 7 d每组各处死6只大鼠 取移植肠标本用40 g/L甲醛液固定常规石蜡包埋切片厚3 μm 备病理及免疫荧光检查. 兔抗大鼠RANTES多抗购自美国Peprotech公司 鼠抗兔IgG-FITC购自美国Santa Cruz Biotechnology公司 他克莫司(FK506)每支1 mL含5 mg 购自爱尔兰Kerry公司。

1.2 方法 组织病理学检查按文献[1-4]制定排斥反应的病理学诊断标准. 激光扫描共聚焦检测移植肠RANTES表达用石蜡切片常规二甲苯梯度酒精顺序脱蜡至水 PBS冲洗30 mL/L正常羊血清封闭30 min 滴加兔抗大鼠RANTES多抗工作浓度为1:50 同时设立空白对照和已知阳性对照(以非手术对照组中Wistar大鼠的小肠组织切片作为空白对照异基因移植肠染色阳性标本作为阳性对照) 4 过夜后室温下复温30 min PBS振荡洗5 min×3次 滴加鼠抗兔IgG-FITC(1:50) 37 孵育30 min PBS振荡洗5 min×3次 缓冲甘油封片 BIO-RAD MRC-1024型激光扫描共聚焦显微镜观察 在400倍镜下胞质染色呈黄绿色荧光为阳性细胞应用Lasersharp软件进行扫描. 每张切片在400倍镜下随机选取10个视野对阳性细胞聚焦区进行荧光强度测定 计算出平均每个视野阳性细胞的荧光强度值。

统计学处理 所有结果以 mean±SD表示 数据处理采用SPSS11.0统计软件包进行方差分析 $P < 0.05$ 时差异有显著性。

2 结果

在未给予FK506治疗的异基因移植大鼠移植组织术后3 d发现肠黏膜绒毛数量减少轻度水肿绒毛高度变矮间质中有少量炎性细胞浸润符合轻度排斥的病理学诊断标准; 术后5 d肠黏膜绒毛数稀少黏膜上皮开始脱落杯状细胞和潘氏细胞数目减少炎性细胞浸润加重以淋巴和单核细胞为主符合中度排斥的病理学诊断标准; 术后7 d肠黏膜绒毛结构消失黏膜上皮完全脱落肠壁变薄并坏死杯状细胞和潘氏细胞消失 间质中有大量炎性细胞浸润基层结构破坏血

管炎性反应显著符合重度排斥的病理学诊断标准。FK506治疗组大鼠和同基因移植对照组大鼠在观察期内未发现明显排斥反应征象。非手术对照组大鼠小肠每个视野RANTES表达阳性细胞的荧光强度(13.4±2.3)。异基因移植未治疗组大鼠移植肠RANTES表达从术后3 d开始明显升高(47.3±1.8) 术后5 d持续上升(79.0±9.5) 术后7 d达高峰(138.5±8.7) 各时间段RANTES表达均非常显著高于其他3个对照组($P < 0.01$) 其动态变化与排斥反应的进程呈正相关。FK506治疗组大鼠术后3 d RANTES表达(20.8±3.2) 术后5 d轻度升高(36.4±2.5) 术后7 d仍维持在同一水平峰值为(40.4±5.3) 明显低于未治疗组($P < 0.01$)。同基因移植对照组大鼠术后移植肠RANTES表达的变化趋势与治疗组相似($P > 0.05$) (表1)。

表1 大鼠移植肠RANTES阳性细胞的荧光强度(mean±SD)

分组	t(移植后)/d		
	3	5	7
Wistar	13.4±2.3	13.4±2.3	13.4±2.3
Wistar Wistar	17.4±6.1	33.9±6.1	39.5±5.2
SD Wistar	47.3±1.8 ^b	79.0±9.5 ^b	138.5±8.7 ^b
SD Wistar+FK506	20.8±3.2	36.4±2.5	40.4±5.3

^b $P < 0.01$ vs 其他3组。

3 讨论

小肠移植是治疗终末期肠功能衰竭如短肠综合征的惟一确切的方法^[5]。小肠移植之所以难以长期存活主要是因为小肠属于高免疫原性器官小肠及其系膜拥有丰富的淋巴组织移植后免疫反应较其他器官移植更为剧烈既有排斥反应又有移植体抗宿主反应(GVHR) 再加上小肠肠腔内含有大量的病原菌术后易并发肠源性感染引起败血症使治疗更加困难因此 小肠移植的早期结果并不令人乐观^[6]。

小肠移植急性排斥反应是以细胞免疫为主体液免疫共同参与完成的一个复杂的免疫应答过程细胞在小肠移植免疫反应中起决定性的作用^[7]。RANTES主要是由活化的T淋巴细胞产生的一个 β -家族的趋化因子 具有控制单核细胞和淋巴细胞定向迁移的免疫学特性 在机体的免疫反应调节中起重要作用^[8-12]。我们发现正常大鼠小肠组织中RANTES表达很低而异基因移植未治疗组大鼠移植肠RANTES阳性细胞表达在移植后3 5 7 d较其他3组明显升高($P < 0.01$) 结合组织病理学检查发现RANTES表达的动态变化与排斥反应的进程呈正相关。由此可见同种异体小肠移植术后移植肠RANTES表达与急性排斥反应的关系密切。RANTES介导移植排斥反应的机制可能是移植术后抗原特异性T淋巴细胞活化增生分泌大量的RANTES趋化单核细胞和淋巴细胞向移植体定向迁移淋巴细

胞的活化使IL-2和IFN- γ 等细胞因子产生增加又能诱导RANTES的分泌 RANTES含量的不断增加进一步诱导T淋巴细胞活化产生效应形成免疫应答不断增强的正反馈过程^[13]。随着RANTES的增加免疫炎症细胞浸润增多排斥反应进一步加剧。本研究表明RANTES阳性细胞在小肠移植急性排斥反应中发挥了重要作用 RANTES表达的高低可以间接反映移植体T淋巴细胞浸润的严重程度为小肠移植排斥反应的早期诊断提供帮助。目前临床小肠移植排斥反应的诊断只能以临床观察与内窥镜指导下肠黏膜活检的病理学检查相结合的方法为主缺乏早期特异敏感的指标^[14]。趋化因子的高表达发生在排斥反应的早期阶段因此利用激光扫描共聚焦显微镜技术动态检测移植肠RANTES的表达变化可成为小肠移植急性排斥反应有效的诊断指标之一。同时采取以趋化因子为靶位的治疗方案可能达到抗排斥和诱导移植耐受的目的。

FK506是从放线菌Streptomyces tsukubaensis的代谢产物中提取的大环内酯类物质其抑制体外混合淋巴细胞反应T细胞增生反应以及抑制IL-2和IFN生成作用比CsA强100倍或以上。我们应用FK506治疗的异基因移植组大鼠移植肠RANTES表达显著降低病理学检查无明显排斥反应。这说明FK506能显著抑制T淋巴细胞的活化减少RANTES的产生延长移植体的存活时间。此外同基因移植对照组和FK506治疗组大鼠术后5 7 d移植肠RANTES表达轻度升高但仍保持在较低水平其原因可能还与小肠异位移植后缺乏肠内容物刺激而导致的肠黏膜萎缩和细菌易位有关。

4 参考文献

- 1 Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, Nalesnik MA, Randhawa P, Demetris AJ. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation* 2003;75:1241-1248
- 2 Sudan DL, Kaufman SS, Shaw BW Jr, Fox IJ, McCashland TM, Schafer DF, Radio SJ, Hinrichs SH, Vanderhoof JA, Langnas AN. Isolated intestinal transplantation for intestinal failure. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1506-1515
- 3 Toogood GJ, Rankin AM, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ. The immune response following small bowel transplantation. II. A very early cytokine response in the gut-associated lymphoid tissue. *Transplantation* 1997;63:1118-1123
- 4 Schmid T, Oberhuber G, Korozsi G, Klima G, Margreiter R. Histologic pattern of small bowel allograft rejection in the rat. Mucosal biopsies do not provide sufficient information. *Gastroenterology* 1989;96:1529-1532
- 5 Willetts IE, Tam PK, Morris PJ, Dallman MJ. Treatment with an HLA-peptide and cyclosporine A prolongs rat small bowel allograft survival. *J Pediatr Surg* 1997;32:469-472
- 6 Grant D, Wall W, Mimeault R, Zhong R, Ghent C, Garcia B, Stiller C, Duff J. Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet* 1990;335:181-184
- 7 Wallander J, Lackgren G, Tufveson G. T-lymphocytes are necessary for fetal graft vs host disease after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 3):2896-2897
- 8 Ramhorst RE, Garcia VE, Corigliano A, Rabinovich GA, Fainboim L. Identification of RANTES as a novel immunomodulator of the maternal allogeneic response. *Clin Immunol* 2004;110:71-80
- 9 Lillard JW Jr, Boyaka PN, Taub DD, McGhee JR. RANTES potentiates antigen-specific mucosal immune responses. *J*

- Immunol* 2001;166:162-169
- 10 Ajuebor MN, Hogaboam CM, Kunkel SL, Proudfoot AE, Wallace JL. The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *J Immunol* 2001;166:552-558
- 11 Amerio P, Verdolini R, Proietto G, Feliciani C, Toto P, Shivji G, Loconsole F, Cassano N, Amerio P, Vena G, Sauder DN. Role of Th2 cytokines, RANTES and eotaxin in AIDS-associated eosinophilic folliculitis. *Acta Derm Venereol* 2001;81:92-95
- 12 Fairchild RL, VanBuskirk AM, Kondo T, Wakely ME, Orosz CG. Expression of chemokine genes during rejection and long-term acceptance of cardiac allografts. *Transplantation* 1997;63:1807-1812
- 13 顾晓, 唐孝达, 杨尚琪, 刘永, 周佩军, 徐达, 王祥慧, 谭建明. 大鼠心脏移植后动态监测血清 RANTES 和单核细胞趋化蛋白-1 的意义. *中华器官移植杂志* 2001;22:36-38
- 14 李元新, 李宁, 黎介寿. 小肠移植排斥反应期移植肠基因表达的研究. *中华医学杂志* 1999;79:773-776

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

• 研究快报 •

双功能融合基因在肝癌细胞中的表达与作用

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2001@163.net
电话: 027-83662578
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 构建含有融合基因 FCU1 的自杀基因系统观察其对体外培养肝癌细胞的杀伤效应。

方法: 将 FCU1 基因亚克隆于 pEGFP-C₁ 载体转化大肠杆菌 DH5 α 阳性重组子转染肝癌细胞 HepG2 绿色荧光蛋白检测 FCU1 的表达用 G418 筛选出阳性细胞克隆后进行体外药物敏感实验观察旁观者效应。

结果: FCU1 基因正确插入到 pEGFP-C₁ 中 pEGFP-FCU1 转染成功的细胞在荧光显微镜下可见绿色荧光。5-FC 作用下细胞的生长抑制率明显高于未转染细胞且旁观者效应显著。

结论: 本基因治疗体系具有很好的体外杀肿瘤效果为肝癌的基因治疗提供了一个新的选择。

谢娜, 林菊生, 吴斌文, 黎培员. 双功能融合基因在肝癌细胞中的表达与作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1740-1742

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1740.asp>

0 引言

自杀基因/前药系统是一种很有效的肿瘤药物敏感基因疗法这种方法已在多种肿瘤的治疗中得到应用. 新型高效的融合自杀基因 FCU1 是由 FCY1 和 FUR1 两种自杀基因的编码序列经过特定的酶切连接定点缺失突变等过程融合而成^[1]. FCY1 和 FUR1 基因分别编码胞嘧啶脱氨酶(CDase)和尿嘧啶磷酸核糖转移酶(UPRTase)

可将 5-FC 直接代谢为 5-FU 的单磷酸化产物在肿瘤自杀基因治疗中可产生双功能杀伤细胞的功效^[2-4]. 我们将构建好的自杀基因真核细胞表达载体用一定方式导入肿瘤细胞获得稳定表达的细胞株并探讨 FCU1/5-FC 自杀基因系统对体外培养肝癌细胞的杀伤效应。

1 材料和方法

1.1 材料 pCIneoFCU1 由 Transgene S.A. 惠赠 pEGFP-C₁ 由本实验室保存宿主菌 DH5 α 由本室保存肝癌细胞株 HepG2 由本室保存在含 100 mL/L 小牛血清 100 IU/mL 青/链霉素的 DMEM 培养基(Gibco 公司)中于 37 50 mL/LCO₂ 培养箱中培养. 限制性内切酶 *Sma* *Xho* 购自 MBI 公司 DNA 回收试剂盒质粒提取试剂盒购自上海华舜公司 T₄DNA ligase 购自 MBI 公司 脂质体 LipoGen 购自 InvivoGen 公司 G418 购自 Gibco 公司 5-FC 购自 Sigma 公司.

1.2 方法 用 *Sma* *Xho* 分别双酶切 pEGFP-C₁ 和 pCIneoFCU1 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物并回收目的基因片断将载体片段目的基因片段按摩尔比 1:3 混合用 T₄DNA 连接酶于 4 连接过夜. 取适量连接产物用低温 CaCl₂ 法转化 DH5 α 同时用空载体质粒转化作为阳性对照. 筛选出阳性克隆后提取质粒琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性产物即得所需重组体质粒 pEGFP-FCU1. HepG2 细胞培养至对数生长期时转入 6 孔板 每孔 5 10⁵ 个细胞重组体质粒 pEGFP-FCU1 用 LipoGen 脂质体进行转染对照组转染 pEGFP-C₁ 空质粒 48 h 后于荧光显微镜下观察结果. 用 400 mg/L 的 G418 筛选阳性细胞克隆获得稳定表达的单克隆细胞记为 HepG2/FCU1 再扩大培养. 检测前药 5-FC 作用下的细胞生长抑制率将 HepG2/FCU1 细胞以 2 10⁵ 个/

孔接种于6孔板中24h后6孔细胞分别加不同体积的5-FU使其终浓度依次为0 0.01 0.1 1 10 100 $\mu\text{mol/L}$ 每组设3个复孔并用未转染细胞HepG2做阴性对照连续观察培养6d后用台盼兰染色排除法分别计数总细胞数和兰染细胞数计算细胞生长抑制率。在96孔板上将转染的细胞与未转染细胞分别以0 1 1 9 2 8 3 7 4 6 5 5 6 4 7 3 8 2 9 1 1 0的比例混合每组设3个复孔经100 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU作用6d后用MTT法检测体外旁观者效应^[5]。

统计学处理 实验数据用方差分析法检验组间比较用LSD检验法以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 pEGFP-FCU1质粒构建及转染细胞结果 重组体质粒经 *Sma* *Xho* 双酶切应获得约1 100 bp(目的基因)和4 500 bp(载体)的两条线性片段并与pCIneoFCU1双酶切所得目的基因片段大小一致(图1)。pEGFP-FCU1转染HepG2细胞48h后荧光显微镜下可见绿色荧光(图2) 转染效率约40%。G418筛选至单细胞克隆呈集落生长时再进行荧光观察记为HepG2/FCU1细胞。HepG2 HepG2/FCU1及HepG2/EGFP(转染空质粒组)细胞的倍增时间分别为(40.4 \pm 0.1) h (42.8 \pm 0.1 h) (41.5 \pm 0.1 h) 方差分析显示3组间差异无显著性($P > 0.05$) 表明外源基因的转入与表达不影响细胞的生长速度。

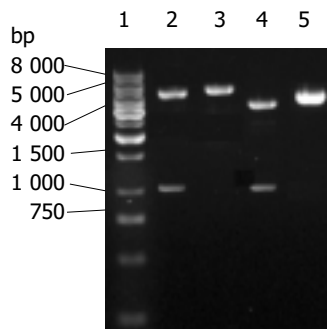


图1 重组体质粒酶切鉴定。1: DNA marker; 2: pCIneoFCU1 双酶切产物; 3: pCIneoFCU1 质粒; 4: 重组体 pEGFP-FCU1 双酶切产物; 5: pEGFP-C1 质粒。

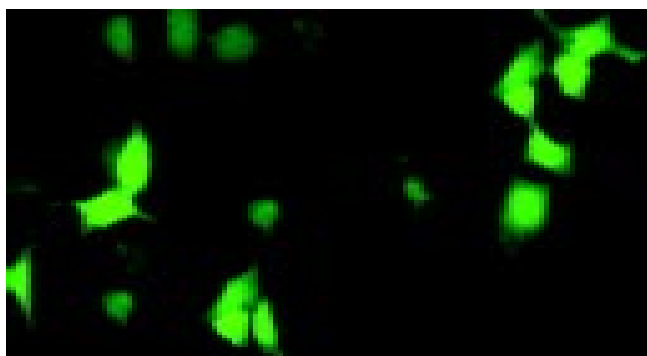


图2 pEGFP-FCU1 转染 HepG2 细胞后荧光照片(400 \times)。

2.2 体外药物敏感试验结果 随着前体药物5-FU浓度的增加 HepG2/FCU1 细胞的存活率明显降低且与对照组(未加药)有显著差异抑制率曲线如图3所示。前体药物5-FU对混合细胞作用后FCU1/5-FU系统存在明显的旁观者效应如图4所示 转染细胞 HepG2/FCU1 含量占10%时 混合细胞生长抑制率已达53%。

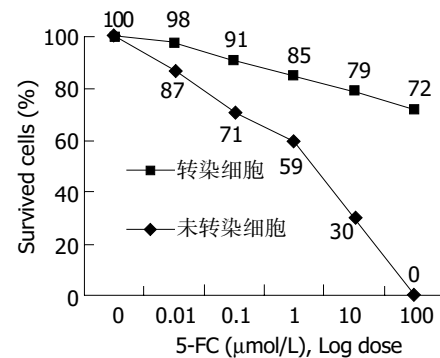


图3 细胞的药物敏感性实验。

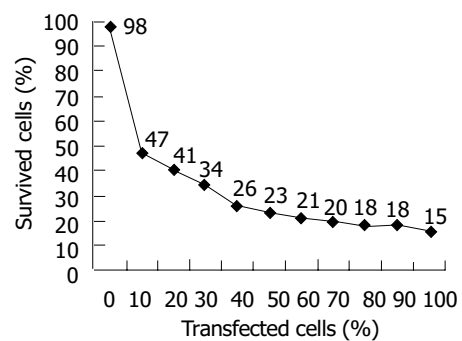


图4 FCU1/5-FU 系统的体外旁观者效应。

3 讨论

肝癌是全球高发肿瘤之一最常见的肝细胞癌一般对化疗高度耐药目前惟一的治愈方法只有部分肝叶切除术和肝移植^[6-7]。基因治疗是一种新的有前景的治疗形式 其基本原理就是将遗传物质导入细胞以产生生物学的治疗效应。病毒或细菌中的一些酶可将无毒或低毒的前药转化为致死性的毒性化合物自杀基因治疗即将编码这些酶的基因导入到靶细胞中因此也称为病毒介导的酶/前药治疗(virus-directed enzyme/prodrug therapy VDEPT)^[8]。TK/GCV(thymidine kinase/ganciclovir)和CD/5-FU系统是目前肝癌基因治疗中应用最广泛的前药激活系统许多体内和体外实验均证实有较好的抑制肿瘤细胞生长的作用^{9-13]}。自杀基因的一个显著特点就是所谓的旁观者效应(bystander effect) 即转染细胞中的毒性药物代谢物可弥散至邻近组织中增加受作用的瘤细胞数目。因此即使仅有部分肿瘤细胞被转染时也可取得显著的杀瘤效果。一些双位点模型研究表明 同时在肝的两叶内分别接种野生型的结肠癌细胞和转染有CD基因的结肠癌细胞在用5-FU治疗后两个病灶均消退这意味着旁观者效应甚至可在

较远的部位发生作用^[14]。融合基因FCU1既能编码CD基因 又编码UPRTase 基因 其表达产物是一个具有双功能的高效杀伤系统Philippe Erbs *et al* 的研究表明FCU1/5-FC系统能显著抑制多种肿瘤细胞的生长转染了FCU1基因的肿瘤细胞对前药5-FC的敏感性比单纯转染FCY1基因的肿瘤细胞高出100倍 且其旁观者效应明显强于单独转染FCY1或FUR1基因 亦或是同时转染两个基因的细胞^[11,15-16]。我们在实验中初步探讨了FCU1/5-FC系统的体外抗肿瘤作用为进一步研究该自杀基因在肿瘤基因治疗中的应用奠定了良好的基础。

4 参考文献

- Erbs P, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F, Jund R, Mehtali M, Transgene SA. *In vivo* cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res* 2000;60:3813-3822
- Erbs P, Exinger F, Jund R. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* FCY1 gene encoding cytosine deaminase and its homologue FCA1 of *Candida albicans*. *Curr Genet* 1997; 31:1-6
- Kievit E, Bershada E, Ng E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res* 1999;59:1417-1421
- Kanai F, Kawakami T, Hamada H, Sadata A, Yoshida Y, Tanaka T, Ohashi M, Tateishi K, Shiratori Y, Omata M. Adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1998;58:1946-1951
- Lv SQ, Yang H, He JQ, Wang B, Yoshimura I, Liu YS. Effects of CD/5-FC suicide gene therapy system on human malignant glioma cells *in vitro*. *Acta Biochim Biophys Sin* 2003;35: 430-434
- Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J* 2000;76: 4-11
- Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl): 225-237
- Moolten FL. Drug sensitivity (suicide) genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* 1994;1:279-287
- Narita M, Bahar R, Hatano M, Kang MM, Tokuhisa T, Goto S, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Tissue-specific expression of a suicide gene for selective killing of neuroblastoma cells using a promoter region of the NCX gene. *Cancer Gene Ther* 2001;8:997-1002
- van Dillen IJ, Mulder NH, Vaalburg W, de Vries EF, Hospers GA. Influence of the bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. *Curr Gene Ther* 2002;2:307-322
- Nowak AK, Lake RA, Kindler HL, Robinson BW. New approaches for mesothelioma: biologics, vaccines, gene therapy, and other novel agents. *Semin Oncol* 2002;29:82-96
- Qiao J, Doubrovin M, Sauter BV, Huang Y, Guo ZS, Balatoni J, Akhurst T, Blasberg RG, Tjuvajev JG, Chen SH, Woo SL. Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Ther* 2002;9:168-175
- Yazawa K, Fisher WE, Brunnicardi FC. Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J Surg* 2002;26:783-789
- Pierrefite-Carle V, Baque P, Gavelli A, Benchimol D, Bourgeon A, Milano G, Saint-Paul MC, Rossi B. Regression of experimental liver tumor after distant intra-hepatic injection of cytosine deaminase-expressing tumor cells and 5-fluorocytosine treatment. *Int J Mol Med* 2000;5:275-278
- Desaknai S, Lumnic K, Esik O, Hamada H, Safrany G. Local tumour irradiation enhances the anti-tumour effect of a double-suicide gene therapy system in a murine glioma model. *J Gene Med* 2003;5:377-385
- Tiraby M, Cazaux C, Baron M, Drocourt D, Reynes JP, Tiraby G. Concomitant expression of *E. coli* cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase improves the cytotoxicity of 5-fluorocytosine. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:41-49

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

• 临床经验 •

复方二甲基硅油对功能性肠胀气的疗效观察

徐可树, 丁震, 李云桥, 熊汉华

徐可树, 丁震, 李云桥, 熊汉华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
项目负责人: 徐可树, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. xuzou@medmail.com.cn
电话: 027-85726381
收稿日期: 2004-04-10 接受日期: 2004-04-20

摘要

目的: 评价复方二甲基硅油对功能性肠胀气的临床疗效及安全性 并探讨其治疗机制。

方法: 功能性肠胀气患者 54 例 采用随机分组平行对照的实验设计方法在应用复方二甲基硅油和安慰剂治疗后观察临床症状积分肠管积气量及肠排气次数的改变。

结果: 与安慰剂比较复方二甲基硅油能够明显降低功能

性肠胀气患者临床症状积分肠内胀气指数并增加肠排气次数(0.65±0.61 vs 1.83±0.49 45±21 vs 117±40 13±4 vs 8±3 *P* 0.01)。复方二甲基硅油治疗功能性肠胀气的总有效率为 88.9% 显著高于安慰剂的 29.6% (*P* 0.01)。

结论: 复方二甲基硅油能够减少肠内气体改善临床症状 且安全性好。

徐可树, 丁震, 李云桥, 熊汉华. 复方二甲基硅油对功能性肠胀气的疗效观察. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1742-1744

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1742.asp>

0 引言

肠胀气系指肠腔内过多的气体积聚导致患者出现腹

表1 功能性肠胀气患者治疗前后积分改变

分组	治疗前				治疗后				P
	主要症状		次要症状		主要症状		次要症状		
试验组	1.97	0.45	1.07	0.75	0.65	0.61	0.25	0.54	<0.01
对照组	1.93	0.41	0.91	0.85	1.83	0.49	0.78	0.80	>0.05

表2 功能性肠胀气治疗前后胀气指数与排气次数的变化

分组	肠胀气指数 cm ²				P	排气次数/日				P
	治疗前		治疗后			治疗前		治疗后		
试验组	107	51	45	21	<0.01	8	3	13	4	<0.01
对照组	122	62	117	40	>0.05	9	3	8	3	>0.05

部膨隆闷胀不适等症状. 病因有器质性病变也可以为功能性临床多见^[1]. 我们选用的复方二甲基硅油咀嚼片由武汉李时珍药业有限公司与上海医药工业研究所在仿制美国3M医药公司生产的™Titralac™ Antacid (替特雷克制酸剂)基础上新近研制而成其主要成分为碳酸钙和二甲基硅油前者能中和胃酸后者起消除胃肠道内积气的作用可用于缓解上腹疼痛饱胀不适烧心暖气反酸恶心呕吐等消化系统症状. 为研究其对功能性腹胀有无明确作用我科2003-02/2003-10月对54例功能性肠胀气患者采取随机分组平行对照方法以临床症状积分肠道排气次数和肠管积气量作为观察指标评价复方二甲基硅油对功能性肠胀气的疗效和安全性并探讨其治疗机制.

1 材料和方法

1.1 材料 所有来我科就诊患者均以腹胀为主诉在过去12 mo中至少出现12 wk无消化系统器质性疾病; X-ray腹平片检查提示肠胀气. 近1 wk内未服用过制酸药或胃肠动力药物. 根据随机分组平行对照方法分为治疗组和安慰剂对照组各27例. 两组性别(男/女: 13/14 vs 10/17) 年龄(44±11 vs 40±9)相似具有可比性.

1.2 试验方法 试验组服用复方二甲基硅油咀嚼片于餐后1 h及睡前30 min各服用1次 每次2片; 对照组服用复方二甲基硅油咀嚼片的安慰剂(由李时珍药业有限公司提供其颜色口味外观等方面与试验用药一致)于餐后1 h及睡前30 min各服用一次每次2片疗程均为7 d. 记录患者用药前及用药后腹胀(主要症状)及其他(次要症状)如上腹疼痛烧心暖气反酸恶心呕吐等症状的发作时间及程度. 其判断标准是: 无症状: 积分为0; 轻度: 感觉不舒服但可以忍受积分为1; 中度: 非常不舒服但不影响日常活动. 积分为2; 重度: 极其不舒服难以忍受并影响日常活动积分为3. 记录两组患者治疗前后排气次数. 依X线腹平片肠管胀气表面积(cm²)作为评估肠管胀气的量化指标. 受检

者上午09:00空腹未解大便取仰卧位以脐为中心上包括膈肌下至耻骨联合两侧包括腹壁软组织进行拍腹部平片. 用事先设计好的已知面积标尺(1 cm×1 cm的小方格组成)对照计量计算出肠管气体面积即肠胀气指数(cm²). 按下列公式计算用药后症状改善百分率. 改善百分率: (治疗前症状总积分 - 治疗后症状总积分)/治疗前症状总积分×100 并按下列标准评价疗效. 痊愈: 症状消失症状改善百分率等于100. 显效: 症状改善百分率大于等于80 不足100. 有效: 症状改善百分率大于等于50 不足80. 无效: 症状改善百分率小于50. 恶化: 症状改善百分率为负值. 痊愈 显效和有效病例计算总有效率. 并进行安全性评价及不良反应观察.

2 结果

复方二甲基硅油治疗后功能性肠胀气的症状积分较治疗前均明显下降与对照组比较有显著性差异($P<0.01$) 而对照组治疗前后相比较差异无显著性($P>0.05$) 见表1. 复方二甲基硅油治疗后肠胀气指数较治疗前显著下降 排气次数增多且与对照组比较差异有显著性($P<0.01$) 而对照组上述指标与治疗前比较差异无显著性($P>0.05$). 复方二甲基硅油对功能性肠胀气的总有效为88.9% 其中痊愈率显效率分别为25.9% 29.6 均显著高于对照组($P<0.01$). 无效率则明显低于对照组($P<0.01$), 见表2. 试验组患者自诉用药后皮疹和便秘1例 不良反应发生率为3.7. 治疗后ALT轻度升高1例 无临床症状 其他如血尿 粪常规肝 肾功能检查结果均正常.

3 讨论

正常人的胃肠道内约有气体150-200 mL 大部分存在于结肠内. 其中约70来源于吞入的空气20为血液中弥散入肠腔的气体剩下10由肠腔内食物残渣经细菌发酵分解产生. 气体排出的途径则有通过肛门排气及肠内积气向血液弥散等^[2-3]. 通常胃肠道内气

体保持动态平衡若上述的任何一环节发生障碍使气体排出减少或产生过多均可使胃肠道积气增多而引起腹胀. 对于腹胀的治疗由器质性病变所引起者首先是对因治疗; 而对于功能性腹胀而言则是对症处理. 通过减少肠道气体调节肠道功能而减轻腹胀. 临床常用药物有胃肠动力药及消化酶制剂等因病因不同而有所差异. 也有报道用二甲基硅油治疗非梗阻性肠胀气 但缺乏足够的试验依据^[4-6]. 复方二甲基硅油其主要成分是在二甲基硅油基础上加入碳酸钙每片含碳酸钙 420 mg 二甲基硅油 20 mg. 本品为咀嚼片剂型 制剂经咀嚼进入体内后成分散状药物很快均匀黏附于胃肠腔黏膜表面. 由于二甲基硅油表面张力较小 能消除胃肠道内的泡沫而泡沫内储存了大量的气体 因此可明显缓解腹胀. 我们通过肠胀气指数 肠道排气次数等指标将试验组和对照组相比发现有显著性差异($P < 0.01$) 说明二甲基硅油对腹胀有明显疗效. 此外 临床上所见大多数功能性肠胀气患者常伴有程度不同的烧心反酸恶心上腹不适等消化不良症状而制剂中的碳酸钙能迅速中和胃酸 作用稳定且持久反应所产生的二氧化碳气体又能被二甲基硅油所破坏. 因此 由二甲基硅油和碳酸钙所组成的制剂兼有消气和制酸的作用临床结果也显示其有效率达 88.9%. 在本次临床试验中服用复方二甲基硅油咀嚼片的患者 1 例出现皮疹和便秘

1 例 ALT 轻度升高 停药后均自行缓解. 因此 复方二甲基硅油咀嚼片对缓解功能性肠胀气方面具有疗效高 安全性好 临床应用方便及患者依从性好的特点 是比较理想的消化系统临床用药.

4 参考文献

- 1 Serra-Pueyo J. Intestinal gas and functional disorders of the gastrointestinal tract. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26:263-269
- 2 王进海, 罗金燕, 王学勤, 于祥艺. 思密达治疗功能性肠胀气的临床研究. *华人消化杂志* 1998;6:337-339
- 3 Laugel C, Rafidison P, Potard G, Aguadisch L, Baillet A. Modulated release of triterpenic compounds from a O/W/O multiple emulsion formulated with dimethicones: infrared spectrophotometric and differential calorimetric approaches. *J Control Release* 2000;63:7-17
- 4 Holtmann G, Gschossmann J, Mayr P, Talley NJ. A randomized placebo-controlled trial of simethicone and cisapride for the treatment of patients with functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1641-1648
- 5 Holtmann G, Gschossmann J, Karaus M, Fischer T, Becker B, Mayr P, Gerken G. Randomised double-blind comparison of simethicone with cisapride in functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1459-1465
- 6 Nair B. Final report on the safety assessment of stearoxy dimethicone, dimethicone, methicone, amino bispropyl dimethicone, aminopropyl dimethicone, amodimethicone, amodimethicone hydroxystearate, behenoxy dimethicone, C24-28 alkyl methicone, C30-45 alkyl methicone, C30-45 alkyl dimethicone, cetearyl methicone, cetyl dimethicone, dimethoxysilyl ethylenediaminopropyl dimethicone, hexyl methicone, hydroxypropyldimethicone, stearamidopropyl dimethicone, stearyl dimethicone, stearyl methicone, and vinyl dimethicone. *Int J Toxicol* 2003;22(Suppl 2):11-35

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

• 临床经验 •

根除幽门螺杆菌对胃窦萎缩性胃炎的改善作用

斯 镡, 刘芙成, 黎世尧, 廖 文, 杨 杰

斯镡, 刘芙成, 黎世尧, 廖文, 杨杰, 成都市第一人民医院消化科 四川省成都市 610016

项目负责人: 斯镡, 610016, 四川省成都市春熙路东段 2 号, 成都市第一人民医院消化科.

电话: 028-86673604 传真: 028-84421465

收稿日期: 2004-03-31 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 探讨根除幽门螺杆菌(*H pylori*)对慢性萎缩性胃炎(CAG)患者症状及胃黏膜萎缩(GA)的作用.

方法: CAG 患者 52 例 经胃镜快速尿素酶试验(RUT)及病理组织学检查诊断为胃窦CAG伴*H pylori*感染. 随机分为 A B 两组. A 组予洛赛克阿莫西林痢特灵治疗 1 wk 及对症治疗 B 组予对症治疗. 随访 1 a 记录治疗前 治疗后 1 mo 6 mo 12 mo 的症状积分(SSc). 1 a

后复查胃镜 RUT 及病理组织学.

结果: 完成试验 48 例: A 组 25 例 B 组 23 例. A 组 GA 改善率 36.0% B 组 8.7% 二者有显著差别($P < 0.025$). A 组 SSc 在治疗后 1 mo 6 mo 12 mo 均较治疗前明显下降($P < 0.01$) 且与 GA 改善与否无明显关系($P > 0.05$); B 组治疗后 6 mo 12 mo SSc 明显高于 A 组同期($P < 0.05$) SSc 降低值明显低于 A 组同期 ($P < 0.05$).

结论: 根除 *H pylori* 能使 CAG 患者的症状及胃窦 GA 明显改善.

斯镡, 刘芙成, 黎世尧, 廖文, 杨杰. 根除幽门螺杆菌对胃窦萎缩性胃炎的改善作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1744-1746

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1744.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染可导致胃黏膜萎缩(GA) 肠化(IM) 异型增生并发展至胃癌。GA IM被认为是胃癌的癌前状态。根除 *H pylori*能否使GA IM逆转尚有争议对慢性萎缩性胃炎(CAG)患者症状的影响报道较少。我们通过随机对照试验对本地区CAG患者进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 选择本市居住来我院行胃镜检查的患者中确诊为有 *H pylori*感染的胃窦CAG患者(符合2000年全国井冈山会议制定标准^[1]) 年龄65岁以下。排除标准:胃镜下见食管胃 十二指肠黏膜糜烂溃疡或疑恶性病变者;有幽门梗阻者;伴恶性贫血者;确诊为胃癌者;曾行胃部分切除术者;有严重心肺 肝 肾疾病者;妊娠及哺乳期妇女;长期摄入NSAIDs者;有精神异常或不合作者。纳入试验患者共52例 年龄36-63(平均54.1 7.4)岁。失访A组1例 B组3例。完成试验A组25例 男14例 女11例 平均年龄53.5 7.4岁。B组23例。男12例 女11例。平均年龄54.7 7.5岁。所有患者胃体未见萎缩。病理分级:A组GA轻度9例 中度12例 重度4例 伴IM7例(轻度5例,中度2例) 伴异型增生2例(轻 中度各1例)。B组GA轻度9例 中度11例 重度3例 伴IM4例(轻度3例 中度1例) 伴异型增生1例(中度)。两组患者年龄性别 病情程度SSc具有可比性($P>0.05$)。治疗前:胃镜下见CAG改变患者取活检行快速尿素酶试验(RUT)及病理组织学检查。按新悉尼系统标准^[2]于窦部(距幽门2-3 cm)大弯取黏膜1块 小弯2块 体部大弯(距贲门约8 cm大弯中部) 小弯(距胃角约4 cm)各1块 胃角1块。窦小弯1块做RUT 余黏膜分装送病理科检查。*H pylori*阳性标准:RUT及病检同时阳性^[3]。RUT采用海南南科公司生产的*H pylori*检测试纸。将新鲜胃黏膜置入试纸中央室温下观察5 min。试纸由黄色变为红色为 *H pylori*阳性 不变色为阴性。改良Giemsa染色发现 *H pylori*为阳性。据新悉尼系统标准^[2]将黏膜GA IM 异型增生各分为无轻 中 重四级分别以零 + ++ +++表示。窦(包括胃角) 体黏膜病变程度各以其病检所见最高级别为准。对患者消化不良症状(腹痛 腹胀 纳差 返酸 暖气 恶心等)进行评分。(1)症状程度:0分:无症状;1分:症状轻不影响工作不需服药;2分:有症状部分影响工作或需服药;3分:症状重必须全休服药。(2)症状频度:每月有症状为1分;每周有症状为2分;每日有症状为3分。根据症状程度及频度积分之和为症状评分总分(SSc)。

1.2 方法 将病例随机分A B两组。A组为抗 *H pylori*治疗组。予洛赛克20 mg Bid+阿莫西林1 g Bid+痢特灵0.1 g Bid联合治疗1 wk 同时辅以对症治疗(包

括胃舒平 硫糖铝 吗叮啉等)。B组为不抗 *H pylori*组 予对症治疗1 wk。所有患者1 wk后据症状间断予对症治疗。治疗后随访1 a。每月电话随访分别在1 mo 6 mo 12 mo时对患者进行症状评分需用药时指导服用对症治疗药物。1 a后复查胃镜RUT及病理组织学检查方法同前。以上检查分别由专人盲法操作。复查前1 mo禁用抗生素质子泵抑制剂H₂受体拮抗剂铋剂。病理组织学疗效判定:将GA IM异型增生组织学级别下降定为改善:其中消退或级别下降2级为显效 级别下降1级为有效 级别无变化定为无效 级别增加为加重。*H pylori*根除标准:RUT及病检同时阴性^[3]。

统计学处理 采用计算机PEMS软件进行统计。组内及组间SSc 治疗前后SSc差(SSc)比较采用 *t*检验 方差分析 秩和检验率的比较采用四格表 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 GA病理组织学变化 A组 *H pylori*根除22例 *H pylori*持续阳性3例。治疗后改善9例(36.0%):其中显效5例(轻度4例 中度1例 均为消退) 有效4例(中度) 无效16例(包括 *H pylori*持续阳性3例) 无加重病例。B组22例患者 *H pylori*持续阳性1例 *H pylori*转阴。治疗后改善2例(8.7%)(轻 中度各1例 均为消退)。无效20例(包括 *H pylori*阴转者) 加重1例(中度)。两组均未出现胃体黏膜萎缩。两组比较有显著差别A组GA改善率明显高于B组(表1)。

表1 两组GA病理组织学变化比较

分组	n	好转(显效+有效)		无效		加重	
		n	%	n	%	n	%
A	25	9 (5+4)	36.0	16	64.0	0	0.0
B ^a	23	2 (2+0)	8.7	20	87.0	1	4.4

χ^2 检验, ^a $P<0.025$, vs A组。

2.2 治疗后SSc变化 SSc(*t*检验):治疗前及治疗后1 mo 两组无显著差别。治疗后6 mo 12 mo A组明显低于B组。

SSc(秩和检验):治疗后1 mo两组无显著差别治疗后6 mo 12 mo A组明显高于B组。A组SSc(方差分析):治疗前明显高于治疗后1 mo 6 mo 12 mo ($P<0.01$) 治疗后三期两两比较无明显差别 ($P>0.05$)。SSc治疗后三期两两比较无明显差别(秩和检验 $P=0.5388$)。B组SSc(方差分析):治疗后三期两两比较无明显差别 ($P=0.1291$)。

SSc(秩和检验)治疗后1 mo高于治疗后6 mo ($P<0.01$) 1 mo与12 mo 6 mo与12 mo比较无显著差别 ($P>0.05$) (表2)。A组GA改善患者(A₁组)与未改善患者(A₂组)SSc变化情况比较。经 *t*检验及秩和检验:两组治疗后同期

SSc SSc 比较无明显差别($P>0.05$).

2.3 IM 异型增生病理组织学变化 A组7例IM患者(*H pylori*均根除) 1例轻度显效(消退) 1例中度有效 其余5例无效. 2例异型增生(1例*H pylori*持续阳性)无效. B组4例IM及1例异型增生患者*H pylori*持续阳性 病理组织学无变化.

表2 CAG 两组 SSc 变化比较(mean SD 或 M)

t/mo	A (n=25)		B (n=23)		P_{SSc}	P_{SSc}
	SSc	SSc	SSc	SSc		
0	6.48±3.34	-	6.57±3.41	-	0.9307	
1	4.28±2.65	2 ¹	4.47±2.69	2.09±1.16	0.7986	0.8152
6	3.40±2.36	3.08±2.9	5.52±3.07	1 ¹	0.0098	<0.05
12	3.12±2.54	3.36±2.97	5.13±2.82	1.43±1.31	0.0125	<0.05

M: 中位数, 1:中位数.

3 讨论

*H pylori*增加胃癌的危险性与其感染后发生的GA IM及其严重程度密切相关^[4]. 根除*H pylori*能否使GA IM逆转 目前尚无统一意见. Hojo *et al*从PubMed检索了至2001-06为止发表的1066篇相关论著从中选择了51篇采用新悉尼系统作为胃炎诊断标准和讨论根除*H pylori*对GA IM影响的报道进行分析. 结果显示25篇论著中11篇报道根除*H pylori*后萎缩显著改善但4项大样本(>100例)中1项研究和5项长期(>12 mo)观察中2项研究未发现GA改善. 28篇论著中有5篇报道IM得到显著改善^[5]. 在我国山东进行的大规模研究表明^[6]: 根除*H pylori*1 a后胃窦GA IM变化与安慰剂组相比无明显差别. 但*H pylori*持续感染组胃体萎缩增加. 随访5 a后发现^[7] *H pylori*根除后胃窦IM明显改善 胃窦及胃体GA无好转. 而*H pylori*持续感染组GA IM明显加重.

以上研究表明根除*H pylori*可使部分GA IM改善或逆转. 目前的研究结果相互矛盾可能与活检取材 组织学解释随访时间研究方法地区 种族感染*H pylori*菌株差异等因素有关. 据此 我们采用随机对照试验按新悉尼系统要求活检取材及组织学诊断 对本地区(成都市)*H pylori*感染的胃窦CAG患者进行了研究. 结果发现: 根除*H pylori*1 a后9例患者GA得到改善其中4例轻度及1例中度萎缩消退改善率显著高于对照组(36.0% vs 8.7%). 提示对本地区CAG患者根除*H pylori*后GA可望逆转. 根除*H pylori*对CAG患者症状改善方面的研究较少. Kamada *et al*^[8]对90例

胃体GA患者随访3 a的研究发现根除*H pylori*组消化不良症状明显减轻而对照组无明显变化. 本研究首次对CAG患者根除*H pylori*后不同时期症状变化进行了细致的研究. 我们对患者治疗前及治疗后1 mo 6 mo 12 mo分别进行症状评分发现: 治疗组在根除*H pylori*及对症治疗后1 mo SSc较治疗前明显下降 在6 mo 12 mo时SSc与1 mo时无明显差别但呈下降趋势. 提示根除*H pylori*后 随着时间延长患者症状有可能进一步减轻. 对照组在对症治疗后1 mo与A组同期SSc SSc比较无明显差别. 而在6 mo 12 mo时SSc有升高趋势明显高于A组同期 SSc则明显低于A组同期. 提示B组患者经对症治疗后症状短期内能得到一定程度缓解但易反复难以持久. 而根除*H pylori*有利于CAG患者症状的减轻随着时间延长症状有进一步缓解趋势明显优于对照组. CAG患者根除*H pylori*后GA改善与未改善两亚组比较SSc降低情况无明显差别. 提示患者症状减轻并不完全依赖于GA的改善. 本文中GA改善均为轻中度CAG患者4例重度无1例组织学减轻. 故根除*H pylori*对GA的疗效是否与病情程度有关需扩大样本进一步分析. 治疗组中7例IM患者*H pylori*根除后1例消退,1例减轻而对照组4例*H pylori*持续阳性IM患者组织学无变化. 似乎治疗组疗效优于对照组但因例数太少无法得出结论.

4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会. 全国慢性胃炎研讨会共识意见. 中华消化杂志 2000;5:77-79
- 2 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis the updated Sydney System. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181
- 3 中华医学会消化病学分会. 幽门螺杆菌共识意见(2003 安徽桐城). 中华消化杂志 2004;24:126-127
- 4 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789
- 5 Hojo M, Miwa H, Ohkusa T, Ohkura R, Kurosawa A, Sato N. Alteration of histological gastritis after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1923-1932
- 6 Sung JJ, Lin SR, Ching JY, Zhou LY, To KF, Wang RT, Leung WK, Ng EK, Lau JY, Lee YT, Yeung CK, Chao W, Chung SC. Atrophy and intestinal metaplasia one year after cure of *H pylori* infection: a prospective, randomized study. *Gastroenterology* 2000;119:7-14
- 7 Zhou L, Sung JJ, Lin S, Jin Z, Ding S, Huang X, Xia Z, Guo H, Liu J, Chao W. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H pylori* eradication. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:11-14
- 8 Kamada T, Haruma K, Hata J, Kusunoki H, Sasaki A, Ito M, Tanaka S, Yoshihara M. The long-term effect of *Helicobacter pylori* eradication therapy on symptoms in dyspeptic patients with fundic atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18:245-252

彩色多普勒超声诊断慢性非结石性胆囊炎的意义

石华, 陈文卫, 周青, 郭瑞强

石华, 陈文卫, 周青, 郭瑞强, 武汉大学人民医院超声科
湖北省武汉市 430060
项目负责人: 石华, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院超声科.
电话: 021-63610109-73403
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 探讨应用高分辨率高灵敏度彩色多普勒超声对慢性非结石性胆囊炎诊断的可行性及其意义。

方法: 胆囊壁增厚组 86 例 选择胆囊结石患者 63 例作为对照组 将其测得的血流参数与正常组相比较。

结果: 胆囊结石与慢性胆囊炎患者之间的血流参数无显著性差异($P > 0.05$) 而二者与正常组之间存在显著性差异($P < 0.01$)。单纯胆囊壁增厚组与正常组之间无差异($P > 0.05$)。三项参数中以阻力指数(RI)最为敏感。

结论: 二维超声仅以胆囊壁增厚不能诊断慢性胆囊炎利用血流参数的变化结合二维超声临床表现有利于慢性胆囊炎的诊断。

石华, 陈文卫, 周青, 郭瑞强. 彩色多普勒超声诊断慢性非结石性胆囊炎的意义. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1747-1749
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1747.asp>

0 引言

慢性非结石性胆囊炎少见诊断比较困难. 仅以二维超声观察胆囊壁的厚度作出诊断常常误诊. 高分辨率高灵敏度彩色多普勒超声(CDFI)应用于临床使腹腔脏器的小血管血流的显示得到很大的提高. 我们对胆囊壁内的动脉血流进行检测 探讨在诊断中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 1999-05/2001-03慢性非结石性胆囊炎患者86例 为胆囊壁增厚组 全部患者均有不同程度右上腹疼痛 二维超声未发现胆囊结石胆总管结石胆囊壁厚度0.25-0.4 cm. 年龄24-56(平均38)岁. 选择胆囊萎缩不明显 胆囊壁厚度0.3-0.5 cm的胆囊结石患者为对照组 63例 年龄18-42(平均35岁). 正常组为大专院校体检中抽选的无肝胆胃肠心脏疾病的健康人24名 年龄28-48(平均46.5岁). 使用美国Acuson Sequoia-512型彩色多普勒超声仪. 探头频率4MHz. 设朝向探头的红色血流为胆囊壁内动脉血流。

1.2 方法 患者空腹平卧位探头由肋间取胆囊长轴

测量胆囊的最大长径和宽径壁的厚度. 当胆囊明显折叠时 则分段测量. 在距胆囊颈1 cm左右处寻找彩色血流点局部放大. 嘱患者屏住呼吸将脉冲多普勒取样容积置于该点获取频谱记录收缩期最大峰值流速(V_s) 舒张末期流速(V_d)及阻力指数(RI).

统计学处理 所有数据资料以平均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示 作 t 检验和直线相关分析。

2 结果

正常胆囊平均大小为6.70 cm \times 3.25 cm 囊壁厚度0.2 cm. 胆囊结石组大小平均为5.16 cm \times 2.98 cm 囊壁厚度0.3-0.5 cm. 囊内有单个结石多个结石结石大小不等. 胆囊壁增厚非结石组胆囊平均大小为5.98 cm \times 3.15 cm 囊壁厚度0.25-0.4 cm. 彩色血流显像及频谱正常组24例 中2例未显示血流点显示率91.7% 3例因呼吸不稳未取到频谱频谱显示率87.5%. 胆囊结石组有9例未显示血流信号频谱显示率为85.7%. 胆囊壁增厚非结石组有8例因肥胖肠气等因素未显示彩色血流信号. 血流参数总显示率为90.7%。

正常组胆囊壁内正常的动脉血流表现为收缩期上升快下降缓慢波峰圆钝全舒张期位于基线以上的血流波形. 胆囊结石组胆囊壁内动脉血流表现为收缩期上升快下降快波峰尖锐的波形呈低速高阻. 胆囊壁增厚非结石组胆囊壁内动脉血流频谱69例与正常组相似占88.5%. 9例血流波形与胆囊结石组相一致占11.5% 9例患者参与脂肪餐实验表现胆囊收缩功能的异常结合临床诊断为慢性非结石性胆囊炎(表1)。

表1 胆囊壁内动脉血流参数测值表

分组	n	V_s (m/s)	V_d (m/s)	RI
正常	22	0.197 \pm 0.047	0.063 \pm 0.041	0.686 \pm 0.110
胆囊结石	54	0.228 \pm 0.066	0.041 \pm 0.030	0.828 \pm 0.008 ^b
胆囊壁增厚	69	0.141 \pm 0.09	0.047 \pm 0.030	0.675 \pm 0.050
慢性胆囊炎	9	0.214 \pm 0.041	0.038 \pm 0.001	0.830 \pm 0.020 ^b

^b $P < 0.01$, vs 正常组.

3 讨论

单纯性胆囊壁增厚常常继发于其他的一些疾病如肝脏疾病胃肠道疾病等. 胆囊壁仅仅只表现为增厚而结构上没有器质性病变^[1-2]. 我们利用高分辨率高灵敏度彩色多普勒超声探查胆囊动脉看出正常组与单纯

胆囊壁对照无显著性差异($P=0.05$) 而与胆囊结石组 慢性胆囊炎组有显著性差异($P<0.01$). 胆囊结石组与慢性胆囊炎组由于其病理改变相同 导致血管变细 阻力增加 因此二者对照无显著性差异($P>0.05$). 三个参数中以 RI 最为敏感. 当二维超声显示胆囊壁增厚 而胆囊腔内未见结石 CDFI 显示胆囊动脉纤细 动脉阻力明显增高 RI >0.8 时 结合临床表现有助于该病的诊断与鉴别诊断.

影响 CDFI 显像的因素在正常组及胆囊壁增厚组主要是患者肥胖肠气干扰频谱的获得关键在于患者是否会屏气. 而在胆囊结石组是由于反复发作的炎症导致胆囊壁纤维化使血管变细或减少甚至闭塞影响了彩色血流的显示^[3]. 单纯的二维超声仅以胆囊壁的增厚来诊断慢性非结石性胆囊炎常常会导致误诊给患者增加了不必要的负担. 而脂肪餐实验也没有特异

性 长期饮酒 慢性肝炎及溶血性贫血患者等都可能 在胆囊内出现沉积物其临床意义不大但可以影响胆囊的收缩功能; 老年人及胆囊管畸形的患者也可导致胆囊收缩功能的异常. 因此仅仅依据脂肪餐实验单指标慢性胆囊炎是不可靠的.

高分辨率的CDFI能使胆囊壁内的动脉血流易于显示 通过所测得的血流参数结合二维图像的改变及临床表现有利于慢性非结石性胆囊炎的诊断.

4 参考文献

- 1 程黎阳, 陈国忠, 钟世镇, 李志华. 肝硬化时胆囊壁增厚的机制及其临床意义. *中华肝胆外科杂志* 2003;8:506-507
- 2 Yamada K, Yamada H. Gallbladder wall thickening in mononucleosis syndromes. *J Clin Ultrasound* 2001;29:322-325
- 3 Panzera F, Ghisio S, Grosso A, Vigezzi P, Vitale M, Cariaggi RM, Mistrangelo M. Laparoscopic cholecystectomy. Our experience. *Minerva Chirurgica* 2000;55:489-492

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

• 临床经验 •

ERCP 对梗阻性黄疸病因的诊断价值

叶震世, 钟燕, 吴艳环, 郭明玉, 蔡志萍, 任建林

叶震世, 钟燕, 吴艳环, 郭明玉, 蔡志萍, 任建林, 厦门大学医学院第一临床学院厦门中山医院消化内科 福建省厦门市 361004
项目负责人: 叶震世, 361004, 福建省厦门市, 厦门中山医院消化内科.
电话: 0592-2292387 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2003-09-15 接受日期: 2003-10-27

摘要

目的: 探讨ERCP对梗阻性黄疸病因的诊断价值.

方法: 对74例梗阻性黄疸行ERCP检查并与术后诊断比较 其中41例同时有ERCP B超及CT检查 比较三者诊断的符合率.

结果: 本组示恶性胆道梗阻36例 占48.6%; 良性梗阻38例 占51.4%. 与术后诊断比较ERCP对胆总管结石的诊断符合率96.9%. 对恶性肿瘤诊断符合率77.8% 主要是胰腺癌 胆管癌胆管癌及壶腹周围癌等. 41例中ERCP对梗阻性黄疸病因的诊断率明显高于B超及CT($P<0.05$).

结论: ERCP对梗阻性黄疸具有较高的诊断价值优于B超和CT.

叶震世, 钟燕, 吴艳环, 郭明玉, 蔡志萍, 任建林. ERCP对梗阻性黄疸病因的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1748-1749

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1748.asp>

0 引言

在梗阻性黄疸的病因诊断中影像学检查起很重要的作用. 随着ERCP术的广泛应用现已成为胆胰疾病诊治的主要手段之一. 本文总结我院1996/2003年74例行ERCP检查 并经手术证实的梗阻性黄疸患者现报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料 1996-08/2003-05 梗阻性黄疸74例行ERCP并接受手术治疗. 其中4例行内镜乳头括约肌切开(EST)取石 1例经内镜行内镜鼻胆管引流术. 其余均经手术或病理证实. 41例有完整影像学资料(B超 CT ERCP). 男38例 女36例, 年龄13-84(平均57.6)岁.

1.2 方法 ERCP用拉直法操作胰管拍片取俯卧与仰卧位 胆管取俯卧位仰卧位立位及左右斜位. ERCP术后行手术治疗.

2 结果

良性胆道梗阻38例(51.4%) 恶性胆道梗阻36例(48.6%). 胆管结石胰腺癌胆管癌共60例 占81.1% 其他病因14例占18.9%. ERCP诊断符合率见

表1. ERCP检查后2例出现术后胰腺炎未见其他严重并发症. 41例同时有ERCP B超 CT检查三者诊断符合率分别为90.2% 62.9% 82.9% 采用 χ^2 检验 $P < 0.05$ (表2).

表1 梗阻性黄疸 ERCP与术后诊断比较

诊断	手术(n)	ERCP(n)	符合率 %
恶性疾病胰腺癌	16	13	81.2
胆管癌	12	9	75.0
胆囊癌	2	2	100.0
壶腹周围癌	6	4	66.7
良性疾病胆总管结石	32	31	96.9
先天性胆总管囊肿	4	4	100.0
胆总管炎性狭窄	1	1	
乳头炎	1	1	

表2 ERCP B超及CT对梗阻性黄疸的病因诊断

病因	n	ERCP		B超		CT	
		正确	误诊	正确	误诊	正确	误诊
胰腺癌	8	6	2	5	3	7	1
胆管癌	5	4	1	2	3	4	1
壶腹周围癌	3	3	0	2	1	3	0
胆总管结石	21	20	1	17	4	18	3
先天性胆总管囊肿	2	2	0	1	1	2	0
胆总管炎性狭窄	1	1	0	0	1	0	1
乳头炎	1	1	0	0	1	0	1
合计	41	37	4	27	14	34	7

3 讨论

胆总管结石 胰腺癌 胆管癌为梗阻性黄疸的常见的病因. 本组这3种疾病共占81.1%. 比国内报道^[1]高. ERCP对梗阻性黄疸是一种既准确又安全的诊断方法. 其诊断的价值在于确定梗阻性质部位和范围可以进行细胞刷检活检 胆胰液分析等. 能够为临床决定治疗方案手术方式提供重要的参考资料. B超 CT虽为无创检查但不能全面清晰显示胆胰管情况在一些不典型的病例对病因的诊断较困难. 多数临床研究均表明ERCP对胆胰疾病的诊断优于B超 CT等^[2,3]. 本组41例梗阻性黄疸 ERCP的病因诊断率高于B超和CT三者对比差异有显著意义.

ERCP是确诊胆管结石的重要方法. 本组32例手术证实的胆管结石 ERCP诊断符合率为96.9%. B超对

胆总管结石的诊断由于胆总管下端位于十二指肠背侧 受腹腔气体和肥胖影响其诊断准确率只有60%左右 较易漏诊而ERCP达90%以上^[4]. CT对胆红素结石无法显示且受设备分辨率高低分层厚度等的影响大. 本组三者相比以ERCP为高. ERCP不仅可直观胆石的大小数目部位而且可及时对胆总管结石进行EST后取石达到诊断和治疗同时进行这是其他影像学检查所不能比拟. ERCP是诊断胰腺癌的主要方法之一. 其ERCP的胰管像以闭塞和狭窄像最常见. 主要表现主胰管在头体或尾截然中断可伴有侧枝破坏. 梗阻端显不规则充盈缺损结节状或鼠尾状. 恶性狭窄多为单发突然狭窄后均匀扩张狭窄处分枝消失. 与慢性胰腺炎常呈多发缓慢狭窄狭窄后不扩张狭窄段短及狭窄可见扩张的胰管分枝有区别但有时二者不易鉴别. 如本组一例ERCP显示胰管狭窄其上部胰管扩张误为胰腺癌. 手术证实是慢性胰腺炎. 本组ERCP B超 CT的诊断符合率为6/8 5/8 7/8.

ERCP在早期诊断胆管癌方面明显优于B超及CT 其诊断符合率可达90.3%^[5]. 胆管癌ERCP的主要表现是狭窄 充盈缺损或梗阻. 常伴有管壁僵硬病变以上胆管普遍扩张. 当表现为充盈缺损像时易与结石相混淆. 本组手术证实胆管癌9例 符合率75%. 误诊2例手术证实为胆管下端炎性狭窄. 因结石炎症所致. 另1例术后病理诊断为肝细胞癌. ERCP是确诊乳头壶腹癌首选方法. 可见乳头不规则结节隆起充血糜烂坏死 溃疡及菜花样改变. 可进行活检. 本组中有3例活检仅为炎症改变只是手术证实为壶腹部癌. 本组ERCP诊断先天性胆总管囊肿4例. 这4例以腹痛黄疸 淀粉酶升高诊为胰腺炎收入院. ERCP显示胆总管显著扩张呈椭圆形 最大横径5 cm 形似肿大胆囊 密度均匀轮廓光滑胆囊充盈良好均经手术证实. 总之 ERCP对梗阻性黄疸病因的诊断符合率高 优于B超和CT. 特别是随着内镜技术的发展治疗性ERCP的广泛应用, 更显示出其不可替代的作用.

4 参考文献

- 任旭, 王义录, 李洪松, 唐季芬, 李秀梅, 李艳华, 原龙. 逆行胰胆管造影对梗阻性黄疸的诊断价值. 中华消化内镜杂志 1996;13:17-19
- 林国伟, 李剑英. ERCP对胰胆疾病的诊断价值. 中国内镜杂志 1999;5:27
- 杨玉秀, 李修岭, 樊晓明, 张延瑞, 齐玉芬, 李怀斌. ERCP对胰胆疾病的诊断价值 - 附732例分析. 中国内镜杂志 1998;4:63-64
- 刘厚钰, 姚礼庆. 现代内镜学. 第1版. 上海: 复旦大学出版社, 2001:190-192
- 李兆申. 中国ERCP研究现状. 世界华人消化杂志 2000;8:446-448

扶正养阴方与高强度超声聚焦联用对晚期肝癌疗效的探讨

潘锦瑶, 马军, 贾林, 周永健, 李瑜元

潘锦瑶, 马军, 贾林, 周永健, 李瑜元, 广州市第一人民医院
广东省广州市 510180
项目负责人: 潘锦瑶, 510180, 广东省广州市盘福路1号, 广州市第一人民医院中医科, mj53@china.com
电话: 020-81048519
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-03-12

摘要

目的: 观察扶正养阴方联用高强度超声聚焦(HIFU)对晚期肝癌的疗效及其减毒增效作用。

方法: 60例晚期肝癌患者随机分HIFU治疗组和HIFU联用中药组中药以扶正养阴方加减定期观察HIFU术前术后体温肝功能甲胎蛋白(AFP)及肿瘤大小的变化。

结果: HIFU术后多数患者有不同程度的发热及肝功能的损伤而中药联用组在治疗2 wk内体温及肝功能(如ALT)明显改善明显优于单纯HIFU治疗组; 两组的肿瘤大小及AFP较治疗前获得明显好转但两组比较无显著差异。

结论: 扶正养阴方能有效减轻HIFU术后造成的发热及肝功能损伤等不良反应改善病情。

潘锦瑶, 马军, 贾林, 周永健, 李瑜元. 扶正养阴方与高强度超声聚焦联用对晚期肝癌疗效的探讨. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1750-1751

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1750.asp>

0 引言

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一对早期原发性肝癌手术是首选方法对于晚期或有扩散的肝癌非手术治疗成为重要的治疗手段^[1-2]. 高强度超声聚焦(HIFU)是近年逐渐被推广的体外无创的强效祛除肝癌病灶的物理疗法效果良好但在治疗的过程中常会出现发热肝功能损伤等不良反应中药扶正养阴方能改善这些不良反应改善患者的生活质量。

1 材料和方法

1.1 材料 本组晚期肝癌患者共60例其中原发性肝癌53例转移性肝癌7例男46例女14例年龄29-79岁病灶直径在5-15 cm之间均经影像学及病理组织学确诊上述患者均不能行根治手术或不耐受强烈放化疗重要器官功能基本正常肝功能Child分级为A或B。

1.2 方法 所有病例随机分成两组:HIFU治疗组和联用组每组各30例.HIFU治疗组中仅以HIFU加常规对症治

疗剂量和疗法参照伍烽方法^[3]. 联用组则在HIFU治疗组基础上加服扶正养阴方加减(主要包括黄芪太子参石斛花粉麦冬茵陈蛇舌草虎杖半枝莲板蓝根鳖甲和全蝎等)每日1次1 wk为1疗程.HIFU治疗系统为海扶JC-1型高强度聚焦超声肿瘤治疗系统治疗探头参数: 频率0.8 MHz 焦距135-160 mm 声功率160-230 W 由诊断B超引导定位和监测下治疗累计治疗时间85-304.3 min. 观测指标: 治疗前及治疗后1 wk 2 wk的肿瘤影像学情况体温AFP(原发性肝癌患者)肝功能(如ALT)及临床症状的变化。

统计学处理 所有数据经SPSS统计软件包处理组间比较采用*t*检验以*P*<0.05表示有显著意义。

2 结果

结果显示:(1)临床疗效: 两组在治疗后的肝癌肿瘤大小明显缩小AFP值较治疗前明显下降(*P*<0.05)但两组之间的差异无统计学意义(表1)。(2)体温变化: HIFU治疗后两组均存在不同程度的体温升高1 wk后两组体温都有所回降其中联用组的下降幅度更大第2 wk时的平均体温基本降至正常明显优于HIFU单纯治疗组(*P*<0.05 表2)。(3)肝ALT变化: 两组的肝ALT值于HIFU治疗后均有明显升高治疗1 wk后两组之间无明显差异但2 wk后联用组的ALT值基本恢复到术前水平而HIFU单纯治疗组的回降相对缓慢两组比较有显著差异(*P*<0.05 表2)。

表1 治疗前后肿瘤大小及AFP的变化情况(mean±SD)

	联用组		HIFU组	
	前	后	前	后
肿瘤大小 (cm ³)	10.02±4.43	3.80±2.15 ^a	8.87±4.52	4.21±3.02 ^a
AFP (μg/L)	370.32±200.62	152.76±106.58 ^a	460.26±257.86	203.54±117.43 ^a

^a*P*<0.05 vs 治疗前。

表2 治疗前后平均体温及ALT的变化情况(mean±SD)

		术前	术后	术后1 wk	术后2 wk
		体温	36.72±0.63	37.88±0.87	37.43±0.61 ^a
()	HIFU组	36.69±0.56	7.91±0.76	37.79±0.58	37.53±0.32
ALT	联用组	67.32±22.52	89.71±30.51	87.61±23.34	70.81±30.13 ^a
(U/L)	HIFU组	70.08±26.87	93.64±27.60	90.86±32.33	86.30±36.78

^a*P*<0.05 vs HIFU组。

3 讨论

HIFU为一种无损的有效的局部治疗手段可将超声能量聚集于体内深部组织在短时间内使聚焦区能量迅速积聚使组织温度在几秒内上升到70度利用高温空化效应等物理作用破坏靶细胞或肿瘤细胞造成靶细胞的凝固性不可逆坏死从而杀死肿瘤细胞而对其他正常组织不产生多余热量的方法;由于肿瘤外组织照射时间短热量来不及交换而损伤较小实现对治疗目标进行精确选择治疗为肿瘤的微创治疗开辟了广泛的应用前景^[4]此新技术用于肝癌的治疗越来越受到重视^[5-6]。但HIFU作为热疗方法之一对周围正常组织仍有一定程度的损伤造成肝细胞炎性坏死转氨酶升高和肝功能损伤等一系列不良反应由于肿瘤坏死组织的吸收可导致患者术后发热甚至高热等如得不到有效的处理势必会影响HIFU的疗效和患者生活质量不利于病情的恢复。

中医认为聚焦超声波属热毒之邪其在有效杀伤癌细胞的同时亦损伤肌体邪热伤津耗气灼伤阴液影响气血生化致气阴两伤造成临床上诸多的不良反应。我们针对HIFU术后的这种病机特点充分发挥中医药的优势提出了以益气养阴扶正固本清热护肝解毒为主的治疗方法拟定了扶正养阴方其中以黄芪太子参石斛花粉麦冬扶正生津培本固源茵陈护肝退黄蛇舌草虎杖半枝莲板蓝根清热解毒结合鳖甲全蝎活血软坚全方

攻补兼施培补而不助邪攻伐而不伤正临床研究表明其明显改善患者的精神状态增进食欲减轻发热腹痛胁痛等临床症状增加对HIFU治疗的耐受性^[7]。实验表明扶正养阴方可显著缓解患者的术后发热和肝功能损害证实其在改善肝功能减轻发热等方面确有良效而在遏制肿瘤方面HIFU起主导地位中药的作用相对较弱。由此可知HIFU和扶正养阴中药在肝癌治疗中的作用和地位是不同的二者联用具有取长补短相互协同的作用值得在临床上推广应用。

4 参考文献

- Zibari GB, Riche A, Zizzi HC, McMillan RW, Aultman DF, Boykin KN, Gonzalez E, Nandy I, Dies DF, Gholson CF, Holcombe RF, McDonald JC. Surgical and nonsurgical management of primary and metastatic liver tumors. *Am Surg* 1998;64:211-221
- Lin DY, Lin SM, Liaw YF. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:S319-S328
- 伍烽, 陈文直, 白晋, 刘长安, 罗亿治, 邹建中, 徐昆, 朱辉, 王芷龙, 王智彪. 高强度聚焦超声治疗原发性肝癌的初步临床研究. *中华超声影像学杂志* 1999;8:213-216
- Hill CR, ter Haar GR. Review article: High intensity focused ultrasound-potential for cancer treatment. *Br J Radiol* 1995; 68:1296-1303
- Sanghvi NT, Hawes RH. High-intensity focused ultrasound. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1994;4:383-395
- Yang R, Reilly CR, Rescorla FJ, Faught PR, Sanghvi NT, Fry FJ, Franklin TD Jr, Lumeng L, Grosfeld JL. High-intensity focused ultrasound in the treatment of experimental liver cancer. *Arch Surg* 1991;126:1002-1009
- 潘锦瑶, 贾林, 李瑜元. 高强度聚焦超声治疗肝癌以及中药的减毒增效作用. *广州医药* 2001;32:54-56

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

• 临床经验 •

慢性胃炎患者临床症状与幽门螺杆菌感染的相关性

李园, 吴本俨

李园, 吴本俨, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
项目负责人: 李园, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼消化实验室。

电话: 010-66936735 传真: 010-66935470
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-06-16

摘要

目的: 探讨成人上腹不适症状与 *H pylori* 感染的相关性。

方法: 有上腹不适症状经胃镜检查诊断为慢性胃炎的患者533例近1 mo内未服用抗菌药物行¹³C尿素呼气试验(¹³C-UBT)检测 *H pylori* 感染情况观察 *H pylori* 感染与慢性胃炎临床症状之间的关系。对 *H pylori* 感染阳性并接受正规抗 *H pylori* 治疗及随访的158例患者观察治疗前

后的临床症状变化。

结果: 在533例患者中 *H pylori* 阳性者286例 阳性率53.7%。 *H pylori* 阳性患者中腹痛腹胀反酸或烧心嗝气食欲差和其他症状的发生率分别为44.8% 42.3% 40.2% 23.4% 7.7%和20.3%; 而 *H pylori* 阴性患者上述症状的发生率分别为38.9% 35.6% 23.9% 23.9% 4.9%和16.2%。除反酸烧心症状与 *H pylori* 感染相关($P < 0.05$)外 其余症状与是否有 *H pylori* 感染差异无显著性。反酸烧心症状在 *H pylori* 被根除后有73.3%的患者症状好转或消失与未被根除者之间差异有显著性($P < 0.05$)。同时在 *H pylori* 被根除后其余症状改善率在 *H pylori* 被根除和未被根除比

较 差异无显著性($P>0.05$).

结论: 成人 *H pylori* 感染者反酸烧心症状发生率明显高于无 *H pylori* 感染者 抗 *H pylori* 治疗则有助于症状的缓解.

李园, 吴本严. 慢性胃炎患者临床症状与幽门螺杆菌感染的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1751-1753

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1751.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori* *H pylori*)是全球人群感染最广泛的致病菌自然人群中 *H pylori* 的感染率相当高 有报道 *H pylori* 感染率可达 70%^[1]. *H pylori* 是上消化道疾病的重要致病因子因此人们对其致病性较为重视. 有研究发现儿童腹痛腹胀 呕 吐 上消化道出血等临床症状与 *H pylori* 感染相关^[2] 但临床症状不如成人典型少有 暖气反酸等症 胃 溃 疡 较 少 见. 有上消化道症状的儿童 *H pylori* 感染率明显高于无 症 状 对 照 组^[3-4] 且 *H pylori* 的感染率有随年龄增加而逐步增高的趋势^[5-6]. 据报道儿童与成人 *H pylori* 感染也存在差异^[7-9] 其原因尚不完全清楚从病理改变来说 儿童 *H pylori* 感染合并淋巴样滤泡高于成人且黏膜巨噬细胞浸润较明显 *H pylori* 与胃黏膜黏附形式也不同. 但儿童伴肠黏膜化生胃黏膜萎缩不典型增生黏膜相关淋巴样淋巴瘤(MALT)较少 且成人 与 *H pylori* 相关的炎性息肉增生性息肉恶性贫血等在儿童也极为罕见 提示存在某种与年龄相关的宿主方面反应上的差异^[10]. 而在成人上腹不适症状与 *H pylori* 感染有无

相关性我们对此进行初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 2000-03/2003-12 因上腹不适来诊经胃镜检查诊断为慢性胃炎同时上腹部 B 超检查未发现肿瘤及其他肝胆胰疾病无腹部手术史近 1 mo 内未服用抗菌药物的患者共 533 例.

1.2 方法 所有患者均行 ¹³C 尿素呼气试验(¹³C-UBT) 检测 *H pylori* 感染情况. 根据检测结果分为 2 组 即 *H pylori* (+)组和 *H pylori* (-)组 详细询问每位患者的临床症状 分别统计两组患者腹痛腹胀 反酸或烧心 暖气 食欲减退及其他症状发生率观察 *H pylori* 感染与慢性胃炎临床症状之间的关系. 对 *H pylori* 感染(+)者 按正规三联疗法(质子泵抑制剂+2种抗生素)治疗 10-14 d 停药后 1 mo 复查 ¹³C-UBT 观察 *H pylori* 根除前后临床症状的变化.

统计学处理 所得数据采用 χ^2 检验

2 结果

2.1 临床症状与 *H pylori* 感染的相关性 所有 533 例患者中 *H pylori* (+)286 例 年龄 16-89 岁 男 185 例 女 101 例; *H pylori* (-)247 例 年龄 17-85 岁 男 141 例 女 106 例. 2 组性别及年龄组成比较均无显著性差异. *H pylori* (+)者各症状发生率均较 *H pylori* (-)者 高 但仅反酸或烧心症状差异有显著性($\chi^2=9.55 P<0.05$) 其余症状在两组中均无显著性差异(表 1).

表 1 临床症状与 *H pylori* 感染的相关性 n (%)

<i>H pylori</i>	n	腹痛	腹胀	反酸或烧心	暖气	食欲减退	其他
+	286	128 (44.8)	121 (42.3)	115(40.2) ^a	67 (23.4)	22 (7.7)	58 (20.3)
-	247	96 (38.9)	88 (35.6)	59 (23.9)	59 (23.9)	12 (4.9)	40 (16.2)

^a $P<0.05$ vs *H pylori* (-).

表 2 抗 *H pylori* 治疗对临床症状的影响 n (%)

症状	n	<i>H pylori</i> 被根除		<i>H pylori</i> 未根除	
		n	好转或消失	n	好转或消失
腹痛	110	82	45 (54.9)	28	16 (57.1)
腹胀	98	62	34 (54.8)	36	19 (52.7)
反酸或烧心	102	75	55 (73.3) ^a	27	14 (51.9)
暖气	46	33	17 (51.5)	13	6 (46.2)
食欲减退	16	11	6 (54.5)	5	3 (60.0)

^a $P<0.05$ vs *H pylori* 未根除.

2.2 抗 *H pylori* 治疗对临床症状的影响 *H pylori* 感染阳性并接受正规抗 *H pylori* 治疗及随访的患者共 158 例 其中 102 例有反酸或烧心症状治疗后 75 例 *H pylori* 被

根除 27 例 *H pylori* 仍阳性. *H pylori* 被根除的患者有 55 例症状好转或消失有效率 73.3%; *H pylori* 未根除的患者 14 例症状好转或消失有效率 51.9% 临床症状在 *H pylori* 被根除和未根除之间差异有显著性($\chi^2=4.68 P<0.05$). 而其余症状改善率无显著性差异(表 2).

3 讨论

H pylori 是慢性活动性胃炎和消化性溃疡的主要致病因素 而且与胃癌关系密切^[11] 还有研究认为 *H pylori* 感染与部分胃肠道外疾病如血管性疾病 免疫性疾病 营养代谢性疾病 皮肤病等有一定关系. *H pylori* 感染会不会引起特异性的临床症状由于受样本选择及症状衡量标准的局限目前这方面的报道尚较少. Marshall *et al*^[12] 发现与 *H pylori* 相关联的症状是暖气 但是 Rokkas *et al*^[13] 报道只有餐后饱胀与 *H pylori* 相 关

我们以门诊患者为研究对象在排除了可引起上腹不适的器质性疾病和其他影响因素的情况下分别统计患者的腹痛腹胀暖气反酸烧心食欲减退等消化道症状的发生率并分析其与 *H pylori* 感染的相关性结果表明 *H pylori* 阳性的患者除反酸烧心症状的发生率显著高于 *H pylori* 阴性的患者外其余症状的发生率在二者间均无显著性差异与文献[14]报道相符。由于 *H pylori* 感染可引起胃炎消化性溃疡等本研究排除了消化性溃疡的患者而胃炎本身并无特异性的临床表现因此本结果也与其临床特征相符合。而且所有观察的患者胃镜检查均无明显的食管炎表现因此也可以排除由于反流性食管炎造成的影响。

为了验证 *H pylori* 感染与反酸烧心症状的相关性我们观察了接受正规抗 *H pylori* 治疗及随访的 158 例患者治疗前后临床症状的变化为了排除治疗过程中抑酸药对临床症状的影响我们在治疗停止后 1 mo 复查 ¹³C-UBT 时再次调查患者的临床症状我们发现 *H pylori* 被根除的患者其反酸或烧心症状好转率明显高于 *H pylori* 未被根除的患者支持 *H pylori* 感染与反酸烧心症状相关。但在抗 *H pylori* 治疗后 *H pylori* 未被根除的患者中也有 51.9% 的患者临床症状好转说明有多种因素与反酸烧心症状相关而且由于所选患者的原因大部分患者在治疗后未能及时复查胃镜对治疗前后胃内炎症改变的状况不能及时了解其临床症状的改善是否与胃炎好转相关有待进一步研究。另外有研究显示 *H pylori* 感染与贲门炎和 / 或胃食管反流病 (GERD) 相关^[15] 而反酸和烧心是贲门炎和 GERD 常见的临床症状本研究结果显示的 *H pylori* 感染者反酸烧心症状明显高于无 *H pylori* 感染者也支持上述观点。关于 *H pylori* 与 GERD 的关系一直引人注目流行病学资料表明 GERD 患者 *H pylori* 感染率低。土耳其后裔的人群中 *H. pylori* 感染率高 (60.6%) 而 RE 发生率低 (9.7%) 荷兰人群中 *H pylori* 感染率低 (18.5%) 而 RE 发生率高 (33.0%) 二者呈反比关系^[16-18]。有学者认为不是 *H pylori* 而是胃炎对 GERD 有保护作用^[19]。其原因和机制有待进一步研究。

由于 *H pylori* 感染的普遍性其与人类的健康密切相关抗 *H pylori* 治疗对 *H pylori* 阳性的患者反酸烧心症状可获得明显缓解从而提高生活质量结果支持对这部分患者进行抗 *H pylori* 治疗。

4 参考文献

1 Pan ZJ, van der Hulst RW, Feller M, Xiao SD, Tytgat GN, Dankert J, van der Ende A. Equally high prevalences of infec-

- tion with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. *J Clin Microbiol* 1997;35:1344-1347
- 2 胡剑可, 张宝莉. 儿童血清幽门螺杆菌抗体与消化道疾病关系的探索. 现代预防医学 2000;27:60-61
- 3 Heldenberg D, Wagner Y, Heldenberg E, Keren S, Auslaender L, Kaufshtein M, Tenebaum G. The role of *Helicobacter pylori* in children with recurrent abdominal pain. *Am J Gastroenterol* 1995;90:906-909
- 4 Tindberg Y, Bengtsson C, Granath F, Blennow M, Nyren O, Granstrom M. *Helicobacter pylori* infection in Swedish school children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. *Gastroenterology* 2001;121:310-316
- 5 Guiraldes E, Duarte I, Pena A, Godoy A, Espinosa MN, Bravo R, Larrain F, Schultz M, Harris P. Proinflammatory cytokine expression in gastric tissue from children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:127-132
- 6 Rowland M, Imrie C, Bourke B, Drumm B. How should *Helicobacter pylori* infected children be managed? *Gut* 1999;45(Suppl 1):I36-I39
- 7 Carpentieri DF, Wenner W, Liquornik K, Ruchelli E. Significance of lymphoid follicles and aggregates in gastric mucosa of children. *Pediatr Dev Pathol* 2000;3:177-179
- 8 Riddell RH. Pathobiology of *Helicobacter pylori* infection in child ren. *Can J Gastroenterol* 1999;13:599-603
- 9 Blom J, Gernow A, Holck S, Wewer V, Norgaard A, Graff LB, Krasilnikoff PA, Andersen LP, Larsen SO. Different patterns of *Helicobacter pylori* adherence to gastric mucosa cells in children and adults. An ultrastructural study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1033-1040
- 10 姜海行, 梁淡涓, 王琳琳, 陈振依, 覃山羽, 单庆文. 儿童幽门螺杆菌感染的特征. 世界华人消化杂志 2001;9:1457-1459
- 11 Miehke S, Kirsch C, Dragosics B, Gschwantler M, Oberhuber G, Antos D, Dite P, Lauter J, Labenz J, Leodolter A, Malfertheiner P, Neubauer A, Ehninger G, Stolte M, Bayerdorffer E. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: current status of the Austrain Czech German gastric cancer prevention trial (PRISMA Study). *World J Gastroenterol* 2001;7:243-247
- 12 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-1315
- 13 Rokkas T, Pursey C, Uzoehina E, Dorrington L, Simmons NA, Filipe MI, Sladen GE. Campylobacter pylori and non-ulcer dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 1987;82:1149-1152
- 14 周惠萌, 范欣敏. 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析. 世界华人消化杂志 2004;12:497-498
- 15 Wu JC, Sung JJ, Chan FK, Ching JY, Ng AC, Go MY, Wong SK, Ng EK, Chung SC. *Helicobacter pylori* infection is associated with milder gastroesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:427-432
- 16 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾哲. 胃食管反流病与幽门螺杆菌相关性胃炎及胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:1100-1103
- 17 Loffeld RJ. *H pylori* and reflux esophagitis in Turkish patients living in the Zaanstreek region in the Netherland. *Dig Dis Sci* 2003;48:1846-1849
- 18 Vinjirayer E, Gonzalez B, Brensinger C, Bracy N, Obelmeijas R, Katzka DA, Metz DC. Ineffective motility is not a marker for gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:771-776
- 19 Cremonini F, Di Caro S, Delgado-Aros S, Sepulveda A, Gasbarrini G, Gasbarrini A, Camilleri M. Meta-analysis: the relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:279-289

胰管结石 85 例的内镜诊治

秦运升, 李兆申, 孙振兴, 吴仁培, 王娜, 姚银珍

秦运升, 浙江大学附属第一医院肝胆胰外科 浙江省杭州市 310031
李兆申, 孙振兴, 吴仁培, 王娜, 姚银珍, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433
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附属长海医院消化内科. zhaoshenli@chxh.com
电话: +86-21-25070552 传真: +86-21-55620081
收稿日期: 2004-03-11 接受日期: 2004-04-13

摘要

目的: 探讨内镜逆行胰管造影(ERCP)在胰管结石诊断与治疗中的价值。

方法: 回顾分析 1998-07/2003-12 经 ERCP 诊治的 85 例胰管结石患者的临床治疗方法和治疗结果。

结果: 85 例患者共行 137 次 ERCP 检查 诊断准确 100%。59 例胰管结石经乳头括约肌切开(EPST)或胰管括约肌切开(EPS)取石或置入胰管支架而得到成功治疗。18 例经 ERCP 结石取净腹痛近期缓解率为 88.9% 远期缓解率为 81.2%; 26 例置入支架患者的腹痛近期缓解率 80.7% 远期缓解率 66.7%; 10 例 EPST 后探条扩张部分取石 ENPD 引流患者的近期缓解率 70%。并发症发生率为 9.4%(8/85) 1 例发生术后胰腺炎。

结论: ERCP 是诊断胰管结石的主要手段经 ERCP 治疗胰管结石具有微创并发症少的特点可作为胰管结石的首选治疗手段。

秦运升, 李兆申, 孙振兴, 吴仁培, 王娜, 姚银珍. 胰管结石 85 例的内镜诊治. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1754-1755

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1754.asp>

0 引言

胰管结石可导致胰管内压力增高引起胰腺组织血流灌注减少缺血乃至组织纤维化加剧胰腺炎病情进展。慢性胰腺炎中胰管结石的发生率高到 30%^[1]。随着治疗性 ERCP 的应用 内镜治疗已成为胰管结石的首选治疗手段并取得了良好的治疗效果有取代传统外科手术的趋势。长海医院 1998-07/2003-12 经内镜诊治胰管结石患者 84 例如下。

1 材料和方法

1.1 材料 胰管结石患者 84 例 男 51 例 女 34 例。平均年龄 38.3(8-74 岁) 20 岁以下占 16.5% 20-40 岁占 44.7% 40-60 岁占 28.2% 60 岁以上占 10.6%。91.8% 的患者首发症状为慢性持续性腹部胀痛可有

腰背部放射痛其中 47.4% 的患者伴有腹胀腹泻纳差消瘦恶心呕吐等其他消化道症状以腹泻为首发症状者 3 例; 以黄疸为首发症状者 2 例 2 例体检发现。病程 10 d-27 a 不等 61.2% 的患者病史在 1 a 以上。胰腺外分泌检查 BT-PABA < 60% 者 36.5% < 30% 者 27.1%。有长期饮酒史 23 例(27.1%) 酗酒者 7 例。全部病例均行腹部 B 超检查 阳性率 72.9% 未检出者多报告为胆道结石及胆管扩张慢性胰腺炎。CT 检查的阳性率为 83.8%(57/68) 未检出者中有 3 例报告为胰头或胰尾肿瘤。MRCP 检查 57 例 阳性率 96.5%(55/57) 未见出的 2 例均报告为胆总管下段结石。内镜超声(EUS) 检查的阳性率 91.7%(22/24) 均能较好的显示出胰腺或胰管的形态改变但 2 例未能显示出结石。ERCP 的阳性率为 100% 并能清楚显示结石的大小位置及数目。

1.2 方法 常规 ERCP 了解胰胆管情况确认结石的大小数量位置以及有无胰管狭窄胆道结石胰腺囊肿等情况制定相应的治疗方案。如果结石位于主胰管且数量 3 枚大小 1.0 cm 行胰管括约肌切开(EPST)后用取石网篮或取石气囊一次取净结石若结石 > 1.0 cm 用机械碎石器碎石后取石。如果结石数量 > 3 枚一次难以取净可分次取石取石间隔置入鼻胰管或内支架引流。内镜下取石失败者行体外震波碎石(ESWL)碎石后再次取石若不成功外科手术。导丝难以越过结石或狭窄段者外科手术。若同时存在胰管狭窄可用胰管扩张气囊或探条行狭窄扩张如仍存在取石困难置入胰管支架后择期取石。若取石后仍存在胰管狭窄的留置胰管支架。一般选用 5-7F 的胰管支架 重度扩张者可选用 8.5-10 F 的支架 支架的长度以超过狭窄处 1 cm 为宜。随访过程中发现支架阻塞者更换支架。术后禁食 2-3 d 常规应用抗生素预防感染必要时给予胰酶抑制剂。监测术后 3 12 24 及 72 h 血清淀粉酶观察生命体征和腹部体征的变化并对术后腹痛脂肪泻消化道症状及体重增加等情况进行随访。

2 结果

85 例患者共行 ERCP 诊疗 137 次 每例平均 1.6 次。操作成功率 100% 诊断正确性 100%。单纯行 ERCP 诊断检查 13 例 其中外院送检 5 例 2 例因伴发胰腺囊肿行囊肿切除胰管切开取石术另 1 例为胰管切开取石术后结石复发。ERCP 治疗 72 例 治疗成功率 81.9%。18

例经 EPST 后取净结石其中 9 例 1 次取石成功; 8 例 2 次完成取石取石间隔置入鼻胰管或内支架引流; 1 例 3 次完成取石. 5 例 EPST+ESWL+ 支架置入应用其中 1 例患者经 2 次支架置入后复查结石消失但拔除支架后发生急性胰腺炎再次支架置入. 26 例 EPST 后置入胰管支架其中 5 例置入副胰管支架(3 例 5F/5 cm 1 例 10F/5 cm) 7 例随访过程中发现支架阻塞予以更换 支架 1 例在首次支架置入后 4 a 刷检出癌细胞行胰十二指肠切除术. 10 例 EPST 后行探条扩张部分取石或 ENPD 引流.

因导丝或扩张探条不能越过结石或狭窄段而放弃取石 13 例 其中 6 例手术治疗 2 例因胰头及勾突广泛结石纤维化行胰十二指肠切除术 3 例行胰管切开取石术 1 例行胆总管囊肿切除及胰管切开取石. ERCP 成功治疗胰管结石 59 例随访 1-48(平均 11.6) mo. 结石取净患者 18 例腹痛近期(<3 mo)缓解率 88.9% 远期缓解率(>3 mo)81.2%; 置入支架患者 26 例近期腹痛缓解率 80.7% 远期缓解率(>3 mo)66.7%; EPST 后探条扩张 部分取石后 ENPD 引流患者 10 例近期缓解率 70%. 腹泻纳差恶心呕吐等消化道症状得到改善 47 例质量增加 1-5 kg.

并发症发生率为 9.4%. 1 例患者经 2 次支架置入后复查结石消失拔除支架后再发腹痛淀粉酶进行升高 急诊置入胰管支架后缓解. 术后高淀粉酶血症(>8 335 nkat)7 例 经积极治疗后多于 72 h 后恢复正常. 无支架移位及穿孔等其他并发症发生.

3 讨论

ERCP 仍是诊断胰管结石的金标准^[2] 本组诊断符合率 100%. ERCP 能清楚显示出结石的位置大小及数目由于其用于治疗具有微创并发症少的特点而宜于为患者接受. 胰管结石的存可导致胰管胰实质的压力增高 引起胰腺组织血流灌注减少缺血乃至组织纤维化 加剧胰腺炎病情进展并诱发胰腺炎发作. 去除结石后可改善胰腺炎的预后^[3]. 因此目前多数学者主张一旦确诊就要积极治疗. 以往胰管结石的治疗主要依赖于外科手术. 常用术式是胰管切开取石胰管空肠吻合由于结石常多发且不限于主胰管切开取石亦难于取净常需切除部分胰腺由此带来更大的创伤和更多的并发症. 近年来随着内镜诊疗技术尤其是 ERCP 技术的不断发展 ERCP 介入取石取得了较好的效果并显示出了微创高效并发症少的特点^[4]. 本组 25% 的患者胰管结石可经 ERCP 取净. 腹痛近期缓解率 88.9% 远期缓解率为 81.2%. 作为一种辅助的治疗手段 ESWL 后再次取石或引流已被证明是安全有效的 尤适于主胰管大结石和位于狭窄段尾端的结石可大大提高胰管结石

的非手术治疗的效果与成功率^[5-6]. 本组有 5 例患者经 ESWL 后建立了通畅的引流.

主胰管阻塞引起的近段胰管高压和扩张是慢性胰腺炎疼痛的原因. 对于结石无法取净的患者可置入胰管支架以通畅引流降低胰管的压力达到缓解疼痛的目的. 本组 44.1% 的患者经置入胰管支架有效缓解了疼痛 腹痛近期缓解率达 80.7% 远期缓解率 66.7% 消化道症状也得到不同程度的改善. 与文献^[6]报道的相似. 但有文献报道内镜下引流以对慢性胰腺炎的疼痛几乎没有效果而且也不能阻止或延缓腺体功能不全的进一步进展^[5]. 另有文献报道胰管内支架置入后会不同程度的引起胰管胰腺实质以及胰腺形态的改变^[7-8]. 本组 1 例患者拔除胰管支架后再发胰腺炎可能与次有关. 另有 1 例患者经过 3 次支架置入后刷检出癌细胞胰腺癌变是由胰管结石引起还是胰管内支架引起尚不清楚. 因此置入胰管支架后因规范随访结石取净后尽早拔除.

提高 ERCP 治疗胰管结石的效果我们认为应掌握好如下适应证: (1)主胰管结石且数量 3 枚 大小

1.0 cm 力争一次取净结石若结石>1.0 cm 机械碎石器碎石后取石; (2)如果结石数量>3 枚 一次难以取净可分次取石取石间隔置入鼻胰管或内支架引流; (3)首次内镜下取石导丝或扩张探条难以越过结石或狭窄段者行括约肌切开后试行 ESWL 碎石择期再次取石; (4)无法取净结石者置入胰管支架通畅引流但应定期随访; (5)多发结石伴胰腺广泛钙化者不适于内镜下取石.

4 参考文献

- 1 Deviere J, Delhaye M, Cremer M. Pancreatic duct stones management. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1998;8:163-179
- 2 Howell DA. Pancreatic stones: treat or ignore? *Can J Gastroenterol* 1999;13:461-465
- 3 Mergener K, Kozarek RA. Therapeutic pancreatic endoscopy. *Endoscopy* 2003;35:48-54
- 4 李兆申, 任洪波, 孙振兴, 许国铭. 经内镜治疗胰管结石的临床研究. *解放军医学杂志* 2002;27:790-792
- 5 Adamek HE, Jakobs R, Buttman A, Adamek MU, Schneider AR, Riemann JF. Long term follow up of patients with chronic pancreatitis and pancreatic stones treated with extracorporeal shock wave lithotripsy. *Gut* 1999;45:402-405
- 6 Brand B, Kahl M, Sidhu S, Nam VC, Sriram PV, Jaeckle S, Thonke F, Soehendra N. Prospective evaluation of morphology, function, and quality of life after extracorporeal shockwave lithotripsy and endoscopic treatment of chronic calcific pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3428-3438
- 7 Sherman S, Hawes RH, Savides TJ, Gress FG, Ikenberry SO, Smith MT, Zaidi S, Lehman GA. Stent-induced pancreatic ductal and parenchymal changes: correlation of endoscopic ultrasound with ERCP. *Gastrointest Endosc* 1996;44:276-282
- 8 Smith MT, Sherman S, Ikenberry SO, Hawes RH, Lehman GA. Alterations in pancreatic ductal morphology following polyethylene pancreatic stent therapy. *Gastrointest Endosc* 1996;44:268-275

腹腔镜结直肠癌手术中特殊情况的处理

王存川, 曾毅克

王存川, 曾毅克, 暨南大学第一附属医院微创外科中心
广东省广州市 510632

项目负责人: 王存川, 510632, 广东省广州市黄埔大道西 613 号, 暨南大学
第一附属医院微创外科中心. wcchuan@tom.com
电话: 020-38688685 传真: 020-38688803
收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-03-02

摘要

目的: 探讨腹腔镜结直肠癌手术中特殊情况的处理方法。

方法: 总结 1995-06/2003-06 作者施行的 142 例结直肠癌手术中有特殊疑难情况的 14 例患者的手术处理技巧和经验。

结果: 使用腹腔镜结合电凝固化小切口辅助手辅助等手段 14 例患者均顺利完成手术例有术后并发症例经保守治疗治愈 1 例拒绝再次手术。

结论: 随着经验的积累一些特殊情况也可以通过腹腔镜联合其他手段辅助完成手术取得满意的效果。

王存川, 曾毅克. 腹腔镜结直肠癌手术中特殊情况的处理. 世界华人消化杂志
2004;12(7):1756-1757

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1756.asp>

0 引言

学术界对腹腔镜结直肠癌手术一直存在争论美国的一项调查^[1]显示与过去 3 相比腹腔镜外科医生对腹腔镜结直肠癌手术的热情有所下降其主要原因是对其疗效和并发症的疑虑。腹腔镜结直肠癌手术是一种手术技巧要求较高的手术在遇到肿瘤合并肠梗阻侵犯邻近脏器等复杂情况时一般需要中转开放手术处理但是随着经验的积累和手术技巧的提高也可以在腹腔镜下处理完成手术。

1 材料和方法

1.1 材料 1995-06/2003-06 作者共施行的 142 例结直肠癌手术术中遇到特殊疑难情况共 14 例: 合并肝转移 4 例(其中 2 例术前 B 超和 CT 检查均未发现) 结肠肝曲癌侵犯十二指肠 2 例 侵犯胰头 1 例 乙状结肠癌侵犯横结肠和十二指肠 1 例 侵犯右附件和膀胱 1 例 侵犯骨盆 1 例 合并肠梗阻 1 例 右半结肠癌伴肠梗阻 1 例 直肠癌侵犯阴道后壁 1 例 直肠癌用切割器切割直肠下段时钉仓长度不够 1 例。

1.2 方法 合并肝转移的患者给予电凝固化转移灶。肿瘤

侵犯十二指肠者和乙状结肠癌侵犯横结肠和十二指肠的患者通过取标本的小切口切除受侵犯的肠壁肠管直接缝合修补。肿瘤侵犯胰头者在腹腔镜下用超声刀切除受侵犯的部分胰头组织。肿瘤侵犯膀胱和右侧附件者同时行右附件切除膀胱部分切除。直肠癌侵犯阴道后壁者同时行阴道后壁部分切除。结肠癌合并肠梗阻时先通过小切口行肠道减压行手辅助腹腔镜手术一期吻合。肿瘤侵犯骨盆者行姑息手术用超声刀分离到肿瘤远端(骨盆残留部分肿瘤组织)切除病变肠管用吻合器吻合结直肠遇到钉仓长度不够的病例剩余的 8 mm 宽的直肠断端加用丝线缝合封闭。

2 结果

14 例患者均顺利完成手术术后吻合口瘘 1 例 保守治疗治愈。轻微膀胱瘘 1 例 延期 10 d 拔尿管后治愈。直肠阴道瘘 1 例 患者拒绝再次手术。术后急性肺栓塞 1 例 经保守治疗治愈。

3 讨论

3.1 合并肝转移的处理 肝脏是结直肠癌最常见的转移器官之一但是某些隐匿转移灶术前影像学检查有时难以发现的而腹腔镜也是诊断腹腔隐匿转移灶的有效方法。最好配合术中超声成像仪检查这是诊断肝脏等实质性器官肿瘤的敏感方法^[2-3]。Goletti *et al*^[4]认为术中超声检查是腹腔镜外科不可缺少的有用手段能增加肿瘤的分期为调整治疗策略提供帮助。本组中有 2 例患者术前经 B 超和 CT 检查均没有发现肝脏包膜下的转移灶;而在术中探查时发现。对可疑转移取活检作冰冻切片检查时避免使用热切割工具以免影响病理检查的结果病灶完整切除后再用电刀或超声刀止血。如果是较大的单个转移灶可考虑行腹腔镜肝段或肝叶切除。

3.2 肿瘤侵犯邻近脏器的处理 术中发现结直肠癌侵犯邻近脏器时术者应根据具体情况决定是中转开腹还是使用手辅助处理主动中转开腹并非腹腔镜手术的并发症而能够在腹腔镜的探查指引下选择更合理的手术切口和处理方法^[5-6]。如果肿瘤对邻近脏器侵犯轻目标脏器体积增加不大则可在腹腔镜下做联合脏器切除如本组的乙状结肠癌侵犯膀胱顶和右附件和直肠癌侵犯阴道后壁的 2 例患者我们分别对其施行了完全腹腔镜下乙状结肠癌联合膀胱部分右侧附件切除

和阴道后壁部分切除. 如果处理困难也可利用取标本的小切口进行直视下辅助切除受侵犯的器官本组的2例结肠肝曲癌侵犯十二指肠壁和1例乙状结肠癌侵犯横结肠和十二指肠都是通过该法处理.

3.3 合并肠梗阻的处理 结直肠癌合并肠梗阻使肠管膨胀 腹腔内可利用的空间减少影响气腹的建立增加腹腔镜手术操作的困难这时可考虑使用手辅助装置这样既可利用手辅助的切口可完成肠管的减压也可利用手的触诊帮助发现和探查病灶和其他病变. 我们遇到的例结肠癌合并肠梗阻的患者腹部膨隆可见肠形 无法按常规方法建立气腹我们先在其左腹部做一8 cm的腹部切口先行肠道减压置入手辅助装置建立气腹 在手辅助下完成手术.

4 参考文献

- 1 Mavrantonis C, Wexner SD, Noguera JJ, Weiss EG, Potenti F, Pikarsky AJ. Current attitudes in laparoscopic colorectal surgery. *Surg Endosc* 2002;16:1152-1157
- 2 Machi J, Sigel B, Zaren HA, Kurohiji T, Yamashita Y. Operative ultrasonography during hepatobiliary and pancreatic surgery. *World J Surg* 1993;17:640-646
- 3 Charnley RM, Morris DL, Dennison AR, Amar SS, Hardcastle JD. Detection of colorectal liver metastases using intraoperative ultrasonography. *Br J Surg* 1991;79:45-48
- 4 Goletti O, Buccianti P, Chiarugi M, Pieri L, Sbragia P, Cavina E. Laparoscopic sonography in screening metastases from gastrointestinal cancer: comparative accuracy with traditional procedures. *Surg Laparosc Endosc* 1995;5:176-182
- 5 王存川, 陈盛, 苏国森, 梁伟成, 徐以浩, 许朋. 电视腹腔镜外科手术在胃肠道肿瘤的临床应用. *中国胃肠外科杂志* 1999;2:35-37
- 6 王存川. 实用腹腔镜外科手术学. 第1版. 广州: 暨南大学出版社, 2002:212-213

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

• 临床经验 •

重型肝炎患者血浆内皮素心钠素肾素血管紧张素II测定

姚怡然, 周力, 姚旗, 张涛

姚怡然, 周力, 张涛, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550004
姚旗, 贵阳市第四人民医院 贵州省贵阳市 550002
项目负责人: 周力, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院消化内科. zhouli548@vip.sina.com
电话: 0851-6758323
收稿日期: 2004-03-23 接受日期: 2004-04-27

姚怡然, 周力, 姚旗, 张涛. 重型肝炎患者血浆内皮素心钠素肾素-血管紧张素测定. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1757-1758
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1757.asp>

摘要

目的: 测定重肝患者血浆内皮素(ET) 心钠素(ANP) 肾素(PRA) 血管紧张素(AT-II)含量 探讨他们水平变化的机制和意义.

方法: 用放射免疫法检测38例重肝患者和30例正常对照血浆 ET ANP PRA AT-II 含量.

结果: 重肝组血浆 PRA AT-II ANP 均显著高于正常对照($P < 0.05$) ET 显著低于正常对照($P < 0.05$) 急重肝 亚重肝慢重肝血浆 PRA AT-II ANP ET 水平均接近重肝患者 ANP 与 ET AT-II ET 与 AT-II 之间无显著相关.

结论: 重肝患者存在 ET ANP PRA AT-II 释放代谢和调控紊乱从而引起他们的含量变化但与重肝病程无关.

0 引言

目前重型肝炎的发病机制尚未阐明不少学者认为与病毒药物对肝细胞损害免疫损伤及非免疫损伤等有关. 内皮素(ET) 心钠素(ANP) 肾素(PRA) 血管紧张素(AT-II)均是体内血管活性物质其中 ET 是目前已知最强的缩血管物质 AT-II 也具有强烈的缩血管作用 而 ANP 是体内利钠利尿因子 并具有扩血管作用. 许多研究表明肝功能损害伴水盐代谢紊乱的疾病常有 ET ANP PRA AT-II 的异常 其中对肝硬化方面的研究甚多而有关重肝患者与 ET ANP PRA AT-II 报道甚少. 为此我们对 38 例重型肝炎患者进行了血浆 ET ANP PRA AT-II 的测定 并就其临床意义作初步探讨 现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 实验组 38 例(男 29 例 女 9 例) 均为 1996/1998 年贵阳医学院附属医院贵阳市传染病院铁五局中心医

院收治的重肝患者. 年龄19-72(平均41.6岁). 所有病例均符合1990年上海市全国肝炎学术会议修订的诊断标准. 患者均无高血压和心脏病. 对照组30名(男15名, 女15名) 来自健康献血者. 年龄25-48(平均46岁).

1.2 方法 清晨安静状态下空腹抽取静脉血7 mL. 按放免药盒要求抗凝处理4 1 000 r/min 离心5 min 分离血浆-30 贮存待检. 所有指标均采用放射免疫分析法测定. ET药盒由东亚免疫技术研究所提供. PRA AT-II ANP药盒由北方技术研究所提供. 实验数据均以平均数标准差(mean SD)表示. 两样本均数比较用配对 *t* 检验. 多个样本均数比较用方差分析. 两变量间的关系用直线相关和回归 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

重肝患者血浆 PRA AT-II ANP ET 水平分别为 5.7 1.6 ug/(L.h) 436 108 ng/L 197 45 ng/L 37 4 ng/L. 正常对照血浆 PRA AT-II ANP ET 水平分别为 0.5 0.3 ug/(L.h) 32 5 ng/L 78 7 ng/L 60 4 ng/L. 结果示重肝组患者血浆 PRA AT-II ANP 水平显著高于正常对照 ($P < 0.05$). ET 水平显著低于正常对照 ($P < 0.05$). 急重肝患者血浆 PRA AT-II ANP ET 水平分别为 6.2 2.3 ug/(L.h) 389 74 ng/L 168 32 ng/L 45 6 ng/L. 亚重肝患者血浆 PRA AT-II ANP ET 水平分别为 4.6 1.7 ug/(L.h) 477 137 ng/L 182 43 ng/L 41 10 ng/L. 慢重肝患者血浆 PRA AT-II ANP ET 水平分别为 5.5 1.0 ug/(L.h) 487 163 ng/L 226 64 ng/L 36 5 ng/L. 三组血浆 PRA AT-II ANP ET 含量比较采用方差分析. 结果示三组血浆 PRA AT-II ANP ET 水平均接近. 重肝患者 AT-II ANP 与 AT-II ET 的相关系数分别为 0.108 0.178. ET 与 AT-II 相关系数为 0.096. 结果示三者之间无显著相关.

3 讨论

肾素(PRA)肾脏球分器分泌的专一性很强的蛋白水解酶, 他可促进血管紧张素 II(AT-II)生成. AT-II 具有强烈的缩血管作用并可刺激醛固酮分泌而导致水钠潴留. 我们检测结果与文献[1-2]报道一致. 重肝

患者体内 PRA AT-II 水平升高是多种因素综合作用结果. 由于 AT-II 有强烈缩血管作用其增高可作用于肝脏血管平滑肌使肝血流量减少加重肝损害. 此外, 他还可进一步加重水钠潴留. 心钠素(ANP)是心房肌细胞分泌产生的一种活性多肽. 具有强大的利钠利尿, 扩张血管和降血压的作用. 我们检测结果与文献报[2-3]道一致. 由于 ANP 具有强烈的利钠利尿, 扩血管作用. 他的水平升高可促进体内水钠排泄. 是机体调节内环境稳定的一个保护性代偿机制. 临床上可考虑应用 ANP 改善重肝患者的微循环障碍. 纠正水电解质紊乱. 内皮素(ET)是含有 21 个氨基酸的血管活性肽. 是目前所知作用最强, 持续最久的缩血管多肽. 他参与调节动脉血管紧张素和血管活性物质的释放. 我们的检测结果与文献[4-5]报道相反. 现已证实生理状态下 ANP 可抑制 ET 释放. 重肝患者 ET 水平降低是否是由于 ANP 升高反馈抑制 ET 释放所致. 本文结果并未发现 ANP 水平变化与 ET 有何相关性. 因此还有待于进一步研究. 急性, 亚急性, 慢性重型肝炎血浆 ANP ET PRA-AT-II 含量均无显著性差异. 表明这些体液因子的含量与重肝病程无关.

近年的研究表明在正常生理状态下 ET 可使 AT-II ANP 合成释放. 增加 ANP 可抑制 ET AT-II 的合成. 我们研究结果表明重肝患者 ANP 与 ET AT-II ET 与 AT-II 之间无显著相关. 这可能是由于重肝时影响 ET ANP AT-II 释放分解的因素甚多. 而造成他们之间的调控紊乱. 在生理情况下三者之间的相互调节关系可维持机体内环境稳定. 而重肝患者这一平衡的打破则可能导致病情进一步发展.

4 参考文献

- 1 刘自贵, 谭明珍, 邱德贵, 刘丽, 李秀钧, 张国福. 乙型肝炎与肾素-血管紧张素-醛固酮系统的关系. 华西医科大学报 1991;22:303-306
- 2 李政, 李培, 吴桂芳, 卢源, 周力, 张玉萍, 邓开盛, 肖庆生. 重症病毒性肝炎中心钠素, 肾素-血管紧张素及醛固酮的测定. 贵阳医学院学报 1993;18:170-173
- 3 张东坤, 高英美, 吕汉文, 李美颖, 郝连杰, 陈明. 病毒性肝炎患者血浆及肝组织中心钠素. 肝脏病杂志 1994;2:95-97
- 4 陈耀凯. 重症肝炎患者血浆内皮素的变化及临床意义. 实用医药杂志 1997;10:22-23
- 5 唐世刚, 万克清, 欧敏生. 重症肝炎患者血浆内皮素的水平及临床意义. 中华传染病杂志 1996;14:177-178

CA125 在肝硬化患者中的前瞻性观察

冷爱民, 张桂英

冷爱民, 张桂英, 中南大学湘雅医院消化科 湖南省长沙市 410008
 项目负责人: 冷爱民, 410008, 湖南省长沙市开福区湘雅路 141, 中南大学湘雅医院消化科. aiminleng@yahoo.com.cn
 电话: 0731-4327106 传真: 0731-4448231
 收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-02

摘要

目的: 前瞻性观察肝硬化患者血清中 CA-125 的表达情况.

方法: 肝硬化住院患者 42 例, 男 24 例, 女 18 例, 平均年龄(49.48 ± 13.12)岁, 治疗前后静脉采血, 分离血清, 应用化学发光方法测定血清 CA125 的浓度.

结果: 以血清 CA125>54 U/L 为界限值 42 例患者中治疗前血清 CA125 >54 U/L 的为 90.48%, 平均(557.64 ± 265.54 U/L), 35 例治疗后血清 CA125 浓度有不同程度下降, 治疗后平均 133.71 ± 8.06, $P < 0.01$, 平均下降了(448.67 ± 252.97 U/L), Child-pugh 分级中 A 级 CA125 血清浓度平均(129.98 ± 46.24 U/L), B 级(463.05 ± 214.52 U/L), C 级(708.53 ± 250.71 U/L), 两两比较 P 均 < 0.01 . 治疗后随 Child-pugh 分级的好转而下降.

结论: 肝硬化患者血清中 CA125 升高, 随 Child-pugh 分级的好转而下降, 可作为判断肝硬化预后的一个指标.

冷爱民, 张桂英 CA125 在肝硬化患者中的前瞻性观察. 世界华人消化杂志 2004,12(7) 1759-1760

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1759.asp>

0 引言

CA125 是一个大分子糖蛋白, 其血清水平的测定已广泛应用于卵巢癌的诊断, 良恶性鉴别, 及术后监测, 但在非妇科疾病也出现较高水平的升高, 我们对肝硬化血清的 CA125 水平进行了前瞻性观察, 现报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料 肝硬化患者 94 例, 男 54 例, 女 40 例, 平均年龄 48.64 ± 12.34, 其中混合性肝硬化(酒精性 + 肝炎后性)27 例, 酒精性肝硬化 29 例, 肝炎后性肝硬化 38 例; 均经 B 超、CT、实验室化验检查及临床证实确诊, 并排除妇科疾病和肝癌, 正常对照组 32 人.

1.2 方法 凡确诊为肝硬化的入院患者及正常对照组, 治疗前后均静脉采血, 分离血清, 应用化学发光法测定血清 CA125 的浓度, 同时测定腹水的 CA125 浓度,

以血清浓度 CA125 >54 U/L 为阳性. Child-pugh 分级按全国高等医学院校内科学五年制教材的标准, A 级 9 例, B 级 46 例, C 级 39 例. 结果用 mean ± SD 表示.

统计学处理 显著性检验采用 t 检验, 相关系数分析和相关系数的 t 检验.

2 结果

94 例中 CA125 血清浓度 >54 U/L 的有 90 例, 阳性率为 95.74%, 治疗后 CA125 血清浓度 >54 U/L 的 28 例, 阳性率为 27.79%, $P < 0.01$, 94 例中有腹水的 79 例, CA125 浓度全部 >54 U/L, 阳性率为 100.00%. 平均(597.03 ± 236.46 U/L).

正常对照组 32 人 CA125 血清浓度平均(21.34 ± 9.48 U/L), 94 例治疗前 CA125 血清浓度平均(568.73 ± 245.65 U/L), $P < 0.01$, 治疗后平均(131.37 ± 88.40 U/L), $P < 0.01$, 平均下降了(459.58 ± 236.69 U/L).

Child-pugh 分级中 A 级 CA125 血清浓度平均(126.69 ± 44.32 U/L), B 级(486.30 ± 204.65 U/L), C 级(736.85 ± 246.68 U/L)(表 1).

肝硬化经治疗后 Child-pugh 分级由 C 级下降到 A 级, 其 CA125 血清浓度也相应下降, 相关系数 $r = 0.786$, $P < 0.01$, 由 C 级下降到 B 级, 相关系数 $r = 0.793$, $P < 0.01$, 由 B 级下降到 A 级, 相关系数 $r = 0.886$, $P < 0.01$ (表 2).

表 1 Child-pugh 分级 CA125 血清浓度的比较(mean ± SD, U/L)

Child-pugh 分级	CA125	P
A 级(9 例)	126.69 ± 44.32	* $P < 0.01$
B 级(46 例)	486.30 ± 204.65	^b $P < 0.01$
C 级(39 例)	736.85 ± 246.68	^c $P < 0.01$

* $P < 0.05$ vs B 级 ^b $P < 0.01$ vs C 级 ^c $P < 0.05$ vs A 级.

表 2 Child-pugh 分级 CA125 血清浓度治疗前后的比较(mean ± SD, U/L)

Child-pugh 分级	CA125(平均下降)	P
C → A 级(24 例)	568.76 ± 65.58	<0.01
C → B 级(13 例)	531.63 ± 45.59	<0.01
B → A 级(15 例)	397.69 ± 28.88	<0.01

3 讨论

CA125 首先发现于卵巢癌患者血清中, 1981 年 Bast *et al* 用卵巢浆液性乳突状囊腺癌细胞株 OVCA433 免疫 BALA/C 小鼠^[1], 并与骨髓瘤进行杂交制备单克隆抗体

OC125, 其能识别糖类抗原 CA125, 对卵巢癌的诊断和疗效观察有较高的临床价值, 后来发现 CA125 存在于各种胚胎体腔上皮来源的组织中, 如同皮细胞组织: 胸膜、腹膜及心包膜; 苗勒管上皮: 输卵管、子宫内膜。近来有应用于胃癌, 结肠癌, 食管癌, 贲门癌, 胰腺癌, 乳腺癌, 肺癌, 肝癌等肿瘤的报道^[1-9], 还有报道在急性淋巴细胞性白血病, 淋巴瘤, 肺炎, 慢性支气管炎, 结核性胸膜炎, 结核性腹膜炎 CA125, 急慢性肝炎也升高^[3,8], 也有人报道非妇科疾病胸腹水患者 CA125 水平明显升高^[10], 甚至有人认为 CA125 可作为判断慢性心衰预后的一个指标^[11]。有人报道肝硬化 CA125 升高^[9,12], 而有人认为 CA125 升高在肝硬化中只是一种假阳性^[1], 本文 94 例肝硬化患者 CA125 血清浓度明显升高, 阳性率为 95.74%, 治疗后下降到 29.79%, 有显著性差异, 79 例有腹水的肝硬化患者腹水 CA125 阳性率为 100.00%, 且平均浓度较高。CA125 血清浓度与肝功能 Child-pugh 分级呈正相关, 肝功能受损越重, CA125 浓度越高, 而随着肝功能的好转, Child-pugh 分级的下降, CA125 浓度也下降, 甚至转为阴性, 这可能与 CA125 存在于腹膜及肝硬化门脉高压, 血流回流受阻, 渗出增加, 胃血流量和肾小球滤过率下降, 有效循环血量减少, 肝功能对抗原处理能力下降等有关。因此, 我们认为肝硬化患者血清中 CA125 浓度可作为判断肝

硬化预后的一个指标, 并注意与妇科疾病进行鉴别。肝硬化患者血清中 CA125 浓度升高机制目前尚不完全清楚, 血清 CA125 浓度持续不降的肝硬化患者是否发展为肝癌也有待进一步观察研究。

4 参考文献

- 1 黄跃, 林明芳, 邱小雪. 血清 CA125, CA19-9, CA50 含量对消化系统肿瘤的诊断价值. 华人消化杂志 1998;6:1063-1064
- 2 刘联, 邹雄, 赵健, 王善政. 食管贲门癌患者血清 CA125 表达水平及其临床意义. 肿瘤防治杂志 2000;7:7-8
- 3 叶伟民, 韩焕兴, 孔宪寿. 肿瘤标记物 CA125 测定及其临床意义. 中国免疫学杂志 1999;15:522
- 4 寿伟臻, 张嗣博, 沈德义, 沈敏祺, 李炯. 血清 CA125 检测在肺癌中的价值. 肿瘤研究与临床 2001;13:106-107
- 5 张永祥, 戴冬梅. CA125 测定在肺癌中的临床价值. 青海医药杂志 2001;31:52-53
- 6 施常备, 杨琪, 李树业, 李强, 贾晓娟. CA125 与 AFP 检测对原发性肝癌诊断的比较. 陕西肿瘤医学 2000;8:200-201
- 7 陈宏斌, 张亚东, 黄跃, 陈小春. 血清 CA125 诊断肝癌的价值. 华人消化杂志 1998;6:242-243
- 8 陈虹. 肿瘤标记物 CA125 II 的检测及临床价值. 镇江医学院学报 1999;9:41711
- 9 叶飞, 胡若愚, 丁建仁, 俞莉芳. 肝硬化和肝癌患者血清 CA125 观察. 放射免疫学杂志 2000;13:224
- 10 张哲, 陆文熊. 非妇科疾病胸、腹水患者血清 CA125 水平的测定. 中国实验诊断学 2000;4:233
- 11 石丹, 梁海南, 杜静, 董少红. 慢性心衰患者血清 CA125 水平测定及其临床意义. 心血管康复医学杂志 2001;10:204-205
- 12 Xiao WB, Liu YL. Elevation of serum and ascites cancer antigen 125 in patients with liver cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol 2003;18:1315-1316

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

• 病例报告 •

绒毛膜细胞癌空肠转移 1 例

程斌, 谢华平, 龚建平, 王家马龙

程斌, 谢华平, 王家马龙. 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
 龚建平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胃肠外科中心. 湖北省武汉市 430030
 项目负责人: 程斌, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. b.cheng@tjh.tjmu.edu.cn
 电话: 027-83663611 传真: 027-83646605
 收稿日期: 2004-02-23 接受日期: 2004-03-02

程斌, 谢华平, 龚建平, 王家马龙. 绒毛膜细胞癌空肠转移 1 例. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1760-1762
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1760.asp>

摘要

目的: 通过对该罕见病例的报道拓宽人们对育龄妇女下消化道出血的病因分析思路。

方法: 剖腹探查, 手术标本病理确诊。

结果: 下消化道出血因为绒毛膜细胞癌空肠转移。

结论: 育龄妇女下消化道出血原因不明时, 要考虑绒毛膜细胞癌消化道转移。

1 病例报告

女性, 30 岁. 因黑便 4 d 于 2004-01-07 收住我院消化内科病房, 伴头昏、心慌、黑朦, 无腹痛、恶心、呕吐、反酸等. 既往无胃病史, 1999-09 顺产一男婴, 2002-04 始月经不规则, 量少. 查体: 重度贫血貌, 血压 120/80 mmHg, 心率 108 次/min, 心肺未见异常, 腹软, 无压痛, 未扪及包块, 肝脾肋下未及, 移动性浊音阴性, 肠鸣音 6-8 次/min. 入院时 Hb 67 g/L (2003-11 健康检查时为 117 g/L). 胃镜检查示胃黏膜贫血相, 未见出血病灶. 结肠镜因患者不能耐受仅进入乙状结肠, 肠黏膜表面可见暗红色血性液体附着. 消化道核素显像: 动态

像未见明显放射性异常浓聚, 23 h 静态像见右下腹放射性异常浓聚, 考虑回肠末端以上消化道活动性出血。肠系膜上、下动脉造影示左上腹空肠异常血管显影, 呈斑片状, 考虑为“血管畸形”。住院期间给予垂体后叶素及制酸、止血等治疗仍反复出现黑便或暗红色血便, 于2004-01-20剖腹探查, 术中发现空肠上段距Treitz韧带约75 cm左右处有2个并列生长的蕈样隆起凸向肠腔, 基底宽, 大小约1 cm × 1.2 cm, 二者相距约1 cm, 表面仍活动性出血。切除病变段肠管约5 cm, 行端端吻合术, 切除肠管送病检, 病理证实为小肠转移性绒毛膜癌, 癌组织已侵及肠壁黏膜层、黏膜下层与深肌层。随后查尿HCG呈阳性, 血 β -HCG 66 354.00 mIU/mL (正常值范围: 0.00-2.90 mIU/mL)。术后消化道出血停止, 转我院妇科肿瘤病房行化疗, 妇检未发现明显异常, 妇科B超示子宫肌瘤(1.7 cm × 1.3 cm)。

2 讨论

绒毛膜癌是一种高度恶性肿瘤, 继发于葡萄胎、流产或足月分娩以后, 少数可发生于异位妊娠后。绒毛膜癌多发生于子宫, 但也有子宫内未发现原发病灶而只有转移灶出现的病例。转移常见部位为肺、阴道、脑、肝或胃肠道等。国内有绒毛膜癌眼部转移、脾转移的个

案报道^[1-2], 一组大样本的下消化道出血病因分析亦未发现绒毛膜癌转移的病例^[3]。国外也仅见2例绒毛膜癌肠道转移致下消化道出血的个案报道^[4,5]。本例术前未检查生殖系统, 术后经病理确诊后追问病史方知患者2 a前曾因“尿HCG阳性”行药物流产术, 但当时未引起注意。因此, 本例提醒我们, 对育龄妇女出现下消化道出血, 常规检查未能明确病因时, 需仔细询问生育史, 严格行妇科检查及妇科B超; 查尿HCG。另外, 绒毛膜癌可产生乙种人体绒毛膜促性腺激素(HCG- β), 导致绒毛膜癌患者血中HCG- β 明显升高, 故临床疑为绒毛膜癌或转移时可检测此指标。另外, 手术或化疗根治绒毛膜癌后可使HCG- β 恢复至正常水平, 肿瘤复发或转移时又再度升高, 因而也可用于作为疗效评价和复发监测的指标。

3 参考文献

- 1 陈萍, 张玉华, 施林莺, 潘玲. 左眼转移性绒毛膜细胞癌1例. 中华眼科杂志 1997;33:159
- 2 李孟祥, 唐武兵. 脾脏绒毛膜细胞癌2例. 浙江肿瘤 1998;4:185
- 3 张影, 李莹, 欧阳钦. 885例下消化道出血病因分析. 中华消化内镜杂志 2002;19:105-106
- 4 Stokes EW, Perkins C. Testicular choriocarcinoma. An unusual presentation as occult gastrointestinal blood loss. *J Adolesc Health Care* 1989;10:146-150
- 5 Suski E, Pavlides C, Matsumoto T. Massive lower gastrointestinal bleeding: unusual presentation of metastatic choriocarcinoma. *Int Surg* 1979;64:53-55

• 病例报告 •

食管及胆囊同时性双原发癌 1 例

吴继华, 张建中, 周金莲

吴继华, 张建中, 周金莲, 中国人民解放军第306医院病理科 北京市 100101
项目负责人: 吴继华, 100101, 北京市朝阳区安翔北里9号, 中国人民解放军第306医院病理科.
电话: 010-66356729-2075
收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-03-12

摘要

目的: 通过报道食管及胆囊同时性双原发癌这一少见病例, 分析其可能的发病因素及临床病理学意义。

方法: 收集分析临床病理资料, 肉眼及显微镜下观察手术切除标本。

结果: 病理诊断为食管及胆囊同时性双原发癌, 且组织病理学类型不同。

结论: 双原发癌的发生可能与遗传因素有关。

吴继华, 张建中, 周金莲. 食管及胆囊同时性双原发癌1例. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1761-1762

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1761.asp>

1 病例报告

男性患者, 56岁, 因进食出现剑突下疼痛2 mo入院。疼痛为隐痛, 持续数分钟后可自行缓解。既往有胆囊结石病史, 其父死于食管癌。纤维食管镜: 在食管下段距门齿33-38 cm之间可见带蒂息肉状、下部为半圆形浸润性肿物, 表面结节状。病理活检示: 食管下段鳞状细胞癌。食管钡餐示: 瘤体主要位于下段食管, 胃小弯侧胃壁柔软。腹部B超及MRI示: 胆囊增大, 胆囊底部息肉, 胆囊颈部可见多个小结石。术前诊断: 食管癌; 胆囊结石并胆囊息肉。病理检查: 送检标本为切除食管一段及已剖开的胆囊, 食管长10 cm, 距其一端切缘1.5 cm处黏膜表面见一灰红灰褐色蕈伞样肿物, 6.5 cm × 4.0 cm × 1.5 cm大小, 切面灰白色, 质脆; 肿瘤旁食管外膜查见淋巴结8枚, 直径0.2-1.2 cm。胆囊8.0 cm × 4.0 cm × 1.5 cm大小, 胆囊底部黏膜表面见一有蒂灰褐色菜花样肿物, 2.5 cm × 1.7 cm × 1.2 cm, 切面灰白色、质脆, 胆囊黏膜粗糙, 壁厚0.1-0.3 cm, 胆囊颈部触及一种

大淋巴结,直径0.5 cm.显微镜下:食管肿瘤细胞呈片巢状,可见角化珠及明显细胞间桥,部分癌细胞较小,分化低,癌组织浸润深肌层达食管外膜(图1);胆囊肿瘤由大小不一、形态不规则、呈乳头状或绒毛状腺管构成,腺上皮细胞明显异型性,核大、深染,核分裂易见,基底部胆囊壁内未见癌组织(图2).病理诊断:食管蕈伞型中分化鳞状细胞癌,部分呈低分化,侵及食管外膜;癌旁食管外膜淋巴结未见转移癌(0/8).胆囊底部乳头状腺癌,胆囊颈部淋巴结未见转移癌(0/1).

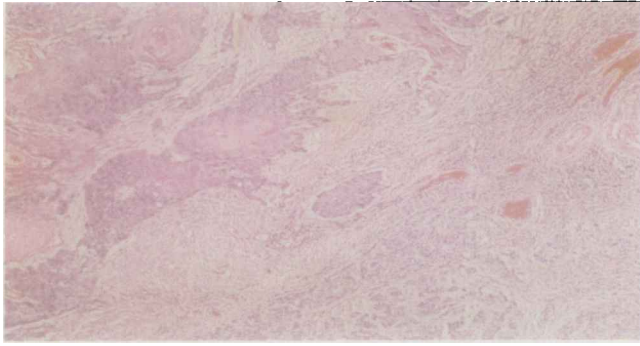


图1 食管鳞状细胞癌(H&E × 40).

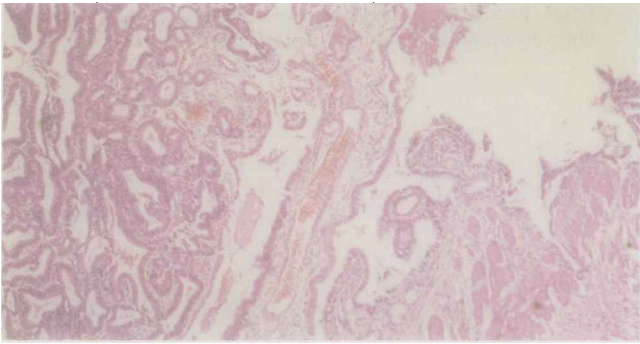


图2 胆囊乳头状腺癌(H&E × 40).

2 讨论

双原发癌属多原发癌范畴,临床较少见,据文献[1]报道其发生率为1.23-10.70%,好发部位为乳腺、结肠、胃、肺及女性生殖道,同时发生于食管和胆囊者罕见,迄今国内外文献未见报道.诊断双原发癌,目前公认的是Warren及Gates提出的诊断标准:(1)其中每个肿瘤必须是恶性的;(2)各自均具有独特的组织病理学形态;(3)明确排除转移和复发^[2-3].本例食管为鳞状细胞癌,胆囊为乳头状腺癌,组织病理学类型不同,符合以上诊断标准;胆囊乳头状腺癌,有蒂,未侵犯胆囊壁,可能为息肉恶变.组织病理学类型不同的双原发癌,诊断不难;而对于组织病理学类型相同的双原发癌,有时诊断较困难,必须进行全面检查、仔细分析,加以鉴别诊断,排除转移和复发的可能,做到早发现、早诊断、早治疗,力求手术根治.多原发癌发病机制目前尚未明了,多数学者认为可能与种族、遗传、内分泌、生活环境等方面因素有关.研究^[3-5]表明,有癌症家族史的多原发癌发病显著高于无癌症家族史者.本例有食管癌家族史,提示肿瘤的发生可能与遗传因素有关.因此,对有明显家族性恶性肿瘤发生史的患者,除了详细询问病史、仔细查体外,还需进行相应的辅助检查,了解有无多发癌灶,以免漏诊、误诊.

3 参考文献

- 1 付桂林,温配芝.多原发性癌.国外医学 肿瘤学分册 1983;2:88
- 2 付尚志.双原发癌45例临床分析.肿瘤防治研究 2001;2:143
- 3 戴晓波,陈晓品,张涛.双原发癌38例临床分析.重庆医学 2002;7:614
- 4 Anonymous. Clinical and pathological analyses of patients with a family history of colorectal cancer. *Jan J Clin Oncol* 1993;23:342-349
- 5 Akashi-Tanaka S, Fukutomi T, Fukami A, Fujiki T. Male breasts cancer in patients with a familial history of breast cancer. *Surg Today* 1996;26:975-979

• 病例报告 •

以DIC为首发表现的胰腺癌1例

朱颖炜,曾欣,林勇,杨秀疆,谢渭芬

朱颖炜,曾欣,林勇,杨秀疆,谢渭芬,中国人民解放军第二军医大学长征医院消化内科 上海市 200003
项目负责人:林勇,200003,上海市凤阳路415号,中国人民解放军第二军医大学长征医院消化内科. linyongmd@yahoo.com.cn
电话:021-63610109-73253
收稿日期:2004-04-24 接受日期:2004-05-24

摘要

报告1例以DIC为首发表现的胰腺癌,对不明原因的广泛性出血性疾病,要排除恶性肿瘤并发DIC的可能,以提高临床医生对该病诊疗水平.

朱颖炜,曾欣,林勇,杨秀疆,谢渭芬.以DIC为首发表现的胰腺癌1例.世界华人消化杂志 2004;12(7):1762-1763

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1762.asp>

1 病例报告

女,43岁.2004-02-26无明显诱因呕吐暗红色胃内容物,每日约1200 mL,伴解暗红色血便3-5次/d,每次约150 mL,时有阴道出血,鲜红色,无畏寒、发热,无胸痛、腹痛,无牙龈出血、鼻衄及紫癜.2004-03-

02 人我院急诊,予洛赛克静推,施他宁静滴及止血、对症治疗后症状无好转,妇科会诊予诊刮未见异常。因既往有胃十二指肠溃疡病史,门诊以上消化道出血收治消化内科。既往月经史正常。查体:体温 36.7℃,脉搏 80 次/min,呼吸 18 次/min,血压 14/11 Kpa,神志清,贫血貌,全身皮肤黏膜黄染,未见出血点,浅表淋巴结无肿大,胸骨无压痛,心肺检查无异常。腹平软,上腹部可触及 3 cm × 3 cm 大小肿块,质中,轻压痛,肝脾肋下未及,移动性浊音阴性,双下肢轻度水肿。血 WBC $6.6 \times 10^9/L$, N 0.80, L 0.08, RBC $2.65 \times 10^9/L$, Hb 81 g/L, PLT $43 \times 10^9/L$; 总胆红素 186 $\mu\text{mol/L}$, 直接胆红素 106 $\mu\text{mol/L}$, 间接胆红素 80 $\mu\text{mol/L}$, 总蛋白 55 g/L, 白蛋白 34 g/L, AST 82 U/L, ALT 129 U/L, GGT 338 U/L; PT 12.0 ± 3 s, TT 16.0 ± 3 s, 凝血酶时间 25.7 s, 凝血酶原时间 22.9 s; AFP 6.3 $\mu\text{g/L}$, CEA > 500 $\mu\text{g/L}$, CA19-9 60.3 kU, CA125 187.9 kU。入院后予止血、洛赛克、施他宁等治疗,出血无缓解,查纤维蛋白原 0.74 g/L, 抗凝血酶-III 51.3%, D-二聚体 289 $\mu\text{g/L}$, 3P 试验阳性。急诊腹部 CT 提示:胰头部占位伴肝内外肝管扩张,腹膜后多个肿大淋巴结。于当日予内镜下止血,内镜所见胃内大量咖啡色液体,抽净后见胃体活动性弥漫性新鲜出血,局部予立止血注射及喷洒去甲肾上腺素后仍可见广泛渗血,诊断为 DIC(弥漫性血管内凝血),予低分子肝素(吉派林)及新鲜血浆,凝血酶原复合物、纤维蛋白原以及营养支持治疗,出血仍无明显好转,3 d 后患者死于心、肺功能衰竭。

2 讨论

DIC 是一种复杂的病理生理过程和严重的获得性、全身性血栓-出血综合征。其特点是体内凝血和抗凝机制失衡,导致凝血因子和血小板的大量消耗及继发性纤维蛋白溶解和微循环障碍。引起 DIC 的病因以感染多见,其次为恶性肿瘤,特别是肿瘤晚期存在重度感染合并内毒素血症时,可通过激活凝血途径、损伤血管内皮细胞、破坏血细胞和恶性肿瘤细胞、减低单核-巨噬细胞系统清除功能等引起 DIC 的发病。肿瘤细胞可以分泌大量的粘蛋白、组织因子、前凝血物质、蛋白分解酶等具有促进凝血和促发 DIC 的发生的物质。如肿瘤组织因

子的增多可促进凝血过程导致纤维蛋白沉积引起血管内凝血,坏死肿瘤细胞释放组织凝血活酶进入血液循环激活外源性凝血途径进而促进血管内凝血,肿瘤分泌的粘蛋白可激活因子 X 而促进凝血。尽管癌症患者有上述病理生理变化,但如无血液系统转移,仅有 18% 患者表现凝血机制的异常, DIC 的发生率则更低,且往往处于慢性或早期 DIC 阶段,并不发生出血等症状,余志良 *et al*^[1] 报道胰腺肿瘤首发症状最常见为腹痛、黄疸、上腹不适,以消化道出血为首发症状的甚少,少数胰腺癌患者因病变侵及十二指肠或胃壁而发生胃肠道出血,偶然也可以因脾静脉发生血栓性静脉炎或癌栓而致食管静脉曲张破裂出血。以 DIC 为首表现的胰腺恶性肿瘤鲜有报道。胰腺癌患者的血浆组织因子明显高于正常人,这可能是胰腺癌发生 DIC 的主要原因^[2]。此外炎症递质 IL-6, 亦可间接影响体内凝血机制^[3-4]。胰腺癌合并 DIC, 由于病因难于去除,病程持续加重,早期明确诊断较困难,死亡率高。Nishimura *et al*^[5] 报道,实体肿瘤患者 DIC 发生率为 1.6%, 尽管使用低分子肝素,补充凝血因子和新鲜血浆,加强支持治疗,大多数患者仍短期内死于出血,该患者病程与此相似。因此,对不明原因的出血性疾病,需注意鉴别恶性肿瘤合并发生 DIC 的可能,及时完善肿瘤相关的辅助检查和凝血机制检查,可提高早期确诊率。

3 参考文献

- 1 余志良,李兆申,周国中,邹晓平,贺佳,蔡全才,胡克贵,王强. 胰腺癌临床症状调查(附 1027 例分析). 解放军医学杂志 2002;27:286-288
- 2 Ueda C, Hirohata Y, Kihara Y, Nakamura H, Abe S, Akahane K, Okamoto K, Itoh H, Otsuki M. Pancreatic cancer complicated by disseminated intravascular coagulation associated with production of tissue factor. *J Gastroenterol* 2001;36:848-850
- 3 Sarris AH, Kempin S, Berman E, Michaeli J, Little C, Andreeff M, Gee T, Straus D, Gansbacher B, Filippa D. High incidence of disseminated intravascular coagulation during remission induction of adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992;79:1305-1310
- 4 Levi M, van der Poll T, ten Cate H, van Deventer SJ. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest* 1997;27:3-9
- 5 Nishimura M, Komori A, Matsushita M, Fukutani A, Fujiyama Y, Bamba T. Malignant gastrointestinal stromal tumor of the small intestine: rare complication of acute disseminated intravascular coagulation without hematogenous metastasis. *Dig Dis Sci* 1998;43:2271-2277