

乙型肝炎病毒新开放读码框架的确定及其意义

董菁,成军,杨倩

董菁,成军,杨倩,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心,全军病毒性肝炎防治研究重点实验室,北京市100039
国家自然科学基金项目, 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: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

摘要

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝部分双链DNA病毒,基因组长度只有3.2 kb, 结构基因与调节基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠, 因此HBV DNA序列的利用率之高实属罕见。1979年首次报告HBV DNA的全基因序列并确定4个主要的开放读码框架(ORF)之后, 一直沿用至今。我们在中国流行株HBV基因序列的分析中, 在前-S1和X基因之前, 分别发现了2段编码基因序列: 前-前-S基因长度135 bp, 编码产物为45 aa; 前-X基因长度168 bp, 编码产物为56 aa。在前-前-S基因、前-X基因的上游存在启动子序列, 具有指导报告基因表达的活性。对15例慢性乙型肝炎(CHB)患者基因型C型9例、B型1例、B/C混合型5例, 共31个克隆测序结果, 发现均存在前-前-S基因区。17例CHB患者A型1例、B型3例、C型10例、B/C混合型3例, 共测序45个克隆, C型编码前-X区的克隆数占总编码克隆数的60%, C型不能编码前-X区的原因主要是A²⁶⁰⁸→C/T替换突变或C/A²⁷³³→T替换突变单一突变; 而B型、B/C型都不能编码前-X区蛋白, 主要因为双突变的存在。在HBV基因组中发现前-前-S和前-X基因序列的存在改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史。

董菁,成军,杨倩. 乙型肝炎病毒新开放读码框架的确定及其意义. 世界华人消化杂志 2004;12(4):757-762
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/757.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝部分双链DNA病毒, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[1]。全世界约有3.5亿人受到HBV感染, 危害严重, 但目前除了一小部分患者对干扰素α(IFNα)或核苷类似物拉米夫定的治疗有一定应答之外, 还没有特效的治疗技术和方法^[2-10]。1979年Gelibert et al首次报告了HBV DNA的全基因序列并确定4个主要的开放读码框架(ORF)之后, 一直沿

用至今^[11]。HBV基因组只有3.2 kb, 其结构特点是结构基因与调节基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠, HBV DNA序列的利用率之高实属罕见^[12-20]。关于这一紧密DNA结构中是否存在新的编码序列, 一直没有进行系统的研究。最近我们对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现了前-前-S和前-X基因序列, 改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史^[21-24]。

1 乙型肝炎病毒新开放读码框架的(再)发现及其验证

1.1 前-前-S区定义 1979年, Gelibert et al首次报告了乙型肝炎病毒(HBV)基因组的全序列, 并定位了4个开放读框(ORF)。我国学者于1984年报道了大陆HBV株(adr)的序列^[25]。目前在美国国立卫生研究院(NIH)的核苷酸序列数据库(GenBank)中, 存储了200多个HBV全基因组序列, 但之后学者对4个ORF分区的界定并无异议, 沿用至今。1995年, Gunther et al利用长距离多聚酶链反应(LA-PCR)技术, 辅以TA克隆法将患者体内的HBV基因组克隆到质粒载体中, 该方案保证了扩增片段与原模板之间的高度一致性, 又展示了模板多样性, 比Gelibert et al早先建立的研究方法操作更简便, 获得的数据更精确^[26]。

本研究利用LA-PCR技术扩增了中国HBV流行株DNA全基因序列, 在分析所获得的5个克隆的过程中, 在前-S1区之前发现还存在一个ORF, 长度135 bp, 编码45 aa, 命名为前-前-S区。初期选择的GenBank中6个其他血清型的HBV克隆株进行比较, 其中3个克隆具有前-前-S区ORF。应用DNASIS软件的蛋白质分析功能分析了前-前-S、前-S1、前-S2和S基因的完全表达产物, 前-前-S区较以往认为的大蛋白多出一个小的疏水区。其中的19(21)个疏水氨基酸在前-前-S区形成了一个小的疏水功能域, 可能与蛋白的空间折叠或表面蛋白合成后分泌有关。前-前-S多肽推断氨基酸序列中含有6个亮氨酸(L), 分别位于第3、9、15、19、27、39位, 前3个L是否可形成亮氨酸拉链结构, 尚需要进一步证实^[21-24]。

我们应用了2种方法来证实前-前-S区的真实存在。首先是在GenBank中选择不同血清型的HBV基因组全序列, 应用DNASIS软件重新确定其ORF, 结果发现甘人宝 et al、Mukaide et al^[27]、Okamoto et al^[28]报告的HBV基因组序列中均存在前-前-S区。其次是利用NIH网站的BLAST同源基因序列搜索软件, 将前-前-S

区编码氨基酸序列输入后进行同源性搜索，结果发现已经存入GenBank中的序列中，有5个克隆的氨基酸序列与本研究获得的序列有较高的同源性，GenBank注册号分别为：BAA32849、S43492、CAA25747、BAA89327和CAB38230(未发表资料，1998年)，氨基酸残基序列同源性分别为95%、93%、93%、77%和66%。综合上述2种方法证实的结果以及我们的资料，可以肯定前-X区是实际存在的^[29-35]。

前-X区ORF最早在1983年Fujiyama et al^[36]克隆的adr亚型的S基因产物中被提及，作者认为存在一身份不明的ORF(unidentified reading frame)；而Mimms et al^[37]将Fujiyama et al报告的克隆(S43492)进行再分析后，认为该段多肽是前-S1多肽内部，他们认为的前-S1长度为164 aa，而不是通常认为的119 aa或108 aa。我们认为多种资料的研究结果证明前-X区的存在，以往的研究认为该区的编码并不是一种普遍现象，因而未加以重视^[38-45]。我们分析的结果提示具有前-X区的HBV克隆株多来自日本和中国，欧美学者在最初的研究中获得的样本存在一定的偏差，这可能是忽视该区域的原因之一。另外，由于目前仍缺乏对HBV的大规模分子流行病学资料，因而早期发现前-X区的学者可能认为一些位点发生变异，而不认为这是一种主流现象，但我们对其他学者获得的克隆进行分析也发现了前-X区，应当认为前-X区的存在不是一种个别现象，至少在中国和日本是非常常见的^[46-50]。

总之，在HBV前-S1 ORF之前存在有一融合编码的ORF，我们将其命名为前-X区。如前-X多肽的表达得到进一步证实，将对HBV感染的检测、疫苗设计、HBV进入肝细胞机制(受体学说)、表面抗原的表达过程及功能、宿主抗感染机制、肝细胞癌产生机制研究均产生重大影响^[51-55]。

1.2 前-X基因定义 本研究在分析所获得的5个HBV全基因组，在X区之前发现还存在一个ORF，长度168 bp，编码56 aa。以G683-A2编码的前-X多肽分析，该多肽分子量约为6.2 kD，有15个疏水氨基酸，24个极性氨基酸。应用DNASIS软件的蛋白质分析功能分析了前-X-X基因的完全表达产物，前-X区较以往认为的X蛋白多出一个小的亲水区。前-X区编码多肽含有5个C，可能形成多个二硫键，易于产生新的二级结构。前-X多肽含有24个极性氨基酸，形成一个亲水功能域，可能影响到整个蛋白的空间构象。根据针对前-X多肽的氨基酸组成分析，发现该区域含有多个S，可能是磷酸化的重要区域，与细胞内信号转导有关。

我们也应用了2种方法来证实前-X区的存在。其一是在GenBank中选择不同血清型的HBV基因组全序列，应用DNASIS软件重新确定其ORF，结果发现甘人宝et al揭示的HBV基因组序列中存在前-X区ORF。其他亚型不表达前-X区多是由于前-X区起始密码子ATG发生

替换突变所致，其他亚型的克隆表现为TTG(X04615)，或CTG(克隆X02763、Z35717和G329640)。另一adr亚型克隆D12980保留了第一起始密码子ATG，但在两个起始密码子之间由于发生替换突变，而终止了前-X多肽的表达。初步推定前-X区起始密码子处发生的替换突变可能是血清型特异性的。其二是利用NIH网站的BLAST软件，将前-X区编码氨基酸序列输入后进行同源性搜索，结果发现已经存入GenBank中的序列中，有19个克隆中含有的氨基酸序列与本研究获得的序列有较高的同源性，分别为来自2组报道，其中2个克隆是来自同一序列的不同解释，另17个克隆均来自日本学者对肝细胞癌患者体内存在的HBV基因组分析所获得的。我们克隆的氨基酸序列与18例相关克隆的比较，发现同源性为85-94%。这些克隆的共性为：第一，均为adr亚型；第二，均克隆自HCC患者。综合上述两种方法证实的结果以及我们的资料，可以肯定前-X区是实际存在的。

最早在1990年Loncarevic et al^[56]自HCC患者血液中克隆的adr亚型的HBV基因组中提及了前-X区，作者简单介绍了前-X区的存在；Takahashi et al^[57]于1995年的研究结果认为前-X区与HCC有密切关系。1998年，Takahashi et al自HCC患者体内克隆了40株HBV全序列，其中38株为adr亚型，之中的18株含有前-X基因，作者综合以往的资料，认为前-X基因与HCC有密切的关系。但上述资料分析的患者病例数较少，结论需要进一步推敲。我们选择的患者为慢性乙型肝炎患者，并不是HCC患者。我们搜集的24株编码前-X基因的克隆均为adr亚型，提示前-X区的存在可能是一种亚型特异性现象。

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

1.3 文献的回顾性分析 本研究组在以往的研究中着重研究了HBV准种现象，研究的结果提示HBV在慢性乙型肝炎患者体内是以准种群形式存在的。本研究组应用新的序列分析软件，利用GenBank中的信息资源，对来自多家实验室的关于HBV基因组的数据进行了比较分析，结果提示HBV存在有新的ORF。

目前在美国国立卫生院的GenBank中，存储了200多HBV全基因组序列，本研究初始以限定条件搜索出符合条件的HBV基因组序列共50株，其中adr血清型28株，adw血清型22株，经过比较发现，28株adr血清型的病毒株总一致率为76.6%，22株adw血清型的病毒株总一致率为73.9%，提示近四分之一的序列位点表现为编码的多样性，基因位点包括替换、缺失和插入突变等多种突变形式^[58-62]。

本课题组研究的50个病毒株中，一共有43个克隆编码前-S基因，不表达的7个克隆中5个克隆在前-S区起始密码子编码ATG处编码AGG，而另2个克隆编码ATA。adr血清型28个克隆中前-S区的阳性率为100%，一致率为85.2%，高于adr血清型病毒株的总一致率76.6%；adw血清型22个克隆中前-S区的阳性率为98.5%，一致率为74.8%，与adw血清型总一致率的73.9%极为相近。

我们针对这50个病毒株的研究揭示：adr血清型28个克隆中，25个克隆在前-X区起始密码子处编码为ATG，前-X区起始密码子处编码为ATG的25个病毒株中，14株自起始密码子ATG至X基因起始密码子ATG之间的区域的168 nt中无终止密码子，提示这14个克隆均编码前-X基因，另11株克隆发生C/A²⁷³³→T的替换突变，导致前-X区表达被提前终止。adw血清型22个克隆中，在前-X区起始密码子处均不表现ATG，提示前-X区可能是adr血清型特异性的一种表现。不表达前-X多肽的病毒株均是因为在前-X区起始密码子发生替换突变，突变形式为A²⁶⁰⁸→C/T。来自多个研究组的HBV病毒株基因组中均编码前-X基因，我们认为这说明前-X基因是事实存在，是被忽视的一段重要序列。被忽略的主要原因在于：(1)获得的HBV基因组序列的数目尚少，不足以展示HBV序列的多样性；(2)前-X区为adr血清型特异性现象，在既往的研究中缺少对adr血清型HBV基因组的深入研究；(3)A²⁶⁰⁸→C/T替换突变、C/A²⁷³³→T替换突变以及上述2个位点的双替换突变导致前-X区多肽表达被终止，HBV编码的X蛋白自然自下一个ATG开始。因此针对前-X区域的替换突变的研究仍需要进一步加强。

总之，我们应用现有的计算机软件对GenBank中存储的50个HBV病毒株全基因组进行了深入分析，前-S区的存在是较为普遍的现象，而前-X区的编码具有adr血清型特异性特点，A²⁶⁰⁸→C/T和/或C/A²⁷³³→T替换突变是导致前-X基因编码失败的主要原因。结合上述结果，我们修正HBV基因结构图见图1，进一步的分子生物学和抗体流行病学研究正在进行之中^[63-65]。

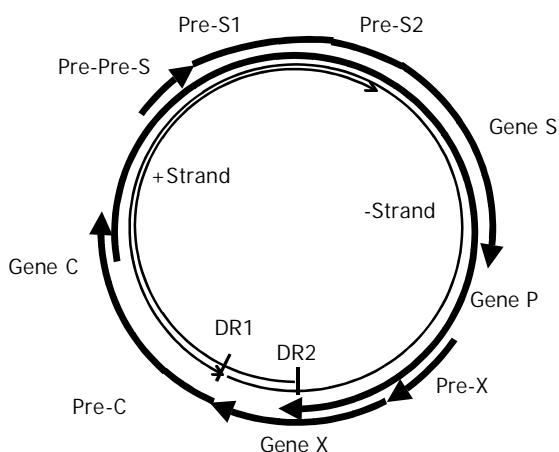


图1 HBV各ORF修正图。

2 S区和X基因启动子的重新定义

2.1 前-S启动子 为进一步证实上述的研究结果，本研究组扩增前-S ORF中ATG上游277 bp核苷酸序列，分析发现该序列富含TA(61%)，虽无真核生物的启动子元件TATA盒，但发现含有TATA样盒。以分离克隆株G387-A7为模板将该序列进行克隆，构建含报告基因CAT的重组质粒，瞬时转染HepG2细胞，酶联免疫黏附法(ELISA)方法检测氯霉素乙酰化酶(CAT)表达活性，结果发现我们界定的前-S基因启动子序列能够激活下游CAT的表达，具有启动子的活性，与pCAT-basic相比A值均明显升高。重复试验也得到了同样的结果。Bogomolski et al 亦发现前-S2/S启动子不含典型的TATA盒，但有启动子活性，可与胞核提取物特异结合。在与SP1、SP2比较的过程中发现，前-S基因与SP1部分重叠，这与SP2和前-S1的关系相似。前-S基因启动子完全包含在SP1中，前-S基因启动子与SP1的关系如何，二者之间是相互重叠，还是共用启动子？还有待于进一步研究，但可以肯定的是前-S基因ORF上游的序列具有启动子活性(图2)^[23]。

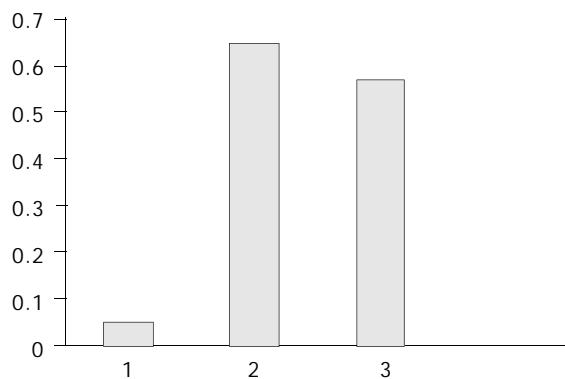


图2 pCAT3-前-S-p转染HepG2细胞24 h后CAT的表达。组1: pCAT-basic；组2: pCAT-promoter；组3 pCAT3-前-S-p。

2.2 前-X基因启动子讨论 为进一步证实前-X区的初步研究结果，聚合酶链反应(PCR)法扩增前-X基因ORF起始密码子ATG上游225 bp核苷酸序列，分析发现该序列含有真核生物的启动子元件TATA盒，与XP序列比较仅有30 bp的核苷酸重叠。以分离克隆株G387-A7为模板将该序列进行克隆，构建含报告基因CAT的重组质粒，瞬时转染HepG2细胞，ELISA方法检测CAT表达活性，结果发现确有启动子活性，与pCAT-basic、pCAT-promoter相比A值均明显升高。重复试验也得到了同样的结果，为研究前-X的存在提供了新的证据(图3)^[24]。

3 前-S基因和前-X基因的分子流行病学研究

3.1 前-S基因的分子流行病学研究 为证实前-S区的存在，采用PCR-TA克隆-测序方法测定前-

前-S区的编码方式，同时以巢式PCR-多引物PCR法确定患者体内HBV基因型，探讨基因型与前-S区编码区之间的关系，结果发现15例患者中，基因型C型9例，B型1例，B/C混合型5例；共31个克隆测序结果，均编码前-S区，编码区长度135 bp，编码45 aa。见图4。

结果证实：1. 前-S区编码是一种普遍现象；2. 前-S区编码与HBV基因型无关。

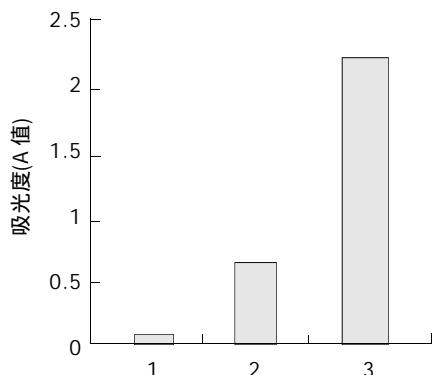


图3 pCAT3-前-X-p转染HepG2细胞后CAT的表达。组1：pCAT-basic；组2：pCAT-promoter；组3：pCAT3-前-X-p。

3.2 前-X基因的分子流行病学研究 为证实前-X区的存在，采用PCR-TA克隆-测序方法测定前-X区的编码方式，同时以巢式PCR-多引物PCR法确定患者体内HBV基因型，探讨基因型与前-X区编码区之间的关系，结果发现：17例患者中，A型1例，B型3例，C型10例，B/C混合型3例；共测序45个克隆，其中发生A²⁶⁰⁸→C/T替换突变者15例，发生C/A²⁷³³→T替换突变者13例，发生双突变10例，见表1。

表1 前-X区编码突变在HBV基因型中的分布

	A ²⁶⁰⁸ →C/T替换突变	C/A ²⁷³³ →T替换突变	双替换突变	编码前-X区
A型	0	0	1	0
B型	0	0	6	2
C型	5	3	0	18
B/C	0	0	3	7
比例 %	11.1	6.7	22.2	60

上述结果证明：1. C型编码前-X区的克隆数占总编码克隆数的66.7%，近年来的研究表明HBV C基因型是中国大陆地区主要流行基因型，因此推断前-X区编码现象在中国HBV感染者中较为普遍，这同时提示前-X区的编码具有一定的基因型特异性；2. C型编码前-X区发生突变而终止前-X表达的原因主要以A²⁶⁰⁸→C/T替换突变或C/A²⁷³³→T替换突变单突变形式为主，而B型、B/C型主要因为双突变的发生而导致了前-X区不编码蛋白(图5)。

总之，我们通过针对文献的再分析和分子生物学方法证实了前-S区和前-X区的实际存在，并重新确定了S区启动子和X启动子的位置，提出全S基因和全X基因在HBV基因组中的新位置，可能对HBV生活史、病毒受体、肝细胞的癌变等研究提出新的思路^[66-68]。

4 参考文献

- 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学, 第1版. 北京:人民军医出版社, 1997:179-182.
- 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
- 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. 中华肝脏病

```

ATG CAG TTA ATC ATT ACT TCC AAA CTA GGC ATT ATT TAC ATA CTC TGT GGA
M   Q   L   I   I   T   S   K   L   G   I   I   Y   I   L   C   G
AGG CTG GCA TTC TAT ATA AGA GAG AAA CTA CAC GCA GCG CCT CAT TTT GTG
R   L   A   F   Y   I   R   E   K   L   H   A   A   P   H   F   G
GGT CAC CAT ATT CTT GGG AAC AAG AGC TAC AGC
V   H   H   I   L   G   N   K   S   Y   S

```

图4 前-S区编码基因及蛋白质序列。

```

ATG GGG CTT GGC TAT TGG CCA TCG CCG CAT GCG TGG AAC CTT TGT GGC TCC
M   G   L   G   Y   W   P   S   P   H   A   W   N   L   C   G   S
TCT GCC GAT CCA TAC TGC GGA ACT CCT AGC AGC TTG TTT TGC TCG CAG CCG
S   A   D   P   Y   C   G   T   P   S   S   L   F   C   S   Q   P
GTC TGG AGC AAA ACT TAT CGG AAC CGA CAA CTC TGT CCT CTC TCG GAA
V   W   S   K   T   Y   R   N   R   Q   L   C   C   P   L   S   E
ATA CAC CTC CTT TCC
I   H   L   L   S

```

图5 前-X区编码基因及蛋白质序列。

- 杂志 2001;9:163-165
 4 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
 5 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
 6 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
 7 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
 8 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
 9 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
 10 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
 11 Gelibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. Nature 1979;281:646-650
 12 董菁, 成军, 王勤环, 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
 13 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
 14 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
 15 董菁, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 X 基因准种特点的研究. 中国病毒学 2002;17:22-26
 16 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
 17 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
 18 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
 19 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
 20 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
 21 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S 区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
 22 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
 23 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S - 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:762-764
 24 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;28:765-767
 25 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李载平. 克隆的 adr 亚型乙型肝炎病毒(pADR - 1)的核苷酸顺序. 中国科学 B 辑 1986;5:55-65
 26 Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H, Will H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. J Virol 1995;69:5437-5444
 27 Mukaiide M, Kumazawa T, Hoshi A, Kawaguchi R, Hikiji K. The complete nucleotide sequence of hepatitis B virus, subtype adr (SRADR) and phylogenetic analysis. Nucleic Acids Res 1992;20:6105
 28 Okamoto H, Imai M, Shimozaki M, Hoshi Y, Iizuka H, Gotanda T, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of a cloned hepatitis B virus genome, subtype ayr: comparison with genomes of the other three subtypes. J Gen Virol 1986;67:2305-2314
 29 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
 30 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
 31 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
 32 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
 33 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:233-236
 34 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
 35 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
 36 Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K. Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. Nucleic Acids Res 1983;11:4601-4610
 37 Mimms LT, Solomon LR, Ebert JW, Fields H. Unique preS sequence in a gibbon-derived hepatitis B virus variant. Biochem Biophys Res Commun 1993;195:186-191
 38 董菁, 成军, 王勤环, 刘妍, 王刚, 施双双, 夏小兵, 李克, 邵得志, 斯崇文. 乙型肝炎病毒囊膜中蛋白与白介素 - 18 联合基因免疫的实验研究. 中华传染病杂志 2002;20:148-151
 39 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. Hepatobiliary Pancreatic Dis Int 2002;1:238-242
 40 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002; 20:218-221
 41 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
 42 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:130-135
 43 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 郎振为, 皇甫竞坤, 李莉, 斯崇文. HBsAg 中蛋白与 IL - 18 联合核酸免疫 HBsAg 转基因小鼠的实验研究. 中华微生物与免疫学杂志 2002;22:518-519
 44 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
 45 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
 46 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
 47 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
 48 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟劲松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因的克隆化研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:5-7
 49 刘妍, 成军, 邵得志, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 李克, 李莉. HCV 核心蛋白与 HBV X 蛋白协同反式激活作用的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:39-41
 50 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 e 抗原与金属硫蛋白相互作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:451-453
 51 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

- 52 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
- 53 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 XTP3 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:229-232
- 54 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
- 55 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
- 56 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940
- 57 Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, Prince AM. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000;267:58-64
- 58 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
- 59 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的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1238-1240
- 60 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 1 的克隆化与序列分析. 世界华人消化杂志 2003;11:1107-1113
- 61 成军, 董菁, 洪源, 刘妍, 钟彦伟, 王琳, 王刚, 张玲霞, 陈菊梅. 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
- 62 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
- 63 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
- 64 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
- 65 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
- 66 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
- 67 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
- 68 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

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

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

胃癌相关基因GCRG224的克隆及其在大肠杆菌中的表达

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 王卫华

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 王卫华, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
伍银桥, 男, 1964-12-01生, 湖北省京山县人, 汉族. 2003年军医进修学院博士, 主要从事胃癌及癌前病变中癌相关基因异常的研究.
军队“十五”重点科研基金资助项目, No. 01Z035
项目负责人: 王孟薇, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼消化科. wuyq56@hotmail.com
电话: 010-66937393 传真: 010-66935470
收稿日期: 2003-12-27 接受日期: 2004-02-01

Cloning and expression of gastric cancer related gene GCRG224 in *E.coli*

Yin-Qiao Wu, Gang-Shi Wang, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Wei-Hua Wang

Yin-Qiao Wu, Gang-Shi Wang, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Wei-Hua Wang, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Supported by Key Project Grant in Medical Sciences from the Tenth Five-year Plan of Chinese PLA, No.01Z035
Correspondence to: Meng-Wei Wang, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. wuyq56@hotmail.com
Received: 2003-12-27 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To express gastric cancer related gene GCRG224 by using thioredoxin fusion expression system.

METHODS: GCRG224 cDNA with complete open reading frame was amplified by PCR from plasmid pGEM-T, and then cloned into thioredoxin fusion expression vector pET102/D-TOPO. The recombinant plasmid was further transformed into *E.coli* BL21 strain. After induction with IPTG, thioredoxin-GCRG224 fusion protein was expressed in *E.coli*.

RESULTS: SDS-PAGE analysis showed the thioredoxin-GCRG224 fusion protein with a relative molecule mass of 16 800 was highly expressed. The thin layer gel scanning analysis showed that the yield of GCRG224 fusion protein was 22.3% of the total bacterial protein.

CONCLUSION: The GCRG224 recombinant fusion protein is successfully expressed in *E.coli*.

Wu YQ, Wang GS, Wang MW, Wu BY, You WD, Wang WH. Cloning and expression of gastric cancer related gene GCRG224 in *E.coli*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):763-766

摘要

目的: 利用硫氧还蛋白融合表达系统表达胃癌相关基因 GCRG224.

方法: 采用PCR技术从pGEM-T质粒上扩增出含完整ORF的GCRG224 cDNA序列, 将其克隆至硫氧还蛋白融合表达载体 pET102/D-TOPO 中, 转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导表达重组融合蛋白, SDS-PAGE 分析表达产物.

结果: 高效表达出相对分子量约16 800的重组融合蛋白. 薄层凝胶扫描显示, 其表达量占菌体总蛋白质的 22.3%.

结论: 在大肠杆菌中成功表达了GCRG224重组融合蛋白.

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 王卫华. 胃癌相关基因 GCRG224 的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(4):763-766
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/763.asp>

0 引言

研究表明, 胃癌的发生发展过程中涉及到多种癌基因、抑癌基因的变化^[1-7], 但迄今为止, 仍未从基因角度阐明胃癌发生、浸润或转移等方面的机制, 胃癌的早期诊断、预后判断和治疗等各方面均无明显突破, 其年死亡率在我国仍居各类恶性肿瘤之首^[8-13]. 我们应用荧光标记的 mRNA 差异显示技术分析了我国人胃窦部进展期腺癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织之间表达基因的差异, 从中筛选并克隆出 1 条基因序列, 命名为 GCRG224, 生物信息学分析显示其与已知的蛋白质无同源性^[14-15]. 为了获得GCRG224蛋白并进一步研究其在胃癌发生发展中的作用, 我们通过PCR 方法, 扩增了含完整 ORF 的 GCRG224 cDNA 序列. 采用基因重组技术, 构建了融合基因表达载体 pET-224, 并在大肠杆菌中得到高效表达.

1 材料和方法

1.1 材料 含目的片段的 pGEM-T 质粒由本室王刚石博士构建保存. *E.coli* TOP10, BL21 StarTM(DE3) 菌株, platinum Pfx[®]DNA polymerase 和 pET102/D-TOPO 载体均为 Invitrogen 公司产品. IPTG, 质粒提取试剂盒购自 Promega 公司. DNA 分子质量标准 DL2000 购自宝生物工程有限公司(Takara). 蛋白质分子质量标准购自北京原平皓生物有限公司. SDS, Tris 碱为 Gibco 公司产品. 丙烯酰胺, 甘氨酸为 Sigma 公司产品. 按照 GCRG224 的 cDNA 序列设计了一对引物, 并根据表达载体要求在上游引物 5' - 端加入 CACC 序列, 以便于后续的定向克隆. 引

物由中国科学院微生物所合成。引物序列如下: P1: 5'-C ACC ATT CCT GGT AAC CCA AGT CC -3'; P2: 5'-GAG AGA AGG AAC TTA TCT ACG GC -3'。

1.2 方法 以 pGEM-T 质粒为模板, 以 P1, P2 为引物, 用 Pfx DNA 聚合酶扩增出含完整 ORF 的 GCRG224 cDNA 序列。PCR 扩增的条件是: 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1 min, 25 次循环反应后, 于 68 °C 继续延伸 10 min。表达载体的构建按产品说明将 PCR 产物与 pET102/D-TOPO 载体连接, 转化 TOP10 感受态菌, 随机挑取 10 个菌落, 进行 PCR 鉴定。选取经过 PCR 初步鉴定的阳性菌落, 送上海博亚生物工程公司测序。将质粒 DNA 转化 BL21 Star™(DE3)感受态菌, 接种于 10 mL 含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 液体培养基中, 37 °C 过夜培养后按 1:50 放大培养至 OD₆₀₀ 达 0.5-0.6, 加入 IPTG 至浓度为 1 mmol/L, 诱导培养 3-4 h。收集菌体进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。离心收集诱导培养的工程菌菌体, 悬浮于裂解缓冲液中, 经反复冷融或超声破碎后离心, 沉淀不溶解蛋白, 上清即为可溶组分, 再进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。根据上清组分与沉淀组分中的蛋白的含量, 判断其表达形式。

2 结果

2.1 目的基因片段的扩增及序列分析 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见 1 条清晰、单一、大小约 214 bp 的特异性扩增条带(图 1), 其大小与预计的相吻合。序列测定结果与理论预期一致。

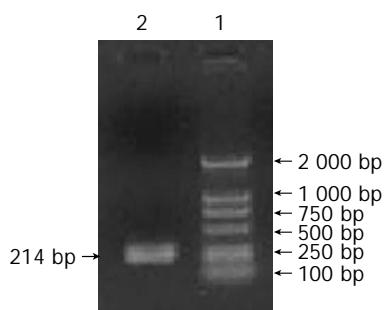


图 1 GCRG224 PCR 扩增片段。1: DNA marker; 2: PCR product.

2.2 融合蛋白表达的鉴定 SDS-PAGE 分析表明, 工程菌经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量约 16 800 处出现了 1 条明显的新蛋白带, 其大小与理论推算的融合蛋白相对分子质量相符合, 未诱导的工程菌中未见此带。在诱导后 1 h 该蛋白即开始表达, 3-4 h 达高峰。凝胶薄层扫描分析显示其表达量约占菌体总蛋白的 22.3%。将菌体进行冻融裂解或超声破碎、离心后分别取其上清和沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 发现无论诱导时间长短, thioredoxin/GCRG224 融合蛋白均主要以包涵体形式存在于沉淀中, 菌体裂解物上清在相应位置没有明确条带出现(图 2, 3)。

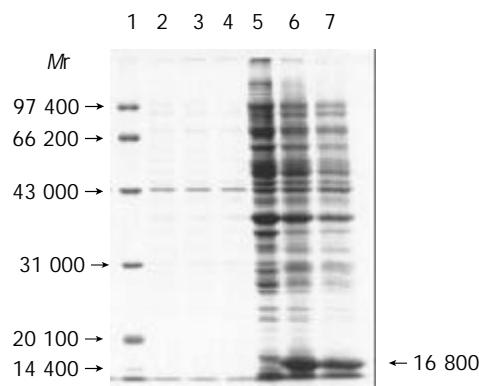


图 2 GCRG224 蛋白表达形式的确定。1: Marker; 2, 5: Supernatant and precipitation without induction; 3, 6: Supernatant and precipitation after induction with IPTG for 3 h; 4, 7: Supernatant and precipitation after induction with IPTG for 4 h。

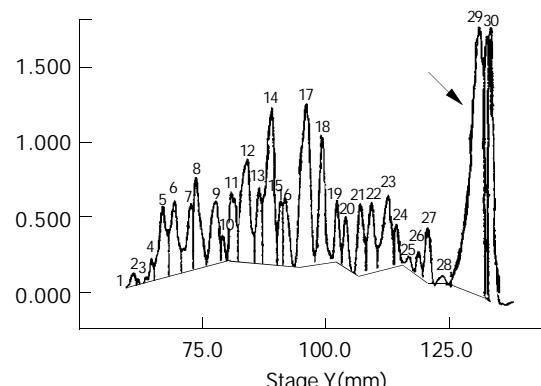


图 3 GCRG224 融合表达蛋白的 SDS-PAGE 凝胶薄层扫描图谱。

3 讨论

癌基因和抑癌基因以及与肿瘤发生相关的其他因素的研究一直是近年来肿瘤研究的焦点^[16-19]。在胃癌的发生发展过程中涉及到 HER2/neu, met, k-sam, ras, c-myc, Bcl-2, APC, E-Cadherin, p53, Rb, cyclin 等多种基因^[20-29]。但这些基因在胃癌组织中变异的特异性不强, 仍很难用作胃癌的监测指标。至今为止, 国内外缺乏对人胃癌组织特异性基因的了解和研究。GCRG224 是本实验室应用荧光标记的 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)从我国人胃窦部进展期腺癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织中筛选并克隆出的 1 条差异表达基因序列。GCRG224 在非癌组织的表达高于肿瘤组织; 原位杂交表明其在 5/30 例腺癌, 3/18 例不典型增生和 6/18 例肠上皮化生表达高于正常胃腺体, 而在 26/30 例正常胃黏膜上皮有显著过表达^[15]。

为了进一步弄清楚 GCRG224 在胃癌发生发展中的作用及在胃癌诊断中的意义, 我们以获得的含完整开放阅读框架的 GCRG224 cDNA 片段为切入点, 利用大肠杆菌高密度生长的优势和易于表达蛋白、纯化简单, 尤其是以融合蛋白表达的形式等特点, 进行了 GCRG224 cDNA 片段在原核系统中的表达, 为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的实验材料。可以预期, 对 GCRG224 的深入研究, 不仅有助于阐明胃

癌的发病机制, 也将为胃癌的诊断、治疗和预后判断提供新的思路和手段。通常PCR产物与载体的直接连接效率不高, 并且有非特异性背景菌落产生, 造成后续的筛选困难。而拓朴异构酶I却能高效且快速地将PCR产物与载体相连, 同时我们使用的TOPO平端克隆方法主要是载体进行了改良设计, 含有ccdB (control of cell death)基因^[30-32], 可降低非特异性背景菌落, 也易于筛选。在原核细胞表达时, 为获得产量高、利于基因工程下游纯化的工作, 目前多主张选用以融合蛋白表达形式的载体, 这样既能解决表达蛋白的纯化, 又可防止宿主蛋白酶对融合蛋白的降解, 有利于保护目的蛋白的生物活性。我们选用pET102/D-TOP0表达载体, 是近年构建的新型载体, 带有强大的T7表达启动子, 给实验操作带来极为有利的方便。

我们以pET102/D-TOP0载体高水平地表达了人thioredoxin/GCRG224融合蛋白, 产物表达量占菌体总蛋白的22.3%。我们选用pET102/D-TOP0载体除了希望得到高水平表达的重组融合蛋白, 同时还希望获得可溶性蛋白, 但其表达仍主要以包涵体的形式存在。究其形成包涵体的原因, 可能有以下几个方面:(1)重组蛋白的高水平表达。一般而言, 包涵体的形成是外源蛋白在大肠杆菌中高效表达时的普遍现象。(2)大肠杆菌胞质与真核细胞胞质环境的差异使重组的外源蛋白不能在大肠杆菌中进行正常的折叠^[33-34]。(3)包涵体的形成虽与所表达蛋白的分子无关, 但却受肽链氨基酸组成的影响, 大量疏水氨基酸的存在易促进蛋白的聚集^[35]。(4)细菌培养温度、pH等也可能影响包涵体的形成^[36-38]。包涵体蛋白虽然往往无生物活性, 需要重新溶解和复性, 但也为重组蛋白纯化带来了极大的方便, 此外, 包涵体的形成有利于防止蛋白酶对表达蛋白的降解, 增加了产物的稳定性。

4 参考文献

- 1 Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2002;17:323-329
- 2 Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:111-115
- 3 Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* 1995;75(6 Suppl):1410-1417
- 4 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, P53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 5 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:526-530
- 6 郝冬梅, 孙秀菊, 郑志红, 贺光, 马鸣超, 徐惠绵, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前病变相关基因的筛查及表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:6-9
- 7 吴云林, 陈颖. 早期胃癌的临床筛选研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1372-1375
- 8 黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 申明识. 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:1297-1301
- 9 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carci-noma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- 10 Fang DC, Luo YH, Lu R, Liu WW. Studies on the relationship between the point mutation of ras oncogenes and the prognosis of patients with gastric cancer. *China Nati J New Gastroenterol* 1997;3:19-21
- 11 Zuo DS, Dai J, Bo AH, Fan J, Xiao XY. Significance of expression of heat shock protein90alpha in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2616-2618
- 12 王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆序, 王刚石, 李晖, 姚晨, 吴本俨, 尤纬缔. 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访. 世界华人消化杂志 2003;11:1279-1281
- 13 Lu JB, Sun XB, Dai DX, Zhu SK, Chang QL, Liu SZ, Duan WJ. Epidemiology of gastroenterologic cancer in Henan Province, China. *World J Gastroenterol* 2003;9:2400-2403
- 14 Wang GS, Wang MW, You WD, Li H. Cloning and primary expression analyses of down-regulated cDNA fragment in human gastric cancer. *Chin J Med Genet* 2001;18:43-47
- 15 Wang GS, Wang MW, Wu BY, You WD, Yang XY. A novel gene, GCRG224, is differentially expressed in human gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 2003;9:30-34
- 16 Becker KF, Keller G, Hoefer H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol* 2000;9:5-11
- 17 Boussioutas A, Taupin D. Towards a molecular approach to gastric cancer management. *Intern Med J* 2001;31:296-303
- 18 Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 2001;4:113-121
- 19 Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytol* 2001;204:49-95
- 20 Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 2001;19:554-568
- 21 Amemiya H, Kono K, Itakura J, Tang RF, Takahashi A, An FQ, Kamei S, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. C-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology* 2002;63:286-296
- 22 Hattori Y, Itoh H, Uchino S, Hosokawa K, Ochiai A, Ino Y, Ishii H, Sakanoto H, Yamaguchi N, Yanagihara K, Hirohashi S, Sugimura T, Terada M. Immunohistochemical detection of K-sam protein in stomach cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1373-1381
- 23 Yoo J, Park SY, Robinson RA, Kang SJ, Ahn WS, Kang CS. Ras gene mutations and expression of Ras signal transduction mediators in gastric adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1096-1100
- 24 Lee JH, Abraham SC, Kim HS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;161:611-618
- 25 Ishii HH, Gobe GC, Pan W, Yoneyama J, Ebihara Y. Apoptosis and cell proliferation in the development of gastric carcinomas: associations with c-myc and p53 protein expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:966-972
- 26 Fricke E, Keller G, Becker I, Rosivatz E, Schott C, Plaschke S, Rudelius M, Hermannstadter C, Busch R, Hofler H, Becker KF, Luber B. Relationship between E-cadherin gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, Bcl-2 expression and Ki-67 staining in diffuse-type gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003;104:60-65
- 27 Ougolkov A, Yamashita K, Bilim V, Takahashi Y, Mai M, Minamoto T. Abnormal expression of E-cadherin, beta-catenin, and c-erbB-2 in advanced gastric cancer: its association with liver metastasis. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:160-166
- 28 Zhou Y, Gao SS, Li YX, Fan ZM, Zhao X, Qi YJ, Wei JP, Zou JX, Liu G, Jiao LH, Bai YM, Wang LD. Tumor suppressor gene p16 and Rb expression in gastric cardia precancerous lesions from subjects at a high incidence area in northern China. *World J Gastroenterol* 2002;8:423-425
- 29 Chetty R, Sitti CW. Cyclin E immunoexpression in gastric

- cancer does not correlate with clinicopathological parameters. *Histopathology* 2003;42:66-69
- 30 Van Melderen L. Molecular interactions of the CcdB poison with its bacterial target, the DNA gyrase. *Int J Med Microbiol* 2002;291:537-544
- 31 Lew BM, Paulus H. An in vivo screening system against protein splicing useful for the isolation of non-splicing mutants or inhibitors of the RecA intein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* 2002;282:169-177
- 32 Dao-Thi MH, Charlier D, Loris R, Maes D, Messens J, Wyns L, Backmann J. Intricate interactions within the ccd plasmid addiction system. *J Biol Chem* 2002;277:3733-3742
- 33 Carrio MM, Villaverde A. Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett* 2003;537:215-221
- 34 Middelberg AP. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 2002;20:437-443
- 35 Zhu H, Liu W, Shi W, Xue Y, Kuai L, Ma Z. In vitro renaturation of recombinant human pro-urokinase expressed in *Escherichia coli*. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:186-190
- 36 Chalmers JJ, Kim E, Telford JN, Wong EY, Tacon WC, Shuler ML, Wilson DB. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:104-111
- 37 Gavit P, Better M. Production of antifungal recombinant peptides in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2000;79:127-136
- 38 Yang Q, Xu J, Li M, Lei X, An L. High-level expression of a soluble snake venom enzyme, glossedobin, in *E. coli* in the presence of metal ions. *Biotechnol Lett* 2003;25:607-610

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) 应多用前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>。

胃癌候选抑癌基因 Syk 表达的意义

夏建国, 丁永斌, 陈国玉

夏建国, 丁永斌, 陈国玉, 南京医科大学第一附属医院普外科 江苏省南京市 210029
夏建国, 男, 1961-06 生, 2003 年南京医科大学博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 胃肠疾病.
江苏省高校自然科学研究基金资助, No. 03KJD320138
项目负责人: 夏建国, 江苏省南京市广州路 300 号, 南京医科大学第一附属医院普外科. njdyb@sina.com
电话: 025-86563750
收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

Expression of tyrosine kinase Syk and its clinical significance in gastric carcinoma

Jian-Guo Xia, Yong-Bin Ding, Guo-Yu Chen

Jian-Guo Xia, Yong-Bin Ding, Guo-Yu Chen, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by the Science Fund of Department of Education of Jiangsu Province, No. B (03KJD320138)
Correspondence to: Jian-Guo Xia, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. njdyb@sina.com
Received: 2003-06-27 Accepted: 2003-08-16

Abstract

AIM: To evaluate the effects of the Syk mRNA expression in human gastric carcinoma on tumor growth and metastasis, and the correlation of expression of the Syk gene with p53.

METHODS: Using semi-RT-PCR technique, we detected specimens from 61 gastric carcinoma patients (tumor tissues, adjacent normal tissues) for their rate and level of Syk and p53 gene expression. Meanwhile, immunohistochemical staining was also used to detect Syk expression.

RESULTS: All normal gastric tissues were detected the expression of the Syk gene. Unlike normal tissue, 47 out of 61 breast cancer tissue did not show any detectable Syk mRNA expression, and there were significant difference between the two groups ($\chi^2=72.3$, $P < 0.05$). The level of Syk mRNA in the primary gastric carcinoma tissues was significantly lower than that in the adjacent non-cancerous gastric tissues ($t=2.1$, $P < 0.05$). Furthermore, only 3 gastric carcinoma tissues in 31 patients with lymph node metastasis had the Syk mRNA expression. The Syk mRNA expression was negatively correlated to lymph node metastasis ($\chi^2=4.85$, $P < 0.05$). And the Syk expression was correlated to that of p53 ($\chi^2=22.03$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of the Syk gene may play an important role in suppressing growth and metastasis in gastric cancer. Syk gene expression is repressed in a p53-dependent manner.

Xia JG, Ding YB, Chen GY. Expression of tyrosine kinase Syk and its clinical significance in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):767-769

摘要

目的: 探索酪氨酸激酶 Syk (spleen tyrosine kinase, Syk) 基因的表达与胃癌生成及转移的关系.

方法: 用半定量 RT-PCR 检测胃癌组织、正常胃组织 61 例 Syk mRNA, p53 的表达, 同时用免疫组化方法检测 Syk 的表达.

结果: 所有正常胃组织都有 Syk 基因的表达, 而 61 例胃癌组织中只有 14 例表达, 正常胃组织 Syk 基因表达率显著高于胃癌组织 ($\chi^2=72.3$, $P < 0.05$), 且胃癌组织中 Syk mRNA 含量比正常胃组织显著降低 ($t=2.1$, $P < 0.05$). 31 例有淋巴结转移的胃癌组织中, 3 例有 Syk 基因表达, 30 例无淋巴结转移的胃癌中有 11 例检测到 Syk mRNA 的表达, 有淋巴结转移的胃癌 Syk mRNA 的表达率和表达水平显著降低 ($\chi^2=4.85$, $P < 0.05$), 且 Syk mRNA 表达与 p53 的表达呈正相关 ($\chi^2=22.03$, $P < 0.05$).

结论: Syk 基因的表达缺失与胃癌的生长及转移相关, 呈 p53 依赖性.

夏建国, 丁永斌, 陈国玉. 胃癌候选抑癌基因 Syk 表达的意义. 世界华人消化杂志 2004;12(4):767-769

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/767.asp>

0 引言

胃癌的发生、发展是一个复杂的多阶段的过程, 包括癌基因的激活和抑癌基因的变异和缺失. 在对胃癌的研究中, 基因的变异对肿瘤的生成和转移一直是焦点^[1-2], 在胃癌的信号传导途径中, 酪氨酸激酶起着至关重要的作用. 酪氨酸激酶 Syk 是一种非受体型蛋白酪氨酸激酶, 近来的研究表明 Syk 的表达缺失与恶性肿瘤的发病机制有关, 其被认为能抑制恶性肿瘤的生长和转移. 我们用半定量 RT-PCR 法检测胃癌中 Syk 的表达情况, 同时分析患者的发病年龄、肿瘤大小, 病理分级、淋巴结转移的情况, 以探讨 Syk 的表达与胃癌病理特征的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 我院 2002-08/2003-08 手术切除的胃癌标本 61 例, 分别取瘤体及距瘤体 5 cm 外正常胃组织标本,

迅速经液氮冷冻后置-70℃冰箱保存备用。年龄16-80岁(平均55岁),男37例,女24例,有淋巴结转移31例。所有肿瘤标本都经病理证实,总RNA的提取采用Roche公司Trizol RNA提取试剂。

1.2 方法 按说明书过程提取总RNA, RT及PCR在PE-2400型PCR仪上进行。取总RNA4 μL经RNase Free DNase消化可能存在的痕量DNA后,采用逆转录酶Mu-MLV按20 μL体系42℃逆转录45 min, 99℃ 5 min灭活AMV酶。取得的cDNA按50 μL的体系进行PCR扩增, PCR反应系统如下: 10×Buffer 5 μL, MgCl₂ 3 μL, dNTP Mix 1 μL, 引物1, 2各1 μL, Taq酶0.5 μL, 模板10 μL, 无核酸水33.5 μL。预变性94℃ 5 min, 94℃变性45 s, 61℃退火1 min, 72℃延伸45 s, 30个循环后72℃延伸7 min。Syk扩增引物正链为: 5'-CATGTCAAGGATAAGAACATCATAGA-3'; 反链为: 5'-AGTCACCACTGTCATAGTAGTAATT-3', 扩增片段为514 bp。并用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)用作内对照, GAPDH引物正链为: 5'-AGAAGGCTGGG GCTCATTGCAGGG-3', 负链为: 5'-GTCACTGG CGTCTCACCAACCATG-3', 扩增片段为143 bp。PCR产物5 μL于15 g/L琼脂糖凝胶电泳,于紫外分析仪下分析结果。电泳产物条带用Fluor-S多图像分析,每一电泳带的强度与GAPDH相对照,算出每一PCR产物的相对含量。p53扩引物正链为5'-ACGACGGGGCTGGT TGCCCA-3', 反链为5'-CTCCCAGAGACCCCCAGT TGC-3', 扩增片段为201 bp, 反应条件为预变性94℃ 5 min, 94℃变性30 s, 56℃退火30 min, 72℃延伸30 s, 30个循环后72℃延伸7 min。

同时用免疫组化检测患者Syk表达情况,瘤体标本中性甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,厚约4 μm进行免疫组化检查。切片脱蜡水化后, PBS(磷酸缓冲液, PH=7.4)冲洗3次, 3 min/次; 加过氧化物酶阻断溶液50 μL, 以阻断内源性过氧化酶活性, 室温下孵育10 min; 切片放入盛有0.01 mol/L PBS溶液中置微波炉中至90℃左右, 10 min。PBS冲洗3次, 每次3 min。每张切片加入100 mL/L羊血清50 μL, 室温下孵育10 min, PBS冲洗1次。切片中加入第一单抗(鼠抗人Syk, 1:25,)50 μL室温下反应2 h; PBS冲洗3次, 3 min/次。再加入生物素标记的二抗(羊抗鼠IgG, 1:50)后室温下孵育10 min, PBS冲洗, 加入链球菌抗生素-过氧化物溶液50 μL, 室温下孵育10 min, PBS冲洗, 最后切片上加入新配制的DAB(联苯二胺)溶液100 μL, 蒸馏水冲洗, 苏木素染色, 梯度酒精脱水干燥, 中性树胶封闭。Syk为细胞膜着色,按肿瘤细胞着色强度及阳性细胞的分析范围分为两个等级:以10-30%细胞呈弱、中等强度阳性反应为标准,分为阴性和阳性,并分析其与患者肿瘤大小、肿瘤分级、淋巴结大小情况。

统计学处理 不同组织中Syk基因的表达强度的比较用t检验。相关性分析采用χ²统计学分析。

2 结果

2.1 Syk在胃癌组织中的表达 应用RT-PCR法,正常胃组织61例均能检测出Syk mRNA的表达,而胃癌标本61例仅14例有Syk mRNA的表达($\chi^2=72.3$, P<0.05, 图1)。有淋巴结转移的31例胃癌中,有3例可检测出Syk mRNA表达,而无淋巴结转移的30例胃癌组织中11例有Syk mRNA表达($\chi^2=4.85$, P<0.05)。Syk mRNA的表达与年龄、肿瘤分级、大小及浸润深度无关(资料未列出)。应用免疫组化法,在61例正常胃组织中有56例Syk阳性,61例胃癌组织中有12例阳性,两组Syk阳性率差异有显著性($\chi^2=61.43$, P<0.05)。RT-PCR法和免疫组化法检测Syk的阳性率没有显著性差异($\chi^2=3.27$, P>0.05)。

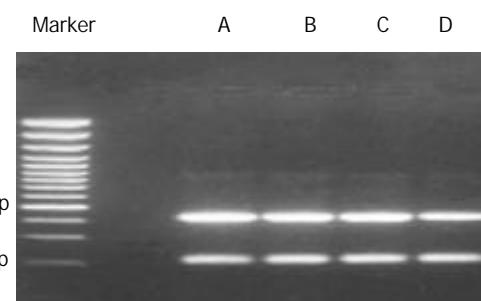


图1 正常胃组织Syk基因PCR产物电泳图。

2.2 半定量RT-PCR RT-PCR产物10 μL用15 g/L的琼脂糖电泳, GAPDH作为对照, 分析不同组织中Syk含量(图1)。胃癌组织中Syk表达水平为1.71±1.23, 邻近正常胃组织中为3.19±0.59, 胃癌组织Syk/GAPDH比邻近组织显著降低($t=2.1$, P<0.05)。有转移的胃癌组织Syk表达水平为1.18±1.13, 无转移的胃癌组织Syk表达水平为2.14±1.27, 有转移的胃癌组织中Syk/GAPDH比无转移者显著降低($t=3.4$, P<0.05)。

2.3 p53基因在胃癌组织中的表达 61例胃癌组织中有19例可检测到p53基因, 邻近正常胃组织中有53例有p53基因表达, 胃癌组织中Syk基因表达率显著低于正常胃组织($\chi^2=36.91$, P<0.05)。31例有淋巴结转移的胃癌组织中p53 mRNA表达阳性4例, 30例无淋巴结转移的胃癌组织中阳性表达15例, 有淋巴结转移p53 mRNA阳性率显著低于无淋巴结组($\chi^2=8.13$, P<0.05)。

2.4 Syk mRNA与p53 mRNA表达的关系 p53表达阳性的19例胃癌瘤体中, 有12例检出Syk mRNA的表达, 42例p53阴性胃癌组织中Syk mRNA的表达2例, p53表达阳性的胃癌组织Syk mRNA的表达检测高于p53表达阴性的胃癌组织($\chi^2=22.03$, P<0.05)。

3 讨论

Syk广泛在造血细胞上表达, 长期以来一直作为信号传导过程中一个影响因子而被广泛研究。在前后串排和多个自体磷酸化部位含有两个Src同源序列SH2。Syk通过SH2区域与依赖酪氨酸的免疫受体活化基序(ITAM)

结合而活化，并且在淋巴细胞发展及免疫细胞活化过程中起着极为重要的作用，Syk 的表达缺失可导致 B、T 细胞的成熟障碍，从而使机体失去对突变细胞的监控作用^[3]。

我们应用 RT-PCR 及免疫组化法检测 Syk 在胃癌的表达情况，结果发现 Syk mRNA 在胃正常组织中表达率及表达水平高于胃癌组织，两组差异有显著性，这表明 Syk mRNA 的表达缺失可能与胃癌的发生有关，Sada et al 认为 Syk 是一种候选抑癌基因，Syk 的缺失会致免疫细胞发育、成熟障碍，重者会导致重症联合免疫缺陷病(SCID)，从而使肿瘤易于发生。同时我们也注意到 RT-PCR 法检测 Syk 的阳性率高于免疫组化法，但两种检测方法差异没有显著性，这可能与样本量过小有关。

在 31 例有淋巴结转移的胃癌组织中只有 3 例检测到 Syk mRNA 的表达，有淋巴结转移的胃癌细胞的 Syk mRNA 的检测率远低于无淋巴结转移组，这表明 Syk mRNA 的表达缺失可能与胃癌的淋巴转移有关，但非受体型酪氨酸激酶 Syk 的信号传导在肿瘤的转移过程中如何起作用还不清楚。Carter WB 认为 Syk 与 HER2/neu 一对功能相反的抑癌/癌基因，HER2/neu 的过度表达可诱导血管内皮细胞的收缩，从而使肿瘤细胞易于穿过血管屏障，易于发生转移，而 Syk 可抑制 HER2/neu 的收缩血管内皮细胞作用，从而抑制肿瘤的转移^[4]。Mahabeleshwar 研究认为 Syk 通过抑制 PI-3 (phosphatidylinositol 3, PI-3) 激酶的活性，从而抑制肿瘤细胞的分裂和核因子 NF-κB 调节的 u-PA(urokinase type plasminogen, u-PA) 的激活分泌，而过去研究证实 u-PA 的激活分泌与多种恶性肿瘤的发生、发展及转移相关^[5-6]。

在 p53 表达阳性的胃癌组织中，Syk mRNA 的表达率及表达水平较高，且与 p53 表达相关，Syk 基因的

表达呈 p53 依赖性的，在肿瘤生成过程中 p53 的功能丧失会导致 Syk 的活性下降，从而使肿瘤易于生成和转移。Syk 是内皮细胞生长的重要调控因素，非受体型蛋白酪氨酸激酶在胃癌的生成、转移过程中的作用尚进一步探索。现在的初步研究为将来防治胃癌提供了新的分子学靶位，因而对 Syk 的进一步深入研究，必将为胃癌治疗的提供新的策略^[7-8]。

4 参考文献

- 1 李庆明, 余谦, 闵存云. P53 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用. 世界华人消化杂志 2003;11:997-1000
- 2 郝冬梅, 孙秀菊, 郑志红, 贺光, 马鸣超, 徐惠绵, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前病变相关基因的筛查及表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:6-9
- 3 Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem (Tokyo)* 2001; 130:177-186
- 4 Carter W, Hoying JB, Boswell C, Williams SK. HER2/neu over-expression induces endothelial cell retraction. *Int J Cancer* 2001;91:295-299
- 5 Mahabeleshwar GH, Kundu GC. SYK, a protein-tyrosine kinase suppresses the cell motility and nuclear factor κB mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3 -kinase activity in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:6209-6221
- 6 Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Hara Y, Omoto Y, Sugiura H, Zhang ZH, Fujii Y. Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2003;189:97-102
- 7 Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1409-1414
- 8 Wang L, Duke L, Zhang PS, Arlinghaus RB, Symmans WF, Sahin A, Mendez R, Dai JL. Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Res* 2003;63:4724-4730

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。

胃癌变前后凋亡相关蛋白和PCNA的表达

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 中国人民解放军总医院南楼消化科
北京市 100853
祝庆孚, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853
伍银桥, 男, 1964-12-01生, 湖北省京山县人, 汉族。1997年军医进修学院
硕士, 主要从事胃癌及癌前病变中癌相关基因异常的研究。
军队“十五”重点科研基金资助项目, No.01Z035
项目负责人: 王孟薇, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院
南楼消化科。wuyq56@hotmail.com
电话: 010-66937393 传真: 010-66935470
收稿日期: 2003-12-17 接受日期: 2004-02-01

Expression of apoptosis-related proteins and proliferating cell nuclear antigen during stomach canceration

Yin-Qiao Wu, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You,
Qing-Fu Zhu

Yin-Qiao Wu, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Department
of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA,
Beijing 100853, China
Qing-Fu Zhu, Department of Pathology, General Hospital of Chinese
PLA, Beijing 100853, China
Supported by Key project grant in medical sciences from the tenth
five-year plan of Chinese PLA, No.01Z035
Correspondence to: Meng-Wei Wang, Department of Gastroenterology,
South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China.
wuyq56@hotmail.com
Received: 2003-12-17 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To study the role of apoptosis-related gene p53, Bcl-2, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in gastric carcinogenesis.

METHODS: Immunohistochemical method (LSAB) was used to assess p53, Bcl-2, PCNA expression in specimens of 52 patients with gastric cancer and precancerous lesions.

RESULTS: In the patients with intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer, the expression rates of p53 were 27.8%, 38.2% and 57.7% respectively. The expression rates of Bcl-2 were 33.3%, 50.0% and 65.4%, and PCNA indexes were 41.4±13.0, 47.9±8.9 and 53.0±11.9 respectively. In patients with intestinal-type carcinoma, p53 and Bcl-2 remained expressed in all precancerous tissues after development into cancer. In diffuse-type carcinoma, the positive Bcl-2 expression became negative in one patient. PCNA LI markedly increased from precancerous lesions to cancer, and a significant difference was observed in intestinal-type carcinoma ($P < 0.001$).

CONCLUSION: The expression of p53 and Bcl-2 significantly influences the development of intestinal-type gastric carcinoma, and the proliferating activity of the cancer cells gradually increase.

Wu YQ, Wang MW, Wu BY, You WD, Zhu QF. Expression of apoptosis-related proteins and proliferating cell nuclear antigen during stomach canceration. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):770-773

摘要

目的: 探讨凋亡相关基因 p53, Bcl-2 和增生细胞核抗原 (PCNA) 在胃癌发生中的作用以及在胃癌早期诊断中的意义。

方法: 采用免疫组化(LSAB) 方法检测52例胃癌癌变前后组织标本的 p53, Bcl-2 和 PCNA 的表达。

结果: 肠上皮化生、不典型增生和胃癌的 p53 蛋白表达分别为 27.8%, 38.2% 和 57.7%; Bcl-2 蛋白表达分别为 33.3%, 50.0% 和 65.4%; PCNA LI 分别为 41.4 ± 13.0 , 47.9 ± 8.9 和 53.0 ± 11.9 。在肠型胃癌, 癌前 p53, Bcl-2 阳性者发展到癌时仍全为阳性, 无 1 例转阴性; 在弥漫型胃癌, 癌前 Bcl-2 阳性者到癌时有 1 例转阴; PCNA LI 由癌前发展到癌时明显增高, 在肠型胃癌差异有显著性($P < 0.001$)。

结论: 在肠型胃癌发生发展过程中, p53, Bcl-2 蛋白表达起重要作用, 且细胞增生活性逐渐升高。

伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚. 胃癌变前后凋亡相关蛋白和 PCNA 的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(4):770-773

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/770.asp>

0 引言

胃癌的发生发展是一个多基因变异累积逐渐演变的复杂过程, 包括癌基因的激活和抑癌基因的失活而导致无限制增生^[1-2], 同时, 肿瘤的发生与凋亡也有密切关系^[3-6]。细胞增生与凋亡的失衡导致细胞的过度积聚, 可能是胃癌发生的病理基础^[7-9]。为探讨凋亡相关蛋白在胃癌发生不同阶段中的作用及细胞增生活性的变化, 我们检测了凋亡相关基因 p53, Bcl-2 以及增生细胞核抗原(PCNA)在胃癌变前后组织标本中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 经胃镜下黏膜活检和 / 或手术切除胃标本的病理检查诊断为癌、资料完整、在最后诊断前具有随访结果的病例共 52 例, 均为男性, 年龄 62-82 岁(平均 70.1 岁)。经 Lauren 分型示肠型胃癌 40 例, 弥漫型胃癌 12 例。根据病变的不同阶段分为两个组:“癌时”即经胃镜黏膜活检或手术切除胃标本诊断为癌当时的标本。“癌前”即在癌诊断之前、随访时间超过 1 a、且与

发生癌部位相同的黏膜活检组织第1次经病理诊断为中重度肠上皮化生或中重度异型增生的标本, 随访时间为1-11.4 a(平均为3.7 a)。其中中重度肠上皮化生病例18例, 中重度异型增生病例34例。

1.2 方法 p53, Bcl-2蛋白表达及PCNA均采用免疫组化LSAB法检测。抗p53 mAb(DO-1)和抗Bcl-2 mAb购于北京中山生物技术有限公司, PCNA mAb和LSAB试剂盒为Dako公司产品。实验步骤按试剂盒说明书进行。阳性对照为已知阳性组织切片在同一条件下反应, 阴性对照以正常兔血清代替第一抗体。p53, Bcl-2结果按如下方法进行评分: (1)阳性着色程度: 无着色为0, 浅着色为1, 深着色为2; (2)阳性着色范围: 无着色为0, 着色小于1/3为1, 着色大于1/3为2, 弥漫性着色为3。然后将以上两项相加为最后结果: 大于或等于3为阳性病例。PCNA计数用PCNA标记指数(PCNA LI): LI=PCNA阳性细胞数/计数细胞总数×100%。

统计学处理 所得数据采用 χ^2 检验、t检验。

2 结果

2.1 胃癌变前后p53, Bcl-2及PCNA的表达 从肠上皮化生、不典型增生到胃癌组织, p53和Bcl-2表达阳性率逐渐增高, 且p53, Bcl-2表达阳性率在胃癌组织与中重度肠上皮化生间差异有显著性($P < 0.05$), 而胃癌组织和不典型增生、不典型增生和肠上皮化生之间差异尚无显著性($P > 0.05$)。PCNA LI在肠上皮化生、不典型增生到胃癌组织也逐渐递增, 且相互之间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$, 表1)。p53阳性着色位于细胞核, 呈棕黄色颗粒状。Bcl-2阳性着色位于细胞质, 呈棕黄色。各切片显色分布不均, 以片状和局灶性为主, 少数为弥漫性分布。PCNA阳性着色位于细胞核, 呈棕黄色细颗粒状。

表1 胃癌和癌前组织p53, Bcl-2及PCNA的表达n(%)

分组	n	p53	Bcl-2	PCNA/mean ± SD
胃癌组织	52	30(57.7) ^a	34(65.4) ^a	53.0 ± 11.9 ^a
不典型增生	34	13(38.2)	17(50.0)	47.9 ± 8.9 ^a
肠上皮化生	18	5(27.8)	6(33.3)	41.4 ± 13.0

^aP < 0.05 vs 肠上皮化生。

2.2 胃癌变前后p53, Bcl-2和PCNA的自身对照 癌前p53阳性者18例到癌时仍全部为阳性, 癌前p53阴性到发展为癌时则有12例表达阳性, 主要为肠型胃癌, 而没有1例癌前p53阳性者在癌时转为阴性。发展为弥漫型胃癌者在癌前阴性到癌时基本上仍为阴性(9/10)。Bcl-2蛋白表达在肠型胃癌中, 癌前阳性者到发展为癌时仍持续阳性, 没有1例转阴性, 癌前阴性者到癌时则有9例转为阳性。在弥漫型胃癌, 癌前Bcl-2阳性者到癌时有1例转为阴性, 癌前阴性者到癌时也有3例

转为阳性(表2)。在肠型胃癌, PCNA LI在癌时较癌前明显增加, 差异有显著性($P < 0.001$); 而在弥漫型胃癌, 虽然癌时PCNA LI较癌前也增高, 但差异无显著性($P > 0.05$, 表3)。

表2 胃癌变前后p53, Bcl-2的自身对照(n = 52)

癌前	n	肠型胃癌		弥漫型胃癌	
		+	-	+	-
p53	+	18	16	0	2
	-	34	11	13	1
Bcl-2	+	23	20	0	2
	-	29	9	11	3

表3 胃癌变前后PCNA的比较(mean ± SD)

胃癌	n	癌前	癌时	癌变前后差	P值
肠型	40	43.9 ± 11.2	54.0 ± 11.6	10.1 ± 14.6	0.0004
弥漫型	12	46.4 ± 10.2	49.2 ± 12.8	2.8 ± 14.0	0.5047

3 讨论

正常人胃黏膜上皮组织更新较快, 以细胞凋亡和增生维持着细胞总数的平衡, 倘若这一平衡失常, 就有可能导致许多疾病发生^[9]。细胞凋亡与细胞增生平衡的失调在胃癌的发生发展过程中起重要作用^[3, 6-8]。细胞凋亡受众多基因调控, 其中最为重要的是Bcl-2家族和p53, 这些基因的产物表达异常可促使细胞恶性增生并阻止细胞凋亡。p53基因的主要生物学功能是监护细胞基因的完整性, DNA受损时, p53基因编码产生的蛋白积聚, 复制终止, 利于DNA修复, 如修复失败, 则诱发细胞凋亡。p53基因的突变则丧失其功能, 还具有促进细胞恶性转化的功能, 导致细胞恶性增生。用免疫组化法可检出p53蛋白的异常表达且与p53基因突变有良好的相关性^[10]。p53基因的突变常见于胃癌中, 且p53蛋白的异常表达与胃癌的进展及预后有关^[11-15]。在胃癌前病变中也有异常表达, 多数研究结果认为p53基因突变于癌变后期才发生^[3, 16-17], 但也有人在肠化生阶段检测到p53基因突变, 认为其属于胃癌变过程中的早期事件^[18-19]。本研究中, p53基因在中重度肠上皮化生和中重度不典型增生阶段均有阳性表达, 且随肠上皮化生→不典型增生→胃癌, 其阳性表达率逐渐增加。对癌变前后的自身对照研究发现, 癌前p53阳性者18例到癌时仍全部为阳性, 癌前p53阴性到发展为癌时出现阳性者有12例, 主要为肠型胃癌, 而没有1例癌前p53阳性者在癌时转阴。发展为弥漫型胃癌者在癌前阴性到癌时基本上仍为阴性(9/10)。结果提示从胃黏膜肠上皮化生、异型增生及其向胃癌演变过程中, p53基因的表达起着重要的作用, 特别是在肠型胃癌的发展过程中, p53的作用尤其突出, 在癌前表达阳性者将持续表达直到发生癌, 癌前p53不表达者, 在恶变的过程中, 也

可逐渐出现表达。而在弥漫型胃癌，p53的作用显得并不明显，可以持续为阴性。

Bcl-2是目前公认的一种重要的调节细胞凋亡基因^[20]，他的激活和过表达能抑制细胞正常的凋亡。Bcl-2基因并不影响细胞的增生，而是通过抑制细胞凋亡而延长细胞寿命，从而增加了肿瘤发生的机会并促进肿瘤的发展。Bcl-2表达与胃癌发生发展有关^[21-26]。本研究显示，胃癌时组织Bcl-2阳性率为65.4%(34/52)，中重度不典型增生Bcl-2阳性率为50.0%(17/34)，中重度肠上皮化生Bcl-2阳性率为33.3%(6/18)。从肠上皮化生→不典型增生→胃癌，其阳性表达率也逐渐增加。对癌变前后Bcl-2表达的自身对照，发现在肠型胃癌，癌前Bcl-2阳性者到发展为癌时仍持续阳性，没有1例转阴，而癌前阴性者到癌时则有9例转阳性。提示Bcl-2表达与从肠上皮化生、异型增生到癌的发展过程相关。而在弥漫型胃癌，癌前Bcl-2阳性者到癌时有1例转阴性，癌前阴性者到癌时也有3例转为阳性，提示在弥漫型胃癌的发生发展过程中，Bcl-2基因的表达关系不大。

肿瘤细胞的最基本特征是增生失控所致的持续不断的增生。PCNA是一种核蛋白，几乎所有处于增生状态的细胞核均有表达。他是DNA合成酶δ的辅助蛋白，为细胞合成DNA所必需，细胞动力学研究表明其表达及合成与细胞增生周期有关，G₁期PCNA逐渐增多，S期达高峰，因此他能准确地反映细胞的生长速度和状态。PCNA阳性细胞的多少与肿瘤发展、预后均有密切关系^[27-30]。在肿瘤的发生过程中，细胞增生活跃，处于增生状态，其PCNA表达明显增强，且随着疾病的发展PCNA LI也逐渐增加^[31]。我们的结果也证实了这一点，PCNA在整个胃癌的演化过程中，一直处于逐步上升状态。发展为肠型胃癌者癌时的PCNA LI显著高于癌前。在由癌前向癌的发展过程中，细胞处于增生状态，生长迅速，S期即DNA合成期细胞数增多，易于出现DNA的损伤以及修复失败，使具有恶性潜能的细胞易于向恶性转化。

由胃黏膜肠化生和不典型增生发展到癌是一个多因素参与的过程，在癌变过程的每一阶段都存在着癌基因和抑癌基因的一系列变化，特别是肠型胃癌。本实验显示，p53，Bcl-2基因与肠型胃癌恶性变关系密切，在肠型胃癌发生发展过程中，p53，Bcl-2蛋白表达可能起重要作用，且增生活性逐渐升高。通过监测这些指标有助于早期诊断胃癌。

4 参考文献

- 1 Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2002;17:323-329
- 2 Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:111-115
- 3 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, P53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 4 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NFκB, p-53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-552 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
- 5 张学军, 郭礼和. 细胞凋亡失调与疾病关系的研究. 中华医学杂志 1998;78:565-566
- 6 Tu SP, Zhong J, Tan JH, Jiang XH, Qiao MM, Wu YX, Jiang SH. Induction of apoptosis by arsenic trioxide and hydroxy camptothecin in gastric cancer cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2000;6:532-539
- 7 Xu AG, Li SG, Liu JH, Shen JG, Jiang B, Gan AH. Correlation between apoptosis and proliferation in gastric pre-carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:185-186
- 8 Pan CJ, Zhong P, Huang XR, Liu KY, Wang SX. Study on the correlation between proliferation and apoptosis in atrophy and intestinal metaplasia of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:143-146
- 9 Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998;54:151-162
- 10 Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Caron de Fromental C, Gouyer V, Jacrot M, Brambilla C. Immunohistochemical study of P53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:199-210
- 11 Kikuyama S, Inada T, Shimizu K, Miyakita M, Ogata Y. P53, Bcl-2 and thymidine phosphorylase as predictive markers of chemotherapy in patients with advanced and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2149-2153
- 12 Meng FJ, Dai WS, Pan BR. P53 genes expression and its correlation with metastasis and prognosis in gastric carcinoma. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1996;4:677-678
- 13 Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of P53 protein expression for patients with gastric cancer-a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999;79:1255-1261
- 14 Zhang L, Fu HM, Jin SZ, Huang R, Zhou CG. Overexpression of P53 and relationship between extracellular matrix and differentiation, invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:992-996
- 15 Liu XP, Tsushima K, Tsushima M, Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Sasaki K. Expression of P53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma. *Pathol Int* 2001;51:440-444
- 16 Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN. Chronology of P53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1995;36:848-852
- 17 Wu MS, Shun CT, Sheu JC, Wang HP, Wang JT, Lee WJ, Chen CJ, Wang TH, Lin TL. Overexpression of mutant P53 and erbB-2 proteins and mutations of the p15 and p16 genes in human gastric carcinoma: with respect to histological subtypes and stages. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:305-310
- 18 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 19 Wang DX, Fang DC, Liu WW, Luo YH, Lu R. Study on the loss of heterozygosity at YNZ22 gene and p53 gene alteration in the gastric intestinal metaplasia. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2001;26:36-38
- 20 Chou HK, Chen SL, Hsu CT, Chao YC, Tsao YP. Bcl-2 accelerates retinoic acid-induced growth arrest and recovery in human gastric cancer cells. *Biochem J* 2000;348:473-479
- 21 戴洁, 于淑霞, 祁晓莉, 簿爱华, 许永利, 郭中英. Bcl-2, c-myc蛋白在胃癌前病变、胃癌中的表达. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):494-495
- 22 Walker C, Robertson L, Myskow M, Dixon G. Expression of the Bcl-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 1995;72:164-169
- 23 Wang YK, Ji XL, Ma NX. Expressions of P53, Bcl-2 and c-

- erbB-2 proteins in precarcinomatous gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:114-116
- 24 Inada T, Kikuyama S, Ichikawa A, Igarashi S, Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18:2003-2010
- 25 Muller W, Schneiders A, Hommel G, Gabbert HE. Prognostic value of Bcl-2 expression in gastric cancer. *Anticancer Res* 1998; 18:4699-4704
- 26 Gao HJ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Lv XZ, Zhao ZQ, Xiao SD. Expression and mutual relationship of tumor suppression gene and apoptosis regulating gene in gastric carcinoma and paracancerous tissues. *Zhonghua Xiaohua Zazhi* 2000;20:178-181
- 27 Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased proliferative activity caused by loss of p21(WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94: 2107-2112
- 28 Konno S, Takebayashi Y, Aiba M, Akiyama S, Ogawa K. Clinicopathological and prognostic significance of thymidine phosphorylase and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *Cancer Lett* 2001;166:103-111
- 29 Maeda K, Chung YS, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Yamada N, Kondo Y, Sowa M. Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis. *Cancer* 1994; 73:528-533
- 30 吴华星, 赵玉兰, 潘林娜, 武春龙, 冯占军. 内镜下胃癌活检标本PCNA的表达及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:92-93
- 31 Chiang CP, Lang MJ, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Hahn LJ, Kuo MY. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. *Oral Oncol* 2000;36:353-359

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 编委会组成

《World Journal of Gastroenterology, WJG》编辑委员会由来自 53 个国家的 179 位消化病学专家组成, 具有广泛的代表性, 特别是聘请了一批工作在临床和科研一线, 具有良好科学记录的中青年专家为评委. 分别来自以下国家: ALBANIA(1), ALGERIA(1), ARGENTINA(2), AUSTRIA(1), BELARUS(1), BELGIUM(1), BRAZIL(1), CANADA(1), CHINA(38), COSTA RICA(1), DENMARK(1), EGYPT(1), FINLAND(1), GERMANY(7), GREECE(1), HUNGARY(2), ICELAND(1), INDIA(2), IRAN(1), IRELAND(1), ISRAEL(1), ITALY(2), JAPAN(3), KENYA(1), LATVIA(1), LITHUANIA(1), MACEDONIA(1), MALAYSIA(2), MONACO(1), NEW ZEALAND(1), PHILIPPINES(1), POLAND(2), ROMANIA(1), RUSSIA(3), SINGAPORE(1), SLOVENIA(3), SOUTH AFRICA(1), SOUTH KOREA(2), SPAIN(1), SRI LANKA(1), SWEDEN(2), SWITZERLAND(2), THAILAND(1), THE NETHERLANDS(1), TURKEY(1), UNITED KINGDOM(7), UNITED STATES(55), YUGOSLAVIA(1).WJG 编委的任务是针对论文的科学性、创新性和先进性及可读性进行评价和修改, 并针对我国现阶段科学研究整体水平和科研人员英文报告撰写能力的实际情况对稿件提出具体的建设性意见; 对投送 WJG 稿件的题名、摘要、引言、材料和方法、结果和讨论等进行综合评价, 根据是否能较好地反映我国或国际消化病学临床和基础的先进水平决定所投论文是否被接受. 目前, 投送 WJG 稿件的质量差别较大, 有些论文的科学性、可读性方面的问题较多. 为此, WJG 制定了稿件评审要点, 对控制 WJG 的学术质量起到了核心作用.

肝癌患者树突状细胞融合肝癌细胞体外诱导特异性抗肝癌免疫

王亮, 殷晓煜, 吕明德, 李宝金, 黄洁夫

王亮, 殷晓煜, 吕明德, 李宝金, 黄洁夫, 中山大学附属第一医院肝胆外科 广东省广州市 510080
国家自然科学基金资助课题, No. 30100180
项目负责人: 殷晓煜, 510080, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院肝胆外科. yinxy@21cn.com
电话: 020-87765183 传真: 020-87765183
收稿日期: 2003-11-26 接受日期: 2003-12-16

Eliciting specific antitumor immunity against hepatocellular carcinoma *in vitro* by fusions of HCC patient-derived dendritic cells with HCC cells

Liang Wang, Xiao-Yu Yin, Ming-De Lu, Bao-Jin Li, Jie-Fu Huang

Liang Wang, Xiao-Yu Yin, Ming-De Lu, Bao-Jin Li, Jie-Fu Huang, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30100180

Correspondence to: Dr. Xiao-Yu Yin, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. yinxy@21cn.com

Received: 2003-11-26 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the ability of fusions of HCC patient-derived dendritic cells (DC) with HCC cells to induce autologous T lymphocytes to elicit specific immunity against HCC *in vitro*.

METHODS: Dendritic cells isolated from HCC patient peripheral blood were cultured and proliferated *in vitro* for one week by using recombinant human granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (rhGM-CSF) and interleukin-4 (rhIL-4). Expression of DC surface markers was assessed by flow cytometry. Fusions of DC with HepG2 cells (HepG2/DC) were achieved by polythylene glycol (PEG). The ability of HepG2/DC to stimulate proliferation and differentiation of autologous T lymphocytes was assessed by MTT method, and the specific killing efficacy of HepG2/DC-induced cytotoxic T lymphocytes (CTL) to HepG2 was evaluated.

RESULTS: Following one week culture, DC presented a high-level expression of CD1a, HLA-DR, CD54, CD80 and CD86. Fusions had remarkably greater ability to stimulate proliferation of autologous T lymphocytes in comparison with HepG2, HepG2+DC, DC and PBS, with an A value of 0.816 ± 0.019 vs 0.541 ± 0.020 , 0.632 ± 0.018 , 0.564 ± 0.018 , 0.345 ± 0.013 , respectively ($P < 0.05$). The HepG2/DC-activated CTLs showed a potent specific killing efficacy to HepG2.

CONCLUSION: Fusions of HCC patient-derived DC with HCC cells can effectively stimulate autologous T lymphocytes

to elicit specific antitumor immunity against HCC, and may represent as a promising approach of immunotherapy for HCC.

Wang L, Yin XY, Lu MD, Li BJ, Huang JF. Eliciting specific antitumor immunity against hepatocellular carcinoma *in vitro* by fusions of HCC patient-derived dendritic cells with HCC cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):774-777

摘要

目的: 探讨肝癌(HCC)患者树突状细胞(DC)融合 HCC 细胞体外诱导同源 T 淋巴细胞产生特异性抗 HCC 免疫的效能。

方法: 应用人重组粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和白介素-4(rhIL-4)对肝癌患者外周血单个核细胞进行体外诱导产生树突状细胞, 流式细胞仪检测 DC 表面标志物表达水平, 聚乙二醇融合 DC 与肝癌细胞 HepG2, MTT 法测定融合细胞(HepG2/DC)刺激同源 T 淋巴细胞增生、分化能力, 细胞毒性试验检测 HepG2/DC 诱导的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)对 HepG2 的特异性杀伤作用。

结果: 体外培养 1 wk 后的 DC 高度表达 CD1a, HLA-DR, CD54, CD80 和 CD86, 融合细胞 HepG2/DC 刺激同源 T 淋巴细胞增值能力显著高于 HepG2, HepG2+DC, DC 及 PBS, A 值分别为 0.816 ± 0.019 , 0.541 ± 0.020 , 0.632 ± 0.018 , 0.564 ± 0.018 , 0.345 ± 0.013 ($P < 0.05$), HepG2/DC 活化的 CTL 对 HepG2 具有明显的特异性杀伤作用。

结论: HCC 患者外周血 DC 融合 HCC 细胞可有效诱导同源 T 淋巴细胞产生特异性抗 HCC 免疫, 可望成为一条 HCC 免疫治疗的有效途径。

王亮, 殷晓煜, 吕明德, 李宝金, 黄洁夫. 肝癌患者树突状细胞融合肝癌细胞体外诱导特异性抗肝癌免疫. 世界华人消化杂志 2004;12(4):774-777

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/774.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)是人体内专职的抗原呈递细胞, 他能有效活化同源 T 淋巴细胞产生抗原特异性免疫应答^[1-2], 利用 DC 呈递肿瘤抗原进而诱导特异性抗肿瘤免疫是当今肿瘤免疫治疗领域的一个研究热点^[3-10], 其关键之处是如何使 DC 能有效呈递肿瘤抗原。DC 与肿

瘤细胞融合是最近发展起来的新技术^[11-12], 他能确保DC在获得肿瘤细胞全部基因的基础上表达并呈递多种肿瘤抗原. 我们通过体外实验探讨DC融合肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞诱导同源T淋巴细胞产生特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)及其对HCC细胞的杀伤效能.

1 材料和方法

1.1 材料 2.5 g/L 胰蛋白酶液+0.2 g/L EDTA, RPMI1640培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; 20 mmol/L HEPES 为 Sigma 公司产品; 2 mmol/L 谷氨酰胺购自 Gibco 公司; 500 mL/L 聚乙二醇购自 Sigma 公司; 淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂; 四甲基偶氮唑盐(MTT)为上海生工公司产品, 用 0.02 mol/L PBS 液配制 5 g/L 储存液; 重组人粒细胞 / 巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF), 重组人白介素 -4(rhIL-4)及重组人白介素 -2(rhIL-2)购自 Sigma 公司; 鼠抗人 CD1a-FITC(异硫氰酸荧光素), HLA-DR-FITC, CD14-PE(藻红朊荧光素), CD54-PE, CD80-PE 和 CD86-FITC 为 Pharmingen 及 Caltag公司产品; 细胞毒性分析试剂盒(Cyto Tox 96®Non-Radative Cytotoxicity Assay Kit)为 Promega 公司产品; HepG2 人肝癌细胞株, BEL-7402 人肝癌细胞株和 SMM-1990 人胰腺癌细胞株均由中山大学动物实验中心提供; 流式细胞仪为美国 Beckman-Coulter 产品.

1.2 方法 取 4 例 HCC 患者外周血肝素抗凝, 以淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 无钙镁 Hanks 液(pH7.2)洗涤 3 遍, 将细胞密度调节为 10⁹/L 后加入 6 孔板培养 2 h, 吸去悬浮细胞(淋巴细胞)另作培养, 留下贴壁细胞并加入含 GM-CSF(100 µg/L)、IL-4 (20 µg/L)、100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 在 37 °C、50 mL/L CO₂ 孵箱中培养, 2-3 d 半量更换培养液, 培养 7 d. 将收集的淋巴细胞用含人 IL-2 (20 KU/L) 的 RPMI1640 培养液培养, 备用. 采用流式细胞仪检测 DC 表面 CD1a, HLA-DR, CD14, CD54, CD80 和 CD86 的表达. 肝癌细胞株 HepG2 经 Co⁶⁰ 照射(30Gy)后, 将 DC 与 HepG2 按 3 : 1 的比例加入含 500 mL/L 聚乙二醇的 RPMI1640, 混合培养 5 min, 用 RPMI1640 缓慢稀释、洗涤, 以含 rhGM-CSF(50 µg/L) 的 RPMI1640 培养液培养融合细胞(HepG2/DC) 2 d, 待用. 淋巴细胞增生试验设 5 组: A 组: HepG2/DC 与同源 T 淋巴细胞培养(1 : 5); B 组: HepG2 与同源 T 淋巴细胞培养; C 组: HepG2+DC 与同源 T 淋巴细胞培养; D 组: DC 与同源 T 淋巴细胞培养; E 组: PBS 与同源 T 淋巴细胞培养. 各组置于 96 孔板混合培养 48 h 后, 加入 MTT(5 g/L)10 µL 继续培养 8 h, 离心培养板(2 000 r/min, 10 min), 弃上清, 加 DMSO 100 µL/孔, 轻轻震荡, 待结晶完全溶解后再放置 10 min, 于 570 nm 测定 A 值. 每组设 3 个复孔, 取均值. 将融合细胞和淋巴细胞按 1 : 10 比例混合, 以含人 IL-2 (20 KU/L) 的

RPMI1640 培养液培养 1 wk, 收集淋巴细胞作为 CTL. 采用乳酸脱氢酶释放法测定细胞毒性, 96 孔培养板每孔加入 0.05 mL(细胞密度 2×10⁵/mL)HepG2、BEL-7402 和 SMM-1990 肿瘤细胞, 按效应细胞与靶细胞 10 : 1, 20 : 1, 40 : 1 的比例加入 CTL(体积为 0.05 mL), 每种条件设 3 个复孔, 并分别设立效应细胞和肿瘤细胞对照, 置于 37 °C, 50 mL/L CO₂ 孵育 6 h, 然后收集上清 0.05 mL, 加入底物 0.05 mL, 室温避光作用 30 min, 加入 0.05 mL 终止液, 用酶标仪于 490 nm 处测定 A 值. 细胞毒性(%) = (效应细胞和靶细胞组 A - 效应细胞对照组 A - 自发释放组 A)/(最大释放组 A - 自发释放组 A)×100%.

统计学处理 结果以 mean±SD 表示, 采用 SPSS 10.0 作统计分析, 采用 t 检验.

2 结果

2.1 树突状细胞的获取及鉴定 HCC 患者 PBMC 中的贴壁细胞培养 2 d 后, 可见均匀散布的细胞聚体形成并有少量悬浮细胞, 悬浮细胞体积仍较小; 继续培养 3-4 d, 悬浮细胞明显增多并聚集成大小不一的细胞团; 至 6-7 d, 细胞分散悬浮, 体积变大, 毛刺多而密, 呈现典型的成熟 DC 形态. 流式细胞仪检测结果显示, 73.7% 以上的细胞表达 DC 标志分子 CD1a, 而单核细胞标志分子 CD14 小于 8.4%, 表明经 rhGM-CSF 与 rhIL-4 细胞因子诱导后大部分单核细胞转变成 DC. 此外, DC 尚高水平表达 HLA-DR(86.5%), CD54(94.9%), CD80(83.1%) 和 CD86 (75.3%) 多种共刺激因子.

2.2 淋巴细胞增生试验 各组混合淋巴细胞培养结果可见融合细胞(HepG2/DC, A: 0.816±0.019*)刺激同源淋巴细胞增生能力显著高于其他各组(HepG2, A: 0.541±0.020; HepG2+DC, A: 0.632±0.018; DC, A: 0.564±0.018; PBS, A: 0.345±0.013; *P <0.05).

2.3 CTL 特异性杀伤效能 在各种不同的效靶细胞比例条件下, HepG2/DC 诱导的 CTL 对 HepG2、BEL-7402 和 SMM-1990 的杀伤效能可见, 其对 HepG2 的杀伤率显著高于 BEL-7402 和 SMM-1990, 并随效靶细胞比例增高而升高, 以 40 : 1 时杀伤效能为最佳(图 1).

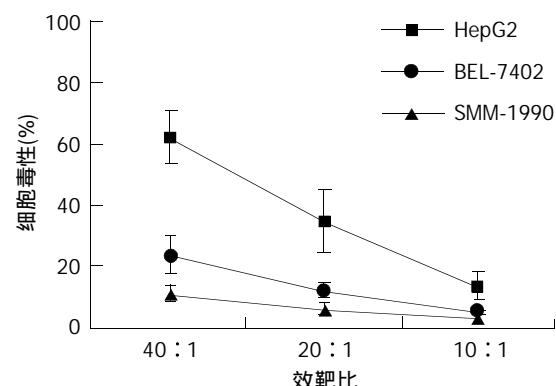


图 1 CTL 对不同靶细胞的细胞毒性.

3 讨论

DC 是人体内最重要的专职抗原呈递细胞，成熟的 DC 细胞表面表达有丰富的 MHC-I, II 类分子及 CD54, CD80, CD86 等多种共刺激分子，能直接活化原始 CD4⁺ 及 CD8⁺T 淋巴细胞，产生抗原特异性免疫应答反应^[1]。近年来，随着应用 GM-CSF 和 IL-4 体外成功培养、扩增 DC 技术的出现，有关 DC 在诱导抗肿瘤免疫方面的作用受到了人们的极大关注。已有研究^[6-8, 13-17]表明，应用 DC 呈递肿瘤抗原可以成功诱导特异性抗黑色素瘤、甲状腺旁腺癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤及白血病等免疫应答。利用 DC 诱导特异性抗肿瘤免疫的关键之处是要确保 DC 能有效呈递肿瘤抗原。

目前通常采用以下 3 种途径使 DC 负载并呈递肿瘤抗原：(1)与肿瘤肽裂解产物混合培养^[18]。该方法虽然简便，但由于肿瘤抗原需经 DC 吞噬、加工才得以呈递，而 DC 一旦成熟即丧失吞噬功能，故难以保证 DC 能有效地呈递肿瘤抗原；此外，经此途径获取的肿瘤抗原属于外源性的，DC 呈递时主要活化 CD4⁺T 淋巴细胞而非诱导 CTL 的生成，而后者才是抗肿瘤的主导力量^[1]。(2)与肿瘤提取的 mRNA 混合培养^[17]。由于体外 mRNA 极不稳定，在提取及被 DC 吞噬过程中容易遭受破坏，不能确保在 DC 内能有效合成肿瘤抗原。(3)直接转染编码特异性肿瘤抗原的基因^[19]。该方法仅适用于已有确定特异性抗原的肿瘤，且这种针对单一抗原的免疫应答不利于杀灭所有的肿瘤细胞，因为肿瘤细胞可通过下调该基因的表达而发生“免疫逃逸”。上述三种途径使 DC 负载肿瘤抗原的效力往往较差，尤其是对象 HCC 这样免疫原性较弱且缺乏确定特异性抗原的肿瘤，这可能是至今为止极少见有应用上述三种途径诱导特异性抗 HCC 免疫研究报道的原因。

最近，Gong et al^[20-21]采用细胞融合技术将人 DC 与人卵巢癌、乳腺癌肿瘤细胞融合，融合的 DC 能有效地诱导同源 T 淋巴细胞产生特异性抗肿瘤 CTL。该方法的优点是融合的 DC 含有肿瘤细胞的全部 DNA/RNA，从而能确保 DC 有效地呈递各种已知及未知的肿瘤抗原，由此可激发针对多种肿瘤抗原的特异性细胞免疫应答，有利于杀灭更多的肿瘤细胞；此外，经此途径获得的肿瘤抗原为内源性抗原，DC 呈递时主要诱导 CD8⁺T 淋巴细胞产生 CTL 免疫应答^[1]。该方法为以 DC 为基础的肿瘤免疫治疗提供了一条新途径。已有结果显示^[22-23]，将正常的鼠源 DC 与鼠肝癌细胞融合可以成功诱导同源鼠 T 淋巴细胞产生特异性抗肝癌免疫。HCC 患者外周血中 DC 低表达共刺激分子，存在一定的功能缺陷^[24]。有关此类 DC 诱导同源 T 淋巴细胞产生特异性抗 HCC 免疫的效能目前尚不清楚。我们发现，HCC 患者外周血 DC 经 rhGM-CSF, rhIL-4 体外共培养 1 wk 后不仅在形态学上趋于成熟，而且流式细胞仪检测结果表明 DC 表达高水平的 HLA-DR, CD54, CD80, CD86 各种共刺激分子，提示采用 rhGM-CSF, rhIL-4 体外培养可以

改善 HCC 患者外周血 DC 的功能状态。淋巴细胞混合培养试验证明了 HepG2/DC 融合细胞能有效刺激同源 T 淋巴细胞增生，显著高于单纯 DC 和 / 或 HepG2 的刺激效能。体外杀伤试验显示经 HepG2/DC 诱导产生的 CTL 对 HepG2 具有显著的特异性杀伤作用，杀伤能力随效靶细胞比增高而增强。HCC 是我国常见的肿瘤之一^[25-27]，恶性程度高，疗效差^[28-33]，我们的结果表明，HCC 患者外周血来源的 DC 与肝癌细胞融合可以有效诱导特异性抗 HCC 免疫应答，从而为 HCC 的免疫治疗提供了一条新的可供选择途径。

4 参考文献

- van den Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, Andringa G, Berzofsky JA. Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J Immunol* 2003;171:5842-5852
- Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, Kast WM, Offringa R, Melief CJ. Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol* 1998;160:4449-4456
- Stift A, Friedl J, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Schueler G, Zontsch T, Benkoe T, Radelbauer K, Brostjan C, Jakesz R, Gnant M. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:135-142
- Grunebach F, Muller MR, Nencioni A, Brossart P. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther* 2003;10:367-374
- Hiramoto JS, Tsung K, Bedolli M, Norton JA, Hirose R. Antitumor immunity induced by dendritic cell-based vaccination is dependent on interferon-gamma and interleukin-12. *J Surg Res* 2004;116:64-69
- Gatza E, Okada CY. Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells are more effective than TCR Id protein vaccines for active immunotherapy of T cell lymphoma. *J Immunol* 2002;169:5227-5235
- Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- 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
- 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 谭晓华, 朴英杰. 树突状细胞诱导的抗肿瘤免疫诱导移植瘤细胞凋亡并抑制其增生. 世界华人消化杂志 2000;8:56-58
- 李明松, 袁爱力, 张万岱, 刘思德, 吕爱民, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. 世界华人消化杂志 1999;7:161-163
- Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Li Y, Chen L, Takeuchi H, Qu H, Rowse GJ, Gendler SJ, Kufe D. Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6279-6283
- Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997;3:558-561
- Bedrosian I, Mick R, Xu S, Nisenbaum H, Faries M, Zhang P, Cohen PA, Koski G, Czerniecki BJ. Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2003;21:3826-3835
- Schott M, Feldkamp J, Schattenberg D, Seissler J, Scherbaum WA. Dendritic cell immuno-therapy in disseminated parathyroid carcinoma. *Lancet* 1999;353:1188-1189

- 15 Sievers E, Albers P, Schmidt-Wolf IG, Marten A. Telomerase pulsed dendritic cells for immunotherapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;171:114-119
- 16 Tourkova IL, Yamabe K, Chatta G, Shurin GV, Shurin MR. NK cells mediate Flt3 ligand-induced protection of dendritic cell precursors *in vivo* from the inhibition by prostate carcinoma in the murine bone marrow metastasis model. *J Immunother* 2003;26:468-472
- 17 Takahashi M, Narita M, Ayres F, Satoh N, Abe T, Yanao T, Furukawa T, Toba K, Hirohashi T, Aizawa Y. Cytoplasmic expression of EGFP in dendritic cells transfected with *in vitro* transcribed mRNA or cellular total RNA extracted from EGFP expressing leukemia cells. *Med Oncol* 2003;20:335-348
- 18 Livingstone AM, Kuhn M. Peptide-pulsed splenic dendritic cells prime long-lasting CD8(+) T cell memory in the absence of cross-priming by host APC. *Eur J Immunol* 2002;32:281-290
- 19 Broder H, Anderson A, Kremen TJ, Odesa SK, Liau LM. MART-1 adenovirus-transduced dendritic cell immunization in a murine model of metastatic central nervous system tumor. *J Neurooncol* 2003;64:21-30
- 20 Gong J, Avigan D, Chen D, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, Kufe D. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2715-2718
- 21 Gong J, Nikrui N, Chen D, Koido S, Wu Z, Tanaka Y, Cannistra S, Avigan D, Kufe D. Fusion of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce anti-tumor immunity. *J Immunol* 2000;165:1705-1711
- 22 Zhang J, Zhang JK, Zhuo SH, Chen HB. Effect of a cancer vaccine prepared by fusions of hepatocarcinoma cells with dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:690-694
- 23 Homma S, Toda G, Gong J, Kufe D, Ohno T. Preventive anti-tumor activity against hepatocellular carcinoma (HCC) induced by immunization with fusions of dendritic cells and HCC cells in mice. *J Gastroenterol* 2001;36:764-771
- 24 Ninomiya T, Akbar SM, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999;31:323-331
- 25 Cai RL, Meng W, Lu HY, Lin WY, Jiang F, Shen FM. Segregation analysis of hepatocellular carcinoma in a moderately high-incidence area of East China. *World J Gastroenterol* 2003;9:2428-2432
- 26 Qin LX, Tang ZY. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: diagnosis, treatment and prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:385-391
- 27 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma—cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 28 Xu KC, Niu LZ, He WB, Guo ZQ, Hu YZ, Zuo JS. Percutaneous cryoablation in combination with ethanol injection for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2686-2689
- 29 Yin ZY, Wang XM, Yu RX, Zhang BM, Yu KK, Li N, Li JS. Total vascular exclusion technique for resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2194-2197
- 30 Ikai I, Itai Y, Okita K, Omata M, Kojiro M, Kobayashi K, Nakanuma Y, Futagawa S, Makuchi M, Yamaoka Y. Report of the 15th follow-up survey of primary liver cancer. *Hepatol Res* 2004;28:21-29
- 31 Jiang HC, Liu LX, Piao DX, Xu J, Zheng M, Zhu AL, Qi SY, Zhang WH, Wu LF. Clinical short-term results of radiofrequency ablation in liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:624-630
- 32 Lin SM, Lin CJ, Hsu CW, Tai DI, Sheen IS, Lin DY, Liaw YF. Prospective randomized controlled study of interferon-alpha in preventing hepatocellular carcinoma recurrence after medical ablation therapy for primary tumors. *Cancer* 2004;100:376-382
- 33 Chen MS, Li JQ, Zhang YQ, Lu LX, Zhang WZ, Yuan YF, Guo YP, Lin XJ, Li GH. High-dose iodized oil transcatheter arterial chemoembolization for patients with large hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:74-78

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和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; 研究方法和技术有无创新性、系统性或特色。改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当。(5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足。临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果。(6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论。(7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况。(8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

KAI1基因对MHCC97-H细胞裸鼠成瘤及转移的影响

彭志红, 杨建民, 唐波, 司遂海, 房殿春, 罗元辉

彭志红, 杨建民, 司遂海, 房殿春, 罗元辉, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038
唐波, 中国人民解放军第三军医大学西南医院普外科 重庆市 400038
彭志红, 女, 1975-08-11 生, 四川郫县人, 汉族, 1999 年中国医科大学学士, 2001 年第三军医大学消化病学硕士生。
国家自然科学基金资助项目, No. 30070348
项目负责人: 杨建民, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心。 jianminyang@hotmail.com
电话: 023-68754678
收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-01-08

Effects of metastasis-suppressor gene KAI1 on tumorigenicity and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells with high metastatic potential in nude mice

Zhi-Hong Peng, Jian-Min Yang, Bo Tang, Sui-Hai Si, Dian-Chun Fang, Yuan-Hui Luo

Zhi-Hong Peng, Jian-Min Yang, Sui-Hai Si, Dian-Chun Fang, Yuan-Hui Luo, Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Bo Tang, Department of General Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30070348

Correspondence to: Jian-Min Yang, Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. jianminyang@hotmail.com

Received: 2003-12-29 Accepted: 2004-01-08

Abstract

AIM: To explore the effects of metastasis-suppressor gene KAI1 on tumorigenicity and metastasis of hepatocellular carcinoma cells MHCC97-H with high metastatic potential in nude mice.

METHODS: The MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells with high metastatic potential transfected with sense or antisense KAI1 expression plasmid in our previous experiments were inoculated subcutaneously into nude mice. The growth of subcutaneous tumor was observed, then the subcutaneous tumor tissues were harvested and implanted orthotopically into nude mice liver. The tumor metastasis in lung was carefully examined under microscope. MHCC97-H and the cells transfected with vector pCI-neo, but without KAI1 gene were used as control.

RESULTS: The different cells inoculated subcutaneously all had tumorigenicity. There were no significant differences in the speed of tumor growth among different groups, but the antisense group showed stronger invasion ability than others. The spontaneous metastasis to lung occurred in latency period of six weeks via orthotopic implantation of tumor tissue. Immunostaining showed strongly positive for

AFP in lung metastatic lesions, which indicated those were lung metastatic lesions from hepatocellular carcinoma. The number of lung metastatic lesions increased dramatically in antisense group ($P = 0.00158$), decreased significantly in sense group ($P = 0.00465$) and no significant difference in vector pCI-neo group ($P = 0.15166$), as compared with their paternal MHCC97-H group.

CONCLUSION: The metastasis-suppressor gene KAI1 has no significant effects on tumorigenicity and growth of MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells, but enhanced KAI1 expression can decrease the invasion ability and inhibit the metastasis, which offers an important clue to investigate the anti-metastasis treatment for hepatocellular carcinoma.

Peng ZH, Yang JM, Tang B, Si SH, Fang DC, Luo YH. Effects of metastasis-suppressor gene KAI1 on tumorigenicity and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells with high metastatic potential in nude mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):778-781

摘要

目的: 研究肿瘤转移抑制基因KAI1对MHCC97-H细胞裸鼠成瘤及转移的影响。

方法: 将已转染KAI1正、反义核苷酸的高转移潜能肝癌细胞MHCC97-H接种裸鼠皮下, 观察皮下肿瘤生长情况, 再将皮下肿瘤组织进行裸鼠原位肝接种, 观察接种后肿瘤肺转移情况。其中, 转染空载体及未转染的MHCC97-H亲本细胞作为实验对照组。

结果: 正义组、反义组、空载体组及亲本细胞组裸鼠皮下均成瘤, 肿瘤出现的时间、肿瘤块生长的速度无明显差异, 生长方式上反义组表现出明显的侵袭性。原位肝接种6 wk后裸鼠肺部均出现癌巢, AFP染色可见癌巢中肿瘤细胞质有黄色颗粒沉着, 证实为肝癌转移至肺形成的转移灶。与MHCC97-H亲本细胞组比较, 反义组转移灶数目明显增加($P = 0.00158$), 正义组转移灶数目明显减少($P = 0.00465$), 差异均有显著性, 而载体组转移灶数目无明显变化($P = 0.15166$)。

结论: 肿瘤转移抑制基因KAI1对MHCC97-H细胞裸鼠成瘤性及肿瘤生长无明显影响, 但上调KAI1蛋白的表达水平能在一定程度上降低肿瘤的侵袭性、抑制转移的发生。这为肝癌的抗转移治疗研究提供了重要线索。

彭志红, 杨建民, 唐波, 司遂海, 房殿春, 罗元辉. KAI1 基因对 MHCC97-H 细胞裸鼠成瘤及转移的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(4):778 - 781
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/778.asp>

0 引言

原发性肝癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一^[1-9]。肝癌发病隐匿, 发展迅速^[10-12], 大多数患者在确诊时已有转移^[13-16], 不宜或无法切除^[17-19], 死亡率位列我国恶性肿瘤病死率的第二位^[20], 而术后大部分患者死于复发。转移和复发是影响肝癌预后的主要因素。因此, 阐明肝癌转移、复发的发生机制, 寻求有效的抗转移治疗措施, 对改善肝癌患者预后有重要意义。KAI1 基因是在前列腺癌细胞中发现的一种肿瘤转移抑制基因, 属跨膜 4 超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)成员。已有研究表明其在多种恶性肿瘤如卵巢癌^[21]、宫颈癌^[22]、子宫内膜癌^[23]等中表达减少, 但对肝癌的影响国内外研究较少, 而且多均从组织病理学角度进行, 在裸鼠体内进行实验, 模拟肝癌体内发生、发展、转移的研究未见报道。我们即从该角度入手, 建立裸鼠肝癌成瘤及转移模型, 探讨 KAI1 基因对肝癌侵袭、转移的影响, 为肝癌的抗转移治疗提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料 MHCC97-H 肝癌细胞系为上海复旦大学医学院附属中山医院肝癌研究所建立的高转移潜能细胞, 属贴壁生长型^[24]。我们前已利用亚克隆技术构建了人类 KAI1 全长正、反义结构基因哺乳动物真核表达质粒, 通过 DOTAP 脂质体介导的转染系统分别将其转入该肝癌细胞中, 并进行了基因整合和表达的鉴定, 说明基因转染成功, 可获得预期 KAI1 蛋白表达^[25]。转染有 KAI1 正义基因的肝癌细胞重新命名为 MHCC97-H-S, 转染 KAI1 反义基因的肝癌细胞命名为 MHCC97-H-AS, 转染有 pCI-neo 空载体的肝癌细胞命名为 MHCC97-H-pCI。细胞培养条件为: 高糖 DMEM(Hyclone 公司)加 100 mL/L 优等胎牛血清(Hyclone 公司)和两种抗生素(青霉素 100 mg/L, 链霉素 100 mg/L), 37 °C、50 mL/L CO₂、饱和湿度培养。实验用 BALB/c 裸鼠购自华中科技大学同济医学院动物学部(生产合格证号: 医动字第 19-52 号)。共 80 只, 先后分为两批, 每批 40 只, 均为♂, 4-6 周龄, 质量 17-20 g。每批随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为正义组、反义组、MHCC97-H 亲本细胞组、空载体组。饲养在重庆医科大学动物中心, 恒温(25-27 °C)、恒湿(45-50%)、新鲜空气高度除尘除菌、无特殊病原体(SPF)环境下饲养。动物置于有机玻璃饲养盒内, 安放于层流式超净架内, 每只饲养盒内饲养 5 只动物, 灭菌处理的水和饲料供动物自由摄入。实验过程为无菌操作。

1.2 方法 将处于对数生长期癌细胞培养液丢弃, 用无菌中性 PBS 洗涤细胞 1 次, 胰酶消化, 从培养瓶洗脱下, 吹打成单细胞悬液。离心后重悬, 密度约为 $5 \times 10^{10}/L$, 在 1 h 内将 0.2 mL 单细胞悬液接种于裸鼠右侧背部皮下。接种后密切观察接种部位肿瘤的生长情况。在皮下肿瘤长至直径 1 cm 左右时用脱颈法处死裸鼠, 取肿瘤组织, 仔细去除表面的纤维包膜、血管, 用 PBS 缓冲液漂

洗后放入盛 DMEM 培养液的培养皿中, 切成约 1 mm³ 小块瘤组织待用。每组处死 1 只, 其余继续饲养观察。用 30 g/L 硫酸戊巴比妥钠腹腔注射法麻醉裸鼠, 剂量 40-50 mg/kg。动物取仰卧位, 皮肤用 5 g/L 碘伏消毒 2 次, 铺无菌孔巾。取左肋缘下切口, 长约 1-2 cm, 分层切开腹壁, 进入腹腔, 暴露肝脏左叶。轻轻将肝左叶拖出腹腔置于湿纱布上, 在其表面做 0.3 cm 斜切口, 压迫止血, 将瘤组织块植入肝内, 每组每只约 3 块瘤组织, 压迫切口, 待切口表面血凝将肝脏轻轻地送回腹腔, 6-0 的无损伤缝线逐层缝合腹膜、腹壁肌肉及皮肤, 无菌饲养(Cancer Res 1993;53:1204)。每周观察动物 1 次, 用精密卡尺测量肿瘤最大直径和垂直短径。参照文献(中华医学杂志 2000;80:831), 测量肿瘤长短径, 肿瘤体积为长径 × 短径² × 0.5, 绘制各组肿瘤生长的体积曲线。接种 8 wk 后处死裸鼠, 肿瘤组织行 HE 染色。原位肝接种肿瘤接种 6 wk 后处死裸鼠, 观察肝脏肿瘤组织侵犯周围脏器、组织情况, 测量肿瘤大小, 取肝脏肿瘤组织甲醛固定, 石蜡包埋, HE 染色。切除所有肺组织, 40 g/L 甲醛溶液固定, 石蜡包埋。双肺蜡块取 5 个冠状切面, 每个切面连续切 5 张, 每张厚 4-5 μm, 每个切面之间相距 0.8 mm(以最大冠状切面为中心), 切片做 HE 染色, 在镜下进行肺转移结节数(同一个结节出现于不同切面上按一个结节计), 比较各组肺转移结节数目的差异。取肺组织石蜡切片用 SP 法行 AFP 免疫组化染色, 对转移灶行定性观察。兔抗人 AFP 多克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒均为北京中山公司产品。具体步骤按照试剂盒说明进行。

统计学处理 所有实验数据均经 t 检验。

2 结果

2.1 皮下接种后肿瘤 裸鼠共 40 只, 在实验过程中无意外死亡, 均存活。在皮下注射肿瘤细胞悬液后各组均在 2 wk 左右出现肿瘤组织块, 随后肿瘤组织块增长迅速, 并逐渐可见肿瘤表面红色粗大的肿瘤血管。接种 8 wk 后处死裸鼠, 分离切除皮下肿瘤块, 并测量其大小。在分离过程中可见肿瘤组织呈鱼肉状, 质脆, 易出血, 中间可见坏死, 肿瘤与深部组织呈浸润性生长(表 1, 图 1)。

表 1 正、反义 KAI1 基因转染的肝癌细胞皮下和原位肝接种的侵犯部位

肿瘤 分组	皮下种植肿瘤(n = 10)		肝种植肿瘤(n = 10)		
	股骨	脊柱	腹膜	膈肌	肠系膜
反义组	4	5	6	4	2
正义组	0	1	1	0	0
97 组	2	3	3	2	1
载体组	3	2	4	1	1

2.2 原位肝接种后肿瘤 裸鼠共 40 只, 在实验过程中也

无意外死亡，均存活。接种6 wk后裸鼠衰竭，处死裸鼠，打开腹腔，可见肝脏部位白色肿瘤组织块，表面凹凸不平结节状，有丰富的肿瘤血管。肿瘤侵犯大部分肝脏，只存留少量肝组织，有的可见肿瘤组织与腹膜、腹壁、肠系膜等组织粘连，有一只可见膈肌上白色癌灶。分离肿瘤组织时见肿瘤组织呈鱼肉状，质脆，易出血，中间可见坏死。各组肿瘤组织侵犯周围脏器、组织(表1，图2)。巨检见双肺呈暗红色，未见明显转移结节。镜检见转移灶分布于周边肺，以间质内微转移瘤和血管内瘤栓为主，灶内癌细胞体积明显增大，核大浆少，多见病理性核分裂像。如上方法记数转移情况，可见反义组转移灶数目为 27.7 ± 3.8 个/只，正义组转移灶数目为 16.1 ± 2.2 个/只，载体组转移灶数目为 21.6 ± 3.6 个/只，MHCC97-H亲本细胞组为 19.3 ± 2.3 个/只。其中，与MHCC97-H亲本细胞组比较，反义组转移灶数目明显增加，正义组转移灶

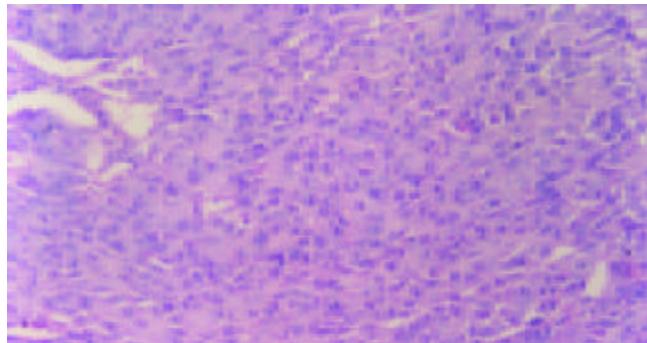


图2 肝肿瘤 HE $\times 200$.

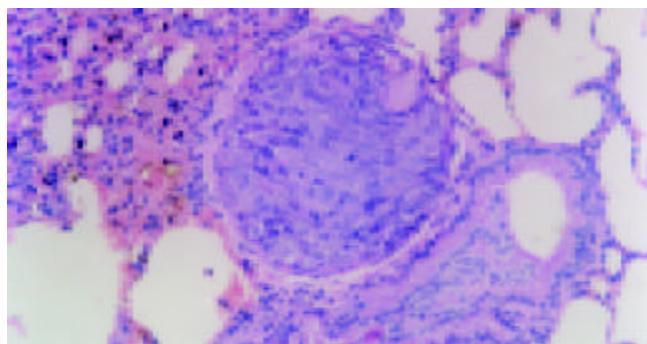


图4 肺血管内瘤栓 $\times 200$.

块确是肝癌转移至肺形成的转移灶。

3 讨论

肿瘤细胞的侵袭转移是一个复杂的生物学过程，涉及癌细胞从原发灶脱落，侵袭和穿透基底膜，降解细胞外基质，向远处转移等。因此，深入研究肝癌转移的发生机制，寻求有效的抗转移治疗措施，对改善肝癌患者预后具有重要意义。KAI1基因是前列腺癌的转移抑制基因。该基因定位于人类染色体11p11.2，全长约80 kb，包括8 kb的5'区域，10个外显子，9个内含子和8 kb的3'区，编码产物为含267个氨基酸的细胞膜糖蛋白，M_r29 610。其分子结构中含有4个跨膜功能区和一个大

数目明显减少，差异均有显著性($P < 0.01$)，而载体组转移灶数目无明显变化($P > 0.1$)。肺转移灶及肺血管瘤栓(图3，4)。肺转移灶的AFP表达部位主要在上述核大浆少，细胞聚集的细胞团块内，呈细胞质着色，可见癌巢中肿瘤细胞质有黄色颗粒沉着(图5)。证明这些细胞团

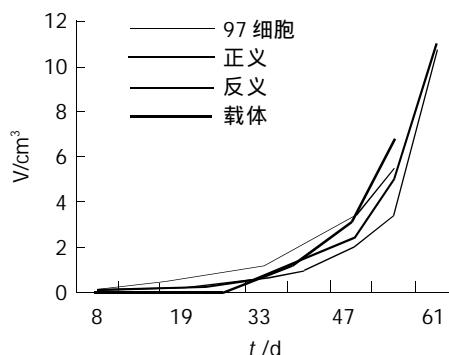


图1 皮下肿瘤生长曲线。

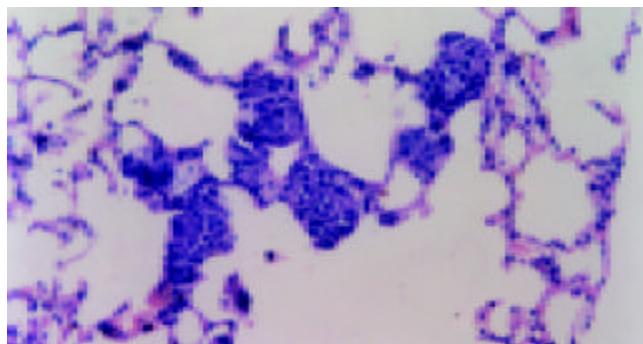


图3 肺转移瘤 HE $\times 200$.

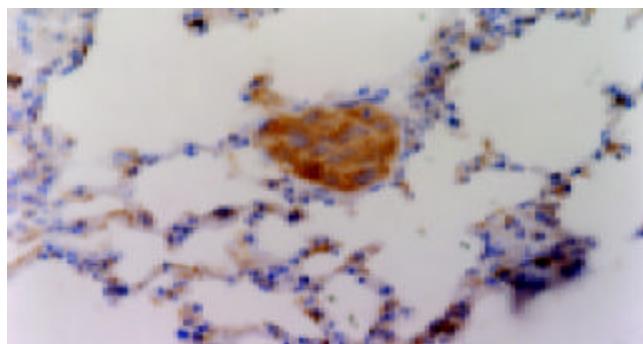


图5 肺转移瘤 AFP 染色 $\times 200$.

的胞外糖基化功能区，因而结构上属跨膜4超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)成员，其生物学功能至今仍有诸多不清楚的地方。他们在细胞膜上的定位和广泛的糖基化提示他们在细胞与细胞及细胞与胞外基质的相互作用中发挥功能，而这些作用在肿瘤的侵袭和转移中具有十分重要的意义。特别是这些分子的N糖基化与其抑制转移作用是一致的，因为N端连接寡聚糖的过程与转移表型有关。研究发现MRP1基因产物与细胞的穿透性和运动性有关，并可降低某些肿瘤细胞的转移潜能，而且在肿瘤细胞中MRP-1与KAI1变化具有一致性。另外大部分TM4SF成员同B细胞MHC II

类糖蛋白或 T 细胞的 CD4 和 CD8 分子介导细胞和周围环境的信号转导, 进而影响细胞的运动和分化。

本实验可看出, 从生长速度看, 皮下肿瘤和肝原位种植肿瘤各组基本一致, 说明 KAI1 基因对 MHCC97-H 肝癌细胞的生长无明显影响, 这与前期的体外实验结果是一致的, 即转染正、反义 KAI1 基因及空载体细胞与原细胞株比较, 绘制的生长曲线无差异, 也与 Takaoka et al 在结肠癌、Dong et al 在前列腺癌细胞中的研究结果一致。从生长方式看, 反义组明显呈浸润性, 皮下肿瘤表现为与深部组织融合生长, 有的甚至侵犯脊柱, 原位肝种植肿瘤表现为分别侵犯腹膜、皮下组织、肠系膜甚至膈肌(在膈肌上形成白色转移灶), 载体组、MHCC97-H 亲本细胞组则浸润性较差, 而正义组则几乎未见周围脏器、组织浸润, 说明 KAI1 基因影响肿瘤的侵袭性, 反义基因使 KAI1 基因的功能减弱, 在动物体内具体表现为反义组肿瘤组织侵袭性增强, 而正义基因则明显增强了其功能, 表现为肿瘤组织向周围组织的侵袭能力减弱, 这与我们以前体外 Boyden Chamber 侵袭实验的结果一致。从 KAI1 基因对肺转移的影响看, 反义组转移灶数目为 27.7 ± 3.8 个/只, 正义组转移灶数目为 16.1 ± 2.2 个/只, 载体组转移灶数目为 21.6 ± 3.6 个/只, MHCC97-H 亲本组为 19.3 ± 2.3 个/只。与 MHCC97-H 亲本细胞组比较, 反义组转移灶数目明显增加($P = 0.00158$), 正义组转移灶数目明显减少($P = 0.00465$), 差异均有显著性, 而载体组转移灶数目无明显变化($P = 0.15166$)。说明 KAI1 反义基因明显促进了肺转移的发生, 即 KAI1 基因失去了其肿瘤转移抑制作用而使转移更易发生, 而正义基因上调了 KAI1 蛋白的表达水平从而在一定程度上抑制了转移的发生。提示上调 KAI1 基因在肝癌细胞内的表达可能是抑制肝癌转移的一条有效途径, 这为肝细胞癌的抗转移治疗提供了实验基础。

肿瘤转移的发生过程极其复杂, 它涉及肿瘤细胞与细胞之间, 肿瘤细胞与细胞外基质之间以及细胞外基质与细胞外基质之间的相互作用。在今后的工作中, 为进一步研究 KAI1 影响转移的可能机制, 我们拟从细胞外基质成分入手, 探讨 KAI1 对细胞外基质各成分表达的影响。

4 参考文献

- 1 傅建民, 余小舫, 邵永孚. 端粒酶与原发性肝癌. 世界华人消化杂志 2000;8:461-463
- 2 瞿恒, 刘俊彬, 刘云梅, 张玲莉, 杜志平. HBsAg, HCV-Ag 和 AFP 在肝硬变和肝细胞癌组织中的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:524-527
- 3 Yang JM, Chen WS, Liu ZP, Luo YH, Liu WW. Effects of insulin-like growth factors-IR and -IIR antisense gene transfection on the biological behaviors of SMMC-7721 human hepatoma cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:296-301
- 4 邵晓冬, 吴开春, 郭晓钟, 徐建华, 郭长存, 孟繁平, 樊代明. KAI1 基因在肝硬化和肝细胞癌组织中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1238-1241
- 5 梁云, 陆斌, 崔贞福, 李晓冬, 郭亚军, 刘彦君. 肝细胞癌中 Fas/FasL 表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1364-1368
- 6 程虹, 刘彦仿, 张惠中, 沈万安, 张素珍. 分泌型抗肝癌单链双功能抗体融合 GFP 真核表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2001;9:640-644
- 7 Yin ZY, Wang XM, Yu RX, Zhang BM, Yu KK, Li N, Li JS. Total vascular exclusion technique for resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2194-2197
- 8 Bangoura G, Yang LY, Huang GW, Wang W. Expression of HIF-2alpha/EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:525-530
- 9 Hsieh CB, Chang HM, Chen TW, Chen CJ, Chan DC, Yu JC, Liu YC, Chang TM, Shen KL. Comparison of transcatheter arterial chemoembolization, laparoscopic radiofrequency ablation, and conservative treatment for decompensated cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:505-508
- 10 Wan YL, Zheng SS, Zhao ZC, Li MW, Jia CK, Zhang H. Expression of co-stimulator 4-1BB molecule in hepatocellular carcinoma and adjacent non-tumor liver tissue, and its possible role in tumor immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10:195-199
- 11 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
- 12 Shi YJ, Gong JP, Liu CA, Li XH, Mei Y, Mi C, Huo YY. Construction of a targeting adenoviral vector carrying AFP promoter for expressing EGFP gene in AFP-producing hepatocarcinoma cell. *World J Gastroenterol* 2004;10:186-189
- 13 Chen WX, Min PQ, Song B, Xiao BL, Liu Y, Ge YH. Single-level dynamic spiral CT of hepatocellular carcinoma: correlation between imaging features and density of tumor microvessels. *World J Gastroenterol* 2004;10:67-72
- 14 Sheen IS, Jeng KS, Shih SC, Wang PC, Chang WH, Wang HY, Shyung LR, Lin SC, Kao CR, Tsai YC, Wu TY. Does surgical resection of hepatocellular carcinoma accelerate cancer dissemination? *World J Gastroenterol* 2004;10:31-36
- 15 Xu KC, Niu LZ, He WB, Guo ZQ, Hu YZ, Zuo JS. Percutaneous cryoablation in combination with ethanol injection for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2686-2689
- 16 Lai YC, Shih CY, Jeng CM, Yang SS, Hu JT, Sung YC, Liu HT, Hou SM, Wu CH, Chen TK. Hepatic arterial infusion chemotherapy for hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2666-2670
- 17 Luo MY, Shan H, Jiang ZB, Li LF, Huang HQ. Study on hepatocellular carcinoma-associated hepatic arteriovenous shunt using multidetector CT. *World J Gastroenterol* 2003;9:2455-2459
- 18 Chen XP, He SQ, Wang HP, Zhao YZ, Zhang WG. Expression of TNF-related apoptosis-inducing Ligand receptors and antitumor tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing Ligand in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2433-2440
- 19 Cai RL, Meng W, Lu HY, Lin WY, Jiang F, Shen FM. Segregation analysis of hepatocellular carcinoma in a moderately high-incidence area of East China. *World J Gastroenterol* 2003;9:2428-2432
- 20 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 21 Houle CD, Ding XY, Foley JF, Afshari CA, Barrett JC, Davis BJ. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol* 2002;86:69-78
- 22 Liu FS, Chen JT, Dong JT, Hsieh YT, Lin AJ, Ho ES, Hung MJ, Lu CH. KAI1 metastasis suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma. *Am J Pathol* 2001;159:1629-1634
- 23 Liu FS, Dong JT, Chen JT, Hsieh YT, Ho ES, Hung MJ, Lu CH, Chiou LC. KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1393-1398
- 24 Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Chen J, Gao DM, Bao WH. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001;7:630-636
- 25 司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平. KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1341-1344

肝癌组织 HSP70 和 caspase 3 的表达意义

彭绍华, 邓 虹, 冯德云, 郑 晖

彭绍华, 邓虹, 湖南师范大学医学院病理学教研室 湖南省长沙市 410006
冯德云, 郑晖, 中南大学基础医学院病理学系 湖南省长沙市 410078
彭绍华, 男, 1963-10-14 生, 湖南省南县人, 汉族, 副教授, 医学硕士. 主要从事肿瘤病理的研究.
项目负责人: 彭绍华, 410006, 湖南省长沙市咸嘉湖, 湖南师范大学医学院
病理学教研室. pengshaohua2004@sina.com
电话: 0731-8630309
收稿日期: 2003-08-28 接受日期: 2004-02-01

Expression of HSP 70 and caspase 3 and their significance in hepatocellular carcinoma tissues

Shao-Hua Peng, Hong Deng, De-Yun Feng, Hui Zheng

Shao-Hua Peng, Hong Deng, Department of Pathology, Hunan Normal University Medical College, Changsha 410006, Hunan Province, China
De-Yun Feng, Hui Zheng, Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Correspondence to: Shao-Hua Peng, Department of Pathology, Hunan Normal University Medical College, Changsha 410006, Hunan Province, China. pengshaohua2004@sina.com

Received: 2003-08-28 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To investigate the expression of heat shock protein 70 (HSP70) and caspase 3 protein and their clinical significance in hepatocellular carcinomas and surrounding liver tissues.

METHODS: The expression of HSP70 and caspase 3 protein were detected by immunohistochemistry in hepatocellular carcinomas (HCC) and their surrounding liver tissues.

RESULTS: The positive rate and intensity of HSP70 in HCCs were significantly higher than those in pericarcinomatous liver tissues (68.6% vs 31.4%, $P < 0.01$), and those of caspase protein were significantly lower (17.1% vs 35.7%, $P < 0.01$). The expression level of HSP70 and caspase protein in HCCs was remarkably related to differentiation degree and tumor size of HCCs, and the poorer differentiation, the stronger the expression of HSP70 ($F = 5.219$ and 5.421 respectively, $P < 0.01$), the weaker the expression of caspase 3 protein ($F = 5.944$ and 4.571 respectively, $P < 0.01$). The correlation analysis indicated that there was a negative relationship between expression of HSP70 and caspase protein in HCC and their surrounding liver tissues ($r = -0.4126$ and -0.5237 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: The expression of HSP70 may make uncontrolled growth and unceasingly increased malignant degree of HCC by accelerating cell transformation and proliferation and inhibiting apoptosis. HSP70 may be an important marker for evaluation of prognosis in patients with HCC.

Peng SH, Deng H, Feng DY, Zheng H. Expression of HSP 70 and caspase 3 and their significance in hepatocellular carcinoma tissues. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):782-784

摘要

目的: 研究热休克蛋白70和caspase 3在肝细胞癌及癌旁肝组织中的表达及其临床意义.

方法: 利用免疫组织化学检测70例肝细胞癌及其癌旁肝组织中HSP70 和 caspase 3 蛋白的表达.

结果: HCC中HSP70的阳性率和阳性强度明显高于癌旁肝组织(68.6%vs 31.4%, $P < 0.01$), 而 caspase3 蛋白的阳性率和阳性强度明显低于癌旁肝组织(17.1%vs 35.7%, $P < 0.01$). 在HCC 中 HSP70 和 caspase3 蛋白的表达强度与HCC 的分化程度和肿瘤的大小明显相关, 分化愈差和肿瘤愈大 HSP70 表达愈强(分别为: $F = 5.219$ 和 5.421 , P 均 <0.01)而 caspase3 蛋白表达愈弱(分别为 $F = 5.944$ 和 4.571 , P 均 <0.01). 统计学分析显示在 HCC 及其癌旁肝组织中 HSP70 和 caspase 3蛋白的表达呈明显负相关(分别为: $r = -0.4126$ 和 -0.5237 , P 均 <0.01).

结论: 本文结果提示在HCC发生过程中HSP70的表达可能通过促进细胞的转化和增生及抑制细胞的凋亡,使HCC呈现无限制的生长及恶性程度不断增高; 检测HSP70有望能成为判断HCC预后的重要指标之一.

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(4):782-784

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/782.asp>

0 引言

在我国及日本肝细胞癌(HCC)是一种死亡率非常高的高度恶性肿瘤^[1-10], 其发生与肝炎病毒感染密切相关^[11-14], 并呈多步骤多阶段的特性^[15-16]. 尽管HCC的研究和治疗在近年取得了很大的进展^[17-26], 但其发生的分子机制及比较特异的诊断标记物和治疗靶分子均未得到明确的鉴定. 最近Chuma et al^[27]利用基因芯片技术研究发现热休克蛋白 70(HSP70)可能是一种鉴别早期 HCC 的有效分子标记物. HSP70是一组重要应激蛋白. 在肿瘤细胞中表达异常, 能与癌基因、抑癌基因产生结合, 并与肿瘤细胞的细胞周期调控、增生、凋亡、分化、多药耐药、肿瘤免疫以及肿瘤细胞的发生发展密切相关^[28], caspase 3 是凋亡信号转导通路中的重要执行分子, 其激活后导致细胞的不可逆性凋亡^[29]. 我们利用组织芯片技术和免疫组织化学方法检测 HSP70 和 caspase 3 在 HCC 及其癌旁肝组织中的表达, 并探讨二者的相关性及其临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 1996-01/2003-02 湘雅医院肝胆外科手术切除的 HCC 标本 70 例(均附癌旁肝组织)及胆囊炎患者切除的正常肝组织 10 例。所有标本经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片、病理学确诊。在 70 例 HCC 中男 53 例, 女 17 例, 平均年龄 53.4(27-68 岁); 肿瘤直径小于或等于 5 cm 者 25 例; 5.1-10 cm 者 29 例; 大于 10 cm 者 16 例。其中肝内有多个肿瘤结节者 19 例; 患者术前均未做过任何放疗和化疗。HCC 组织根据 Edmondson 标准分级, 其中 I 级 11 例, II 级 31 例, III 级 23 例, IV 级 5 例。所有癌旁肝组织均有不同程度的肝纤维化和肝硬化, 其中有非典型增生者 22 例。抗 HSP70、抗磷酸化 Caspase3 蛋白抗体及二步法 Elivision 试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司。

1.2 方法 利用自行设计制作的模具制备含 96 孔直径 2 mm 的蜡胚; 在显微镜下 HE 切片, 选取要检测的区域, 在石蜡包埋块上用孔径 1.8 mm 的骨髓穿刺针穿下对应区域的组织, 灌入制备好的蜡胚的小孔中, 并使各组织柱表面平整, 在切片机上切取 4 μm 的连续切片, 60 °C 烤片备用(制作组织芯片)。切片脱蜡至水; 30 mL/L H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 30 min; 高火档微波修抗原 5 min; 然后按免疫组织化学二步法操作。用 PBS 代替一抗作阴性对照。参照 Bresalier 半定量公式判断染色结果: 在每张切片中随机选取 10 个视野, 根据细胞染色强度分为 4 级, 并分别计分: 阴性, 细胞无着色(0); 弱阳性, 细胞着色为浅黄色(1); 中度阳性, 细胞着色为棕黄色(2); 强阳性, 细胞着色为棕褐色(3)。计数每一强度的视野数, 根据下列计算公式计算每张切片的平均染色强度: IS(intensity score)= $\sum \{(0 \times F_0)+(1 \times F_1)+(2 \times F_2)+(3 \times F_3)\}$, $F = \% \times 10$ 视野。

统计学处理 用 SPSS10.0 统计软件进行 χ^2 检验及相关性分析。

2 结果

2.1 HSP70 和 caspase3 蛋白的表达 HSP70 和 caspase3 蛋白的阳性信号主要位于细胞质, 少数细胞核阳性(图 1, 2), 在 HCC 及癌旁肝组织中 HSP70 蛋白的阳性率分别为 68.6% 和 31.4%, 正常肝组织 10 例中仅 2 例呈弱阳性, HCC 中的阳性表达率明显高于癌旁肝组织($P < 0.01$)。caspase3 蛋白在 HCC 和癌旁肝组织中的阳性率分别为 17.1% 和 35.7%, 正常肝组织的阳性率为 80%, HCC 中的阳性表达率明显低于癌旁肝组织和正常肝组织($P < 0.01$)。

2.2 HSP70 和 caspase3 表达与 HCC 在 HCC 中 HSP70 和 caspase3 蛋白的表达强度与 HCC 的分化程度明显相关, 分化愈差 HSP70 表达愈强, 而 caspase3 蛋白表达愈弱, 反之亦然($P < 0.01$, 表 1); HCC 肿块愈大 HSP70 蛋白表达强, 而 caspase3 蛋白表达愈弱, 反之亦然($P < 0.01$, 表 1)。在 HCC 和癌旁肝组织中 HSP70 和 caspase3 蛋白的表达强度呈明显负相关(分别为 $r = -0.4126$ 和 -0.5237 , $P < 0.01$, 表 1)。

表 1 HSP70 和 caspase3 表达与 HCC 病理关系

HCC	n	HSP70 蛋白表达(IS)	caspase3 蛋白表达(IS)
分级			
I	11	0.78 ± 0.43	1.49 ± 0.65
II	31	1.64 ± 1.05 ^a	1.52 ± 0.95 ^b
III	23	1.81 ± 1.10 ^a	0.80 ± 0.57 ^b
IV	5	2.01 ± 0.84 ^a	0.46 ± 0.24 ^b
肿块直径			
≤ 5 cm	25	1.11 ± 0.88	1.42 ± 0.87
5.1-10 cm	29	1.88 ± 1.07 ^c	1.01 ± 0.99 ^d
> 10 cm	16	2.02 ± 0.77 ^c	0.63 ± 0.44 ^d
总计	70	1.59 ± 1.21	1.07 ± 0.98
癌旁肝组织	70	1.07 ± 0.98	1.87 ± 1.10

^aP < 0.01, ^bP < 0.01 vs I 级, ^cP < 0.01, ^dP < 0.01 vs ≤ 5 cm.



图 1 HCC 胞质中 HSP70 阳性。SP×400。



图 2 HCC 胞质中 Caspase 阳性, 部分胞核阳性。SP×400。

3 讨论

既往报道在多种肿瘤和转化的培养细胞中 HSP70 呈过表达, 对维持肿瘤细胞的增生非常重要^[30-32]。本结果显示 HSP70 在 HCC 中的表达率和表达强度均显著高于癌旁肝组织, 并与 HCC 的分化程度和肿瘤的大小明显相关, 分化愈差表达愈强, 肿瘤愈大表达愈强, 与尹燕明 et al 的结果基本一致。Chuma et al^[27] 利用基因芯片技术研究热休克蛋白 70 在 HCC 中的表达, 并认为检测 HSP70 蛋白的表达可作为早期肝细胞癌的重要诊断指标。根据我们的资料 HSP70 有望能成为判断 HCC 预后的重要指标之一。

在HCC的发生中常存在细胞增生和细胞凋亡的失衡, caspase 3是细胞凋亡通路中重要的执行分子, 其以磷酸化方式激活后导致细胞发生不可逆性凋亡^[29, 33], 利用免疫组织化学检测磷酸化 caspase 3蛋白的表达, 能基本反映细胞凋亡的状况。本资料显示HCC中磷酸化 caspase3蛋白的表达率和表达强度均显著低于癌旁肝组织, 亦与 HCC 的分化程度和肿瘤大小明显相关, 分化愈差和瘤块愈大其表达愈弱。提示在HCC的发生发展过程中可能存在癌细胞的低凋亡。

HSP70是否具有直接调节细胞凋亡的作用, 目前尚无定论, 尹燕明 et al 研究结果显示 HCC 中 HSP70 的表达与细胞凋亡指数呈明显正相关; Chen et al 发现表达 HSP70 的 HepG2 细胞能显著抑制 UVC 诱导的凋亡; 赵霞 et al 利用反义寡核苷酸阻断 HSP70 的表达可诱导卵巢癌细胞的凋亡; 本文结果显示在 HCC 和癌旁肝组织中 HSP70 和 caspase3 蛋白的表达强度呈明显负相关。推测在 HCC 发生过程中 HSP70 的表达可能通过促进细胞的转化和增生及抑制细胞的凋亡, 使 HCC 呈现无限制的生长及恶性程度不断增高。

4 参考文献

- 1 Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Zile MH. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2001;7:542-546
- 2 Zhao WH, Ma ZM, Zhou XR, Feng YZ, Fang BS. Prediction of recurrence and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after resection by use of CLIP score. *World J Gastroenterol* 2002;8:237-242
- 3 Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Chen J, Gao DM, Bao WH. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001;7:630-636
- 4 Li G, Ma HH, Lau GK, Leung YK, Yao CL, Chong YT, Tang WH, Yao JL. Prevalence of hepatitis C virus infection and homology of different viral strains in Southern China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1081-1087
- 5 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 6 Tang YC, Li Y, Qian GX. Reduction of tumorigenicity of SMMC-7721 hepatoma cells by vascular endothelial growth factor antisense gene therapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:22-27
- 7 Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:685-689
- 8 Fan J, Wu ZQ, Tang ZY, Zhou J, Qiu SJ, Ma ZC, Zhou XD, Ye SL. Multimodality treatment in hepatocellular carcinoma patients with tumor thrombi in portal vein. *World J Gastroenterol* 2001;7:28-32
- 9 Tang ZY, Sun FX, Tian J, Ye SL, Liu YK, Liu KD, Xue Q, Chen J, Xia JL, Qin LX, Sun HC, Wang L, Zhou J, Li Y, Ma ZC, Zhou XD, Wu ZQ, Lin ZY, Yang BH. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with metastatic potential. *World J Gastroenterol* 2001;7:597-601
- 10 Meier V, Mihm S, Braun Wietzke P, Ramadorn G. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? *World J Gastroenterol* 2001;7:228-234
- 11 Huo TI, Wang XW, Forques M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- 12 Roussos A, Goritsas C, Pappas T, Spanaki M, Papadaki P, Ferti A. Prevalence of hepatitis B and C markers among refugees in Athens. *World J Gastroenterol* 2003;9:993-995
- 13 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 14 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
- 15 Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T, Yasui K, Kato J, Matsushima S, Komatsu T, Wakita T. Processing of hepatitis C virus core protein is regulated by its C-terminal sequence. *J Med Virol* 2003;69:357-366
- 16 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 17 Zhang J, Zhang JK, Zhuo SH, Chen HB. Effect of a cancer vaccine prepared by fusions of hepatocarcinoma cells with dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:690-694
- 18 Kalogeraki A, Garbagnati F, Santinami M, Zoras O. DNA fragmentation and cell proliferation correlated with tumor grade in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;96:301-305
- 19 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 20 Wei CY, Li T, Zhang CM, Yang NW, Tan YC. Treating primary liver cancer with S-TIL combining Chinese traditional medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:478
- 21 Rocken C, Carl-McGrath S. Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2001;19:269-278
- 22 Zheng N, Ye SL, Sun RX, Zhao Y, Tang ZY. Effects of cryopreservation and phenylacetate on biological characters of adherent LAK cells from patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:233-236
- 23 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
- 24 Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;95:1938-1945
- 25 Guan XJ, Guan XJ, Wu YZ, Jia ZC, Shi TD, Tang Y. Construction and characterization of an experimental ISCOMS-based hepatitis B polypeptide vaccine. *World J Gastroenterol* 2002;8:294-297
- 26 Du QY, Wang FS, Xu DP, Liu H, Lei ZY, Liu MX, Wang YD, Chen JM, Wu ZZ. Cytotoxic effects of CIK against hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:863-866
- 27 Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, Hirohashi S. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003;37:198-207
- 28 Schueller G, Paolini P, Friedl J, Stift A, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Jakesz R, Gnant M. Heat treatment of hepatocellular carcinoma cells: increased levels of heat shock proteins 70 and 90 correlate with cellular necrosis. *Anticancer Res* 2001; 21:295-300
- 29 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:356-360
- 30 Kawanishi K, Shinozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, Tsujinaka T, Shamma A, Monden M. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999;85:1649-1657
- 31 Maehara Y, Oki E, Abe T, Tokunaga E, Shibahara K, Kakeji Y, Sugimachi K. Overexpression of the heat shock protein HSP70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer. *Oncology* 2000;58:144-151
- 32 Vanaja DK, Grossmann ME, Celis E, Young CY. Tumor prevention and antitumor immunity with heat shock protein 70 induced by 15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin J2 in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate cells. *Cancer Res* 2000;60:4714-4718
- 33 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

乙型肝炎病毒基因组前 - 前 - S 基因区的分子流行病学研究

杨倩, 董菁, 成军

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

杨倩, 女, 1970-11-06, 广西桂平人, 汉族, 1999 年毕业于西安医科大学, 获硕士学位, 目前在西安交通大学第一医院攻读博士研究生, 主要从事传染病临床与基础研究工作。

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Molecular epidemiological features of pre-pre-S region in hepatitis B virus genome

Qian Yang, Jing Dong, Jun Cheng

Qian Yang, Jing Dong, Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

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

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

Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To try to identify pre-pre-S region in hepatitis B virus (HBV) genome and to study the relationship between the genotype and the existence of pre-pre-S region.

METHODS: Genomic DNA of HBV was extracted from the sera of patients with HBV infection. Multiple-primers polymerase chain reaction (PCR) method was used to identify the genotype of HBV strains. Then the pre-pre-S region was amplified by PCR method, and TA cloned into pGEM Teasy vector. After sequencing of the target region, vector 8.0 software was used to analyse the sequences.

RESULTS: Fifteen male patients were collected in this study. There were 1 genotype B, 5 genotype B and C mixture, and 9 genotype C. Amplified PCR products of the pre-pre-S region from these 15 samples were ligated into the pGEM Teasy vectors. After sequencing, 31 clones were found being encoding for pre-pre-S peptide.

CONCLUSION: Existence of coding gene of the pre-pre-S region is popular in B or C genotype of HBV.

Yang Q, Dong J, Cheng J. Molecular epidemiological features of pre-S region in hepatitis B virus genome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):785-789

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒(HBV)基因组是否存在前 - 前 - S 编码基因, 并探讨前 - 前 - S 基因与 HBV 基因型分布之间的关系。

方法: 自慢性乙型肝炎患者血清中提取病毒基因组 DNA, 首先应用多引物 - 多聚酶链反应(PCR)进行 HBV 基因型分型, 之后将前 - 前 - S 区扩增, TA 克隆到 pGEM Teasy 载体后进行单克隆测序, 利用 Vector 8.0 软件进行序列分析。

结果: 选择 15 例患者, 经过 HBV 基因型分型实验确定基因型为 B 型者 1 例, B/C 混合型者 5 例, C 型 9 例。自 15 例患者血清中提取的 HBV 基因组中扩增出前 - 前 - S 基因片段, TA 克隆后选择 31 个克隆进行测序, 测序结果证明这 31 个克隆均编码前 - 前 - S 基因。

结论: 前 - 前 - S 区编码在 B、C 基因型中均为普遍存在的现象。

杨倩, 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前 - 前 - S 基因区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):785-789

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/785.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组全长在 3 200 个核苷酸(nt)左右, 为部分双链 DNA 病毒。Gelibert et al^[1-2]于 1979 年发表了 HBV 基因组的第一个全长核苷酸序列, 我国学者^[3-4]于 1984 年报道了中国大陆 HBV 全序列。Gelibert et al 最初的研究将 HBV 基因组划分出 4 个开放读码框架 (ORF)^[1], 分别命名为 S、C、P、X 区, 4 个 ORF 中表达的氨基酸长度不同, 其生物学功能也不相同^[5], 其中全 S 区又因不同的起始密码子(ATG)而又人为的分为前 - S1、前 - S2 和 S 三个区, 前 - S1、前 - S2 和表面抗原主蛋白是按照同一开放读码顺序(in frame)进行翻译的。我们^[6-9]研究了乙型肝炎患者血清中存在的 HBV 病毒基因组, 寻找到新的 ORF 存在的证据^[7-9], 并初步重新确定了全 S 基因(前 - 前 - S、前 - S1、前 - S2 和主蛋白基因)和全 X(前 - X、X 基因)基因的启动子^[10-11]。本文以分子流行病学方法证实了前 - 前 - S 区的存在状态。

1 材料和方法

1.1 血清采集和 DNA 提取 血清来源: 15 例患者, 诊断为病毒性肝炎, 乙型, 慢性, 符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》(试行)^[12], 临床初步检测 HBV DNA 阳性。DNA 提取: 自静脉中采集 5 ml 全血, 分离血清, 200 μl

血清加入蛋白酶K及其缓冲液，65℃消化过夜，饱和酚：氯仿(1:1)抽提总DNA，无水乙醇沉淀，加入无DNA酶的RNA酶消化后，-20℃保存备用。

1.2 HBV基因型分析 参考Naito et al^[13]设立的6种主要基因型分型方法，建立HBV基因型的检测方法。简言之，应用巢式-多引物-多聚酶链反应，外引物：上游引物序列：5' - AGC ATG GGA GGT TGG TCT TC-3'，下游引物序列：5' - AAG GCA TCA AGG CAG GAT AGC-3'，目的片段长度约1429 bp，自前-S1区起始处至S区终止子下游226 bp。内引物：上游引物序列：5' - GGC TCA AGT TCC GGA ACA GT-3'，A基因型特异性下游引物：5' - CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3'，B基因型特异性下游引物：5' - CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3'，C基因型特异性下游引物：5' - GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'。外引物扩增PCR程序参数如下：94℃1 min预变性，94℃1 min 30 s变性，59℃1 min 30 s退火，72℃2 min钟延长，共30个循环，72℃延长10 min。内引物扩增PCR程序参数如下：94℃1 min预变性，94℃30 s变性，58℃30 s退火，72℃30 s延长，共35个循环。NT-PCR产物经过3%琼脂糖凝胶电泳后判断HBV基因型。

1.3 前-S区的克隆及序列分析 采用本研究组以往报告^[14-16]的PCR-TA克隆-测序方法。多聚酶链反应(PCR)扩增前-S区：前-S上游引物为P1：5' - CTA GAT TCT ATC CTA CCC ACA C'，P2：5' - TTG GGA ACA AAA GAT TCG TCC-3'，P1下游第70-72 nt处为前-S区起始密码子ATG，P2上游30-32 nt处为前-S1区起始密码子ATG。PCR参数如下：94℃1 min预变性，94℃60 s变性，60℃60 s退火，72℃60 s延长，共35个循环，72℃再延长10 min。

克隆目的片段：将PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳，切取目的片段，玻璃奶法回收PCR产物，与Promega公司所产的pGEM Teasy载体连接过夜。将连接好的重组质粒转入细菌JM109，氨苄青霉素(Amp)和X-gal蓝白斑法筛选阳性菌落，进一步提取质粒鉴定。DNA测序：选择经鉴定pGEM Teasy内插入约220 bp产物的菌落送检测序，由上海博亚公司完成。测序引物为pGEM Teasy载体自有的T7、SP6测序引物。

1.4 序列分析 应用DNASIS 2.5和Vector 8.0版软件对进行了测序分析的HBV前-S基因序列进行碱基序列和氨基酸序列一致性分析。该软件比较后提供两个数据：阳性率和一致率，阳性率是选定区域推定序列的核苷酸(氨基酸)序列数目与区域总长度之比，推定序列是软件自动比较所有序列，参考每个核苷酸(氨基酸)位点上每个克隆的编码方式，由大多数克隆(多于70%)编码的核苷酸(氨基酸)组成的一致性序列，阳性率用于展示区域内部的插入突变或/和缺失突变，以及较少见的单一位点多种核苷酸(氨基酸)编码方式；一致率是选定

区域全部克隆均为一致的核苷酸(氨基酸)数目与最长的单一克隆核苷酸(氨基酸)序列数目之比，表示该段区域核苷酸(氨基酸)序列一致性，用于展示区域内部的替换突变或/和缺失突变。各区段之间的划分是在计算机软件比较的基础上，人为划定的，最短的分区至少大于200 nt，不选择阳性率小于97%的区域，因为这提示该段内有较长的缺失突变。

2 结果

2.1 经过分型研究，获得的内引物PCR产物电泳结果 见图1。

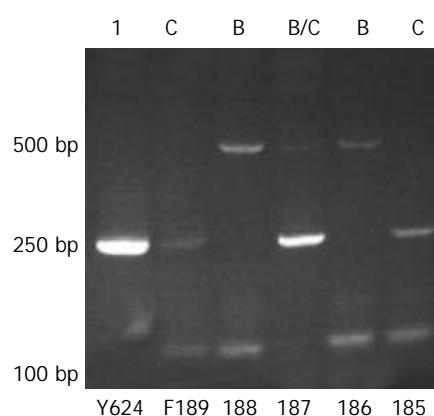


图1 HBV DNA分型的内引物PCR产物电泳结果。

应用该基因型分型方法，电泳时展示的HBV A基因型PCR产物长度为68 bp，B型为281 bp，C型为122 bp。本研究的15例患者中，基因型为B型者1例，B/C混合型者5例，C型9例。

2.2 前-S基因核酸序列分析 前-S基因全长135 bp，31株核苷酸序列比较见图2。本研究扩增的靶区域全长218 nt，包括前-S基因上游46 nt和下游前-S1区37 nt，靶区域除去引物区比较提示阳性率为100.0%，一致率为73.5%；前-S基因编码框架自第70-204 nt，阳性率为100.0%，一致率为89.6%，相对较为保守；前-S基因的一致率高于靶区域的一致率，其原因在于有3株克隆在前-S1区域出现缺失突变，导致一致率的下降。

在序列比较中，我们发现来自同一患者体内的克隆之间的一致性大于95%，符合准种表现。图2中显示第20 nt存在替换突变的现象，来自其他患者编码密码子为TCA，而来自F244患者的3株克隆密码子为TTA(C→T替换突变，箭头前核苷酸代表其他14个患者的编码核苷酸，箭头后核苷酸代表某患者的特异性变异，下同)，表现出替换突变的特异性；此外，Y948患者2个克隆在114位点的C→T替换突变、155位点的C→A替换突变，F332患者2个克隆在128位的C→T替换突变，Y1001患者2个克隆在167位点的T→C突变，均展示出个体化突变的现象。

		70	119
F238-2 B	(69)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACATACTCTGTGG	
F238-3 B	(69)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACATACTCTGTGG	
F244-1 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACATACTCTGTGG	
F244-2 B/C	(69)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACATACTCTGTGG	
F244-3 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACATACTCTGTGG	
F246-2 C	(70)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACATACTCTGTGG	
F246-3 C	(70)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACATACTCTGTGG	
F246-4 C	(70)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACATACTCTGTGG	
F248-1 C	(69)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
F248-2 C	(70)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
F248-4 C	(70)	ATGCAGTTAACATTACTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
F222-5 C	(70)	ATGCAGTTAACATTACTCCAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y948-1 C	(70)	ATGCAGTTAACATTCCAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y948-2 C	(70)	ATGCAGTTAACATTCCAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y949-1 C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y949-2 C	(69)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y951-1 C	(69)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y951-2 C	(69)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y967-1 C	(69)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y967-2 C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y991-2 C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACCAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y991-3 C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACCAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y992-1 C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y992-2 C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
F332-1 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACCAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
F332-2 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACCAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y999-1 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y1001-1 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y1001-3 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y994-1 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Y994-2 B/C	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
Consensus	(70)	ATGCAGTTAACATTCAAAACTAGGCATTATTCACACACTCTGTGG	
		120	169
F238-2 B	(119)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F238-3 B	(119)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F244-1 B/C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F244-2 B/C	(119)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F244-3 B/C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F246-2 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F246-3 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F246-4 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F248-1 C	(119)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F248-2 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F248-4 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F222-5 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y948-1 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGAAGTGCCCATTTG	
Y948-2 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGAAGTGCCCATTTG	
Y949-1 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y949-2 C	(119)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y951-1 C	(119)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y951-2 C	(119)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y967-1 C	(119)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y967-2 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y991-2 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y991-3 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y992-1 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y992-2 C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F332-1 B/C	(120)	AAGGCTGGTATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
F332-2 B/C	(120)	AAGGCTGGTATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y999-1 B/C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y1001-1 B/C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y1001-3 B/C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y994-1 B/C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Y994-2 B/C	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	
Consensus	(120)	AAGGCTGGCATTCTATATAAGAGAGAAAATACACGCAGCGCCTCATTTG	

		170	204
F238-2B	(169)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F238-3B	(169)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F244-1B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F244-2B/C	(169)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F244-3B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F246-2C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F246-3C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F246-4C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F248-1C	(169)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F248-2C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F248-4C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F222-5C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y948-1C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y948-2C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y949-1C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y949-2C	(169)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y951-1C	(169)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y951-2C	(169)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y967-1C	(169)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y967-2C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y991-2C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y991-3C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y992-1C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y992-2C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F332-1B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
F332-2B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y999-1B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y1001-1B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y1001-3B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y994-1B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Y994-2B/C	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	
Consensus	(170)	TGGGTCACCATATTCTTGGGAACAAGAGCTACAGC	

图2 前 - 前 - S 基因核酸序列比较. Consensus: 比较后推断的一致性序列.

2.3 前 - 前 - S 基因蛋白质序列分析 全部 31 株克隆编码的氨基酸序列比较见图3. 前 - 前 - S 多肽全长 45 aa, 总一致率为 75.6%, 可分为 2 部分, 1-20 aa 为高变区, 总一致率为 60.0%; 21-45 为高保守区, 总一致率为 88.0%. 由于图2展示出核苷酸序列中存在的个体化突变现象, 相应的氨基酸序列也存在个体化突变现象. 对应于核苷酸序列的变化, F244 患者的 3 株克隆在第 7 位氨基酸残基表现出 S → L 突变(箭头前氨基酸代表其他 14 个患者的编码序列, 箭头后氨基酸代表某患者的特异性变异, 下同), F332 患者 2 个克隆在第 20 位氨基酸残基表现出 A → V 突变, Y948 患者 2 个克隆在第 29 位氨基酸残基表现出 A → E 突变, Y1001 患者 2 个克隆在第 33 位氨基酸残基表现出 F → S 突变, 符合核苷酸序列中表现出的个体化突变现象.

		1	45
f222-5	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f238-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f238-3	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f244-1	(1)	MQLIITLKLGIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f244-2	(1)	MQLIITLKLGIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f244-3	(1)	MQLITLKLGIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f246-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f246-3	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f246-4	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	
f248-1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS	

f248-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
f248-4	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
f332-1	(1)	MQLIITSKPGIYILCGRLVFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
f332-2	(1)	MQLIITSKPGIYILCGRLVFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y948-1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHEVPHFVGHHILGNKSYS
y948-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHEVPHFVGHHILGNKSYS
y949-1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y949-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y951-1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y951-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y967-1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y967-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y991-2	(1)	MQLIITSKPGIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y991-3	(1)	MQLIITSQPGIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y992-1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS
y992-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAVPHFVGHHILGNKSYS
y994-1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y994-2	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y999-1	(1)	MQLITTSKLGIIYILCGRRAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS
y1001-1	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHSVGHILGNKSYS
y1001-3	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHSVGHILGNKSYS
Consensus	(1)	MQLIITSKLGIIYILCGRLAFYIREKLHAAPHFVGHHILGNKSYS

图3 前 - 前 - S 多肽氨基酸序列比较. Consensus: 比较后推断的一致性序列

3 讨论

本研究组在近期的研究中着重阐述了 HBV 准种现象^[17-24], 在此基础上, 我们发现以往界定的 HBV 前 - S1 基因之前存在一个 ORF^[25], 将其命名为前 - 前 - S 基因. 为了证实前 - 前 - S 基因的实际存在, 采取横断面研究方式对慢性乙型肝炎患者体内感染的 HBV 基因组是否存在前 - 前 - S 基因进行了研究.

本研究随机选择了 HBV DNA 阳性的患者, 首先进行了 HBV 基因型分型研究. Naito et al^[13]建立的快速分型鉴定方法是基于不同 HBV 基因型之间存在一定的序列差异, 研究者经过比较后选择相对较为特异的区域设计为一端引物, 而在较为保守的区域选择序列设计为另一端引物. 本文中型特异性引物为下游引物, 在保守的前 - S2 中段设计了上游引物. 在进行 PCR 过程中, 将不同型特异型引物与保守的对应引物配对进行扩增, 只有型特异性引物可以与上游保守引物配合扩增出 PCR 产物. 经过分型研究, 本研究抽取的 15 例患者中, 基因型为 B 型者 1 例, B/C 混合型者 5 例, C 型 9 例. 由于是随机抽取的样本, 且样本量较少, 上述分型结果并不代表是普遍现象. 进行 HBV 基因型分型的研究试图阐明前 - 前 - S 基因的存在与 HBV 基因型之间的关系.

自选择的 15 例患者中将前 - 前 - S 基因克隆到 T easy 载体中, 之后随机选择阳性克隆进行测序, 并将核苷酸序列进行比较. 除患者 Y999 和 F222 选择 1 个克隆进行测序之外, 其他 13 例患者选择 2 个以上的克隆测序和序列分析, 一共测序了 31 个克隆. 经过序列分析发现, 这 31 例克隆均编码前 - 前 - S 多肽, 前 - 前 - S 基因 ORF 与前 - S1 读码框架一致, 说明无论 B 型或 C 型的 HBV

基因组均编码前 - 前 - S 基因。由于扩增时选择的引物距离前 - 前 - S 基因的上游或下游较远的地方, 可以较为完整的表现该基因的编码情况。本研究发现前 - 前 - S 基因编码 45 aa, 根据替换突变的频度, 将前 - 前 - S 多肽分为 2 部分, 前 - 前 - S 多肽总一致率为 75.6%, 其中 1-20 aa 为高变区, 8 个位点发生变异, 总一致率为 60.0%; 21-45 为高保守区, 仅 3 个位点发生变异, 总一致率为 88.0%。

针对所有 31 个克隆的分析发现病毒氨基酸序列的变异具有 2 个特点, 其一是病毒氨基酸序列的变异具有患者个体化突变的特点, 这是近年来我们^[24]在针对 HBV 准种研究中的一个重要发现。既往我们^[14, 24]的研究并未涉及 10 例患者以上的测序比较分析, 提出 HBV 变异具有个体化特点的假说, 而本文重点研究了 15 例患者以及 31 个克隆, 经过详细的序列分析研究, 发现在一定的特殊位点会出现相对特异性的变异, 这种变异以替换突变为主, 具有较为强烈的个体化特征, 即突变表现为来自某患者的所有克隆的编码氨基酸与来自其他患者的 HBV 编码氨基酸不同, 而来自其他患者的 HBV 在该位点具有一致性。本文发现: F244 患者的 3 株克隆在第 7 位氨基酸残基表现出 S → L 突变, F332 患者 2 个克隆在第 20 位氨基酸残基表现出 A → V 突变, Y948 患者 2 个克隆在第 29 位氨基酸残基表现出 A → E 突变, Y1001 患者 2 个克隆在第 33 位氨基酸残基表现出 F → S 突变, 而其他患者来源的 HBV 在相应位点表现出相对一致的氨基酸编码特点。这在 HBV 进化中的意义尚不清楚, 但这种变异的指纹样特点在追踪感染链源头方面可能有意义。变异的另一个特点是在氨基酸序列中某些位点的变异表现出相对的一致性, 比较突出的是第 19 位氨基酸位点, F246 的 3 个克隆、F248 的 3 个克隆、Y949 的 2 个克隆和 Y999 的 1 个克隆编码为 R, 而来自其他 11 个患者的 22 个克隆均编码 L。L 为非极性氨基酸, R 为带正电荷的极性氨基酸, 属碱性氨基酸。HBsAg 血清型的分型是基于第 122 位氨基酸的 K/R^[26] 和第 160 位点氨基酸的 K/R 变异^[27], 那么前 - 前 - S 基因第 19 位氨基酸残基的 L/R 突变是否与全 S 基因(包括前 - 前 - S、前 - S1、前 - S2 和主蛋白)的血清型分型有关, 还需要进一步研究。

总之, 本研究应用分子流行病学研究方法, 自 15 例患者的血清中提取了 HBV DNA 基因组, 之后应用 HBV 基因型分型技术和 PCR-TA 克隆 - 测序技术展示了前 - 前 - S 基因的广泛存在, 这些样本来自普通 HBV 感染者, 结合本研究组针对前 - X 基因的研究^[8, 11], 我们初步推断前 - 前 - S 基因的存在是一种普遍现象, 是否编码前 - 前 - S 基因与 HBV 的 B 或 C 基因型无关。这个重要发现的意义有待于进一步阐明。

4 参考文献

- 1 Gelibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 2 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979;7:335-346
- 3 吴祥甫, 周翊钟, 冯宗铭, 李载平, 夏绍源. 人乙型肝炎病毒 - HBV adr 血清型基因组的克隆和限制酶切图谱. 中国科学 B 辑 1983; 2:162-167
- 4 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李载平. 克隆的 adr 血清型乙型肝炎病毒(pADR-1)的核苷酸顺序. 中国科学 B 辑 1986;5:55-65
- 5 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版, 北京:人民军医出版社, 1997:179-182
- 6 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
- 7 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S 区基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 8 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
- 9 董菁, 成军, 杨倩. 乙型肝炎病毒基因组高变区界定的初步研究. 世界华人消化杂志 2004;12:42-46
- 10 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前 - 前 - S 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003; 28:761-762
- 11 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 - X - 编码基因启动子活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:763-765
- 12 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19:56-62
- 13 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39:362-364
- 14 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 DNA 序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 15 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
- 16 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
- 17 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 18 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
- 19 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
- 20 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
- 21 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前 S2 基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 22 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-221
- 23 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002; 27:119-121
- 24 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅. 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:130-135
- 25 Peterson DL, Paul DA, Lam J, de Bruin TW, Lusis AJ. Antigenic structure of hepatitis B surface antigen : identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984;132:920-927
- 26 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtype. *J Gen Virol* 1988;69:2575-2583
- 27 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1248-1253

应用酵母双杂交技术筛选肝细胞 cDNA 文库中乙型肝炎病毒前 - X 蛋白结合蛋白基因

刘敏, 王琳, 成军, 张树林, 邵清, 张健, 杨倩, 董菁

刘敏, 王琳, 成军, 邵清, 张健, 杨倩, 董菁, 中国人民解放军第302医院
传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室
北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
刘敏, 女, 1969-02-19生, 陕西省西安市人, 主治医师, 西安交通大学2000
年内科学在读博士研究生。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第
302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实
验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and identification of interacting proteins with pre-X protein of hepatitis B virus in hepatocytes by yeast-two hybrid technique

Min Liu, Lin Wang, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Qing Shao,
Jian Zhang, Qian Yang, Jing Dong

Min Liu, Lin Wang, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Qing Shao, Jian Zhang,
Qian Yang, Jing Dong, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the biological function of pre-X protein encoded by hepatitis B virus (HBV) genome, and to screen proteins in hepatocytes interacting with pre-X protein by yeast-two hybrid technique.

METHODS: The pre-X gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and pre-X bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3, then the constructed vector was transformed into yeast AH109. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing hepatocytes cDNA library plasmid in 2×YPD medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- α -gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, the results were

analyzed by bioinformatics.

RESULTS: Nineteen colonies were sequenced, in which five colonies were homo sapiens ferritin, one colonies was homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), one homo sapiens aldolase B, one homo sapiens gene for glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1 (GAA1), one homo sapiens hemopexin, one homo sapiens C1 esterase inhibitor (C1-INH), one homo sapiens vitronectin, one homo sapiens voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), one hepsin (transmembrane protease, serine 1), one homo sapiens spindling, one homo sapiens plasminogen (PLG), three hypothetical proteins, and one homo sapiens chromosome 16 clone RP11-542M13.

CONCLUSION: Genes of pre-X interacting proteins in hepatocytes are successfully cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of pre-X and associated proteins.

Liu M, Wang L, Cheng J, Zhang SL, Shao Q, Zhang J, Yang Q, Dong J. Screening and identification of interacting proteins with pre-X protein of hepatitis B virus in hepatocytes by yeast-two hybrid technique. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):790-793

摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选肝细胞中与乙型肝炎病毒(HBV)前-X蛋白结合蛋白的编码基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV基因组中的前-X基因, 连接入酵母表达载体pGBT-KT-7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人肝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(DH5 α), 提取质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出HBV的前-X基因, 构建表达载体并在酵母细胞中表达, 配合后选出在四重缺陷(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基及铺有X- α -半乳糖(X- α -gal)的四重缺陷培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落19个, 其中5个是人铁蛋白; 1个是人的胰岛素样生长因子结合蛋白3 (IGFBP3); 1个是人醛缩酶B; 1个是人糖基化磷脂酰肌醇锚定结合因子1(GPA1); 1个是人血红素结合蛋白; 1个是人C1酯酶抑制子(C1-INH); 1个是人玻连蛋白; 1个是人电压依赖性阴离子通道1 (VDAC1); 1个是丝氨酸穿膜蛋白酶(hepsin); 1个是人梭素; 1个是人纤溶酶原(PLG); 3个是人假想蛋白; 1个是RP11-542M13克隆, 位于染色体16。

结论: 成功克隆出前-X的结合蛋白, 为进一步研究HBV的前-X蛋白的作用提供了新线索.

刘敏, 王琳, 成军, 张树林, 邵清, 张健, 杨倩, 董菁. 应用酵母双杂交技术筛选肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-X蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):790-793

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/790.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝性部分双链DNA病毒, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关^[1]. 1979年Gelibert et al^[2]首次报告了HBV DNA的全基因序列并确定4个主要的开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 一直沿用至今. HBV基因组只有3.2 kb, 其结构特点是结构基因与调节基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠^[3]. 关于这一紧密DNA结构中是否存在新的编码序列, 一直没有进行系统的研究. 最近董菁 et al对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现了前-S和前-X基因序列, 改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史^[4-7]. 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键之一, 通过与肝细胞中的许多蛋白质的相互作用, 介导病毒进入肝细胞, 影响这些蛋白质的活性功能, 进一步调节改变细胞功能, 影响病毒复制, 造成机体免疫功能失调, 感染慢性化及肿瘤发生. 深入研究这些蛋白之间相互作用对于揭示病毒性肝炎发病机制, 寻找可能的新的治疗方法均有重要意义. 我们应用酵母双杂交技术筛选肝细胞cDNA文库中与HBV前-X蛋白结合蛋白基因, 以筛选与前-X蛋白有相互作用的蛋白, 为研究前-X的功能提供线索.

1 材料和方法

1.1 材料 *Saccharomyces cerevisiae* AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)、cDNA肝细胞文库等均购自Clontech公司. 酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌(DH5 α), 本室保存.

1.2 方法

1.2.1 前-X基因PCR扩增 根据董菁 et al的研究^[4], 确定前-X基因序列, 长度168 bp. 以此设计引物, 同时在引物两端加酶切位点行PCR扩增. 将扩增产物连接于pGEM-T载体, 转化DH5 α 后提质粒行酶切鉴定、测序, 确定扩增的基因结果正确.

1.2.2 诱饵质粒的构建及表达 构建前-X基因的酵母表达载体pGBKT7-前-X, 用醋酸锂法转入单倍体酵母细胞AH109.

1.2.3 酵母肝文库的构建 cDNA肝文库进行增菌后, 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 1×10^9 细胞/mL.

1.2.4 诱饵与肝文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp选择培养基上生长转化子(计数大于 1×10^9 细胞/ml)与肝细胞文库混合, 30℃轻摇配合过夜, 24 h后铺板SD/-Trp/-Leu/-His 25块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长16 d后挑取生长大于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.

1.2.5 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的SOB平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆DNA测序后, 提交GenBank比对, 进行生物信息学分析, 并把所获新的基因存入GenBank数据库.

2 结果

2.1 pGBKT7-前-X诱饵质粒的构建及表达 利用自行设计的引物成功克隆出前-X基因(图1), 酶切鉴定与预期片段符合后连接到用相同酶所切的pGBKT7载体中. 再次酶切鉴定结果正确. 由此表明前-X基因已按正确方向克隆入酵母表达载体pGBKT7中, pGBKT7-前-X诱饵质粒构建成功.

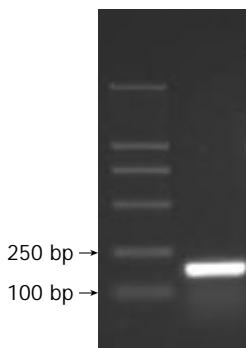


图1 前-X基因PCR扩增凝胶电泳图.

2.2 配合后cDNA筛选配合后筛选出既能在4缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有X- α -gal的4缺培养基上生长并变成蓝色的真阳性菌落, 行PCR验证有插入序列, 结果见图2.



图1 文库扩增筛选部分菌落PCR扩增结果. M: 2 000 bp, 1-7是不同的集落PCR扩增结果.

2.3 cDNA 测序与同源性分析初步结果 阳性菌落测序后, 与 GenBank 数据库进行初步比较, 19个均与已知基因的部分序列高度同源(98-100%), 详细结果见表1.

表1 前-X蛋白结合的肝细胞中蛋白的类型

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	人铁蛋白	99-100%	5
2	人胰岛素样生长因子结合蛋白3(IGFBP3)	99%	1
3	人醛缩酶B	99%	1
4	人糖基化磷脂酰肌醇锚定结合因子1(GAA1)	99%	1
5	人血红素结合蛋白	99%	1
6	人C1酯酶抑制子(C1-INH)	100%	1
7	人玻连蛋白	99%	1
8	人电压依赖性阴离子通道1(VDAC1)	98%	1
9	丝氨酸穿膜蛋白酶(hepsin)	100%	1
10	人梭素	100%	1
11	人纤溶酶原(PLG)	98%	1
12	人假想蛋白	99%	3
13	RP11-542M13克隆, 位于染色体16	100%	1

3 讨论

最早在1990年Loncarevic et al^[8]在对HCC患者血液HBV基因组的研究中简单介绍了前-X区的存在。Takahashi et al^[9]于1995年的研究结果认为前-X区与HCC有密切关系。1998年, Hiroi et al^[10]自HCC患者体内克隆了40株HBV全序列, 其中38株为adr亚型, 之中的18株含有前-X基因, 作者综合以往的资料, 认为前-X基因与HCC有密切的关系。但上述资料分析的患者病例数较少, 结论需要进一步推敲。董菁 et al 对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 界定了乙型肝炎病毒前-X基因区, 根据针对前-X多肽的氨基酸组成分析, 发现该区域含有多个S, 可能是磷酸化的重要区域, 与细胞内信号转导有关^[4]。关于前-X编码蛋白的功能及相互作用蛋白还需应用多种分子生物学技术从多方面研究。

酵母双杂交技术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。我们应用此技术成功的筛选出前-X蛋白相互作用蛋白。其中特别有意义的是糖基化磷脂酰肌醇糖基化磷脂酰肌醇锚定结合因子1(glycosyl phosphatidylinositol anchor attachment GAA1)、电压依赖性阴离子通道1(VDAC1)和丝氨酸穿膜蛋白酶(Hepsin)。

糖基化磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidylinositol GPI)结合是蛋白锚定细胞膜表面的一般机制^[10]。GPI锚定蛋白的作用是细胞与细胞间的相互作用而不是细胞生长^[11]。大多数原核细胞表面蛋白通过共价黏附GPI被锚定于细胞膜。转录后黏附GPI是在细胞表面表达这些蛋白的

基础^[12]。这种膜锚定也广泛存在于所有真核组织。在哺乳动物细胞有100多个细胞表面蛋白存在各种大小和功能的GPI锚定位点^[13]。在内质网中GPI前体和一种蛋白前体形成GPI锚定蛋白。GPI锚定蛋白有两个信号多肽。一个是氨基末端信号多肽直接易位穿过内质网膜。另一个是羧基末端信号多肽直接黏附GPI锚凹。转录后, 羧基末端GPI黏附信号立即被GPI氨基转移酶识别并分离信号以GPI取代。从F9细胞裂解GAA1, 发现GAA1是蛋白前体GPI锚凹的基础而对GPI合成无作用。缺少GAA1, 羧基末端介导的蛋白前体和GPI氨基转移无法形成。GAA1和Gpi8p形成复合物, 所以这两个蛋白对于羧基末端介导的形成是必要的^[10]。HBV前-X蛋白与GAA1有相互作用, 推测前-X蛋白与细胞死亡对细胞转化和肿瘤发生起作用, 有研究表明C-Raf可通过调节线粒体VDAC影响细胞存活^[21]。VDAC结合Ca(2+), 使Ca(2+)透过, 在调节线粒体Ca(2+)的自身稳定中有作用^[14-21]。HBV前-X与VDAC有相互作用, 推测前-X蛋白与线粒体膜蛋白可结合, 从而影响线粒体膜通透性, 与HBV感染癌变有关。

丝氨酸穿膜蛋白酶是一种51 kDa的膜相关性丝氨酸蛋白酶, 作为一种完整的膜蛋白参与细胞生长和维持合适的细胞形态。在许多原发性肿瘤和生长分化快的细胞中有丝氨酸穿膜蛋白酶超表达, 如肝癌细胞、哺乳动物癌细胞、外周神经细胞和幼小仓鼠肾细胞中水平高, 而在人脐带和大鼠毛细血管上皮细胞测不到^[22]。肝癌细胞用抗-丝氨酸穿膜蛋白酶抗体处理后生长抑制, 推测正常细胞生长在细胞表面要有丝氨酸穿膜蛋白酶分子, 但丝氨酸穿膜蛋白酶超表达与肿瘤发生有关^[23]。Chen et al^[24]认为丝氨酸穿膜蛋白酶在癌前状态超表达意味着丝氨酸穿膜蛋白酶在肿瘤侵入时有作用。Wu et al^[25]认为丝氨酸穿膜蛋白酶是一种II型穿膜丝氨酸蛋白酶, 肝细胞表面大量表达, 对血液凝集、肝细胞生长和受精过程有一定作用。前-X蛋白与丝氨酸穿膜蛋白酶有相互作用, 是否与HBV癌变发生有关有待进一步研究证实。

众所周知, HBV感染与HCC发生、发展密切相关。我们用酵母双杂交技术成功筛选出与HBV前-X蛋白相互作用蛋白, 提示前-X蛋白与信号传导、细胞凋亡、HCC发生等关系密切, 这一部分的研究还有待进一步深入。

4 参考文献

- 成军, 董菁, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-88
- Gelibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68
- 董菁, 成军, 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 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
- 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基

- 因组中前 - 前 - S - 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. *解放军医学杂志* 2003;28:762-764
- 7 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;28:765-767
- 8 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940-4944
- 9 Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, Prince AM. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000;267:58-64
- 10 Hiroi Y, Chen R, Sawa H, Hosoda T, Kudoh S, Kobayashi Y, Aburatani H, Nagashima K, Nagai R, Yazaki Y, Medoff ME, Komuro I. Cloning of murine glycosyl phosphatidylinositol anchor attachment protein, GPAA1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C205-212
- 11 Takeda J, Kinoshita T. GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 1995;20:367-371
- 12 Ohishi K, Inoue N, Maeda Y, Takeda J, Riezman H, Kinoshita T. Gaa1p and gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol Biol Cell* 2000;11:1523-1533
- 13 Kinoshita T, Inoue N, Takeda J. Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol* 1995;60:57-103
- 14 Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 2001;358:147-155
- 15 Kmida H, Budzinska M, Stobienia O. Modulation of the voltage-dependent anion-selective channel by cytoplasmic proteins from wild type and the channel depleted cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol* 2003;50:415-424
- 16 Benz R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1197:167-196
- 17 Shi Y, Chen J, Weng C, Chen R, Zheng Y, Chen Q, Tang H. Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:989-996
- 18 Muller A, Rassow J, Grimm J, Machuy N, Meyer TF, Rudel T. VDAC and the bacterial porin PorB of *Neisseria gonorrhoeae* share mitochondrial import pathways. *EMBO J* 2002;21:1916-1929
- 19 Muller A, Rudel T. Modification of host cell apoptosis by viral and bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2001;291:197-207
- 20 Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-519
- 21 Le Mellay V, Troppmair J, Benz R, Rapp UR. Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase. *BMC Cell Biol* 2002;3:14-17
- 22 Somoza JR, Ho JD, Luong C, Ghate M, Sprengeler PA, Mortara K, Shrader WD, Sperandio D, Chan H, McGrath ME, Katz BA. The structure of the extracellular region of human hepsin reveals a serineprotease domain and a novel scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain. *Structure (Camb)* 2003;11:1123-1131
- 23 Torres-Rosado A, O'Shea KS, Tsuji A, Chou SH, Kurachi K. Hepsin, a putative cell-surface serine protease, is required for mammalian cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7181-7185
- 24 Chen Z, Fan Z, McNeal JE, Nolley R, Caldwell MC, Mahadevappa M, Zhang Z, Warrington JA, Stamey TA. Hepsin and maspin are inversely expressed in laser capture microdissected prostate cancer. *J Urol* 2003;169:1316-1319
- 25 Wu Q. Gene targeting in hemostasis. Hepsin. *Front Biosci* 2001;6:D192-200

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和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; 研究方法和技术有无创新性、系统性或特色。改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当。(5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足。临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果。(6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论。(7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况。(8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

乙型肝炎病毒基因组前-X区的分子流行病学研究

董菁, 杨倩, 成军

董菁, 杨倩, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
董菁, 男, 1969-02-07生, 河北省徐水县人, 汉族, 1993和1996年第四军医大学毕业, 分别获得医学学士和硕士学位, 2001年毕业于北京大学, 获得医学博士学位, 主治医师。主要从事乙型肝炎病毒分子生物学与病毒性肝炎治疗的研究。发表论文25篇, 参编专著4部, 获北京市科技进步奖和军队科技进步奖各1次。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Molecular epidemiological features of pre-X region in hepatitis B virus genome

Jing Dong, Qian Yang, Jun Cheng

Jing Dong, Qian Yang, Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing, 100039
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To identify pre-X region in hepatitis B virus (HBV) genome and to study the relationship between the genotype and the existence of pre-X region.

METHODS: HBV genomic DNA was extracted from the sera of patients with HBV infection. Multiple-primers polymerase chain reaction (PCR) method was used to identify the genotype of HBV strains. Pre-X region was amplified by PCR method, and TA cloning technique was used to clone the DNA fragment into pGEM Teasy vector. After sequencing of the target region, Vector 8.0 software was used to analysis the sequences.

RESULTS: Seventeen samples were collected in this study. One genotype A, 3 genotype B, 10 genotype C and 3 B/C genotype mixture were identified. After sequencing, 27 clones from 45 clones (60%) were found encoding the pre-X peptide. Eighteen from 27 clones (66.7%) pre-X coding sequences were found from C genotype. Three types of replacement mutation led to pre-mature coding of pre-X gene. The mutation in pre-X peptide had feature

of individually mutation.

CONCLUSION: Coding of the pre-X gene is popular in HBV genome.

Dong J, Yang Q, Cheng J. Molecular epidemiological features of pre-X region in hepatitis B virus genome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):794-800

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒(HBV)基因组是否存在前-X编码基因, 并探讨前-X基因与HBV基因型之间的关系。

方法: 自慢性乙型肝炎患者血清中提取乙型肝炎病毒基因组, 首先应用多引物-多聚酶链反应(PCR)进行HBV基因型分型。之后将前-X区扩增, TA克隆到pGEM Teasy载体后进行单克隆测序, 利用Vector 8.0软件进行序列分析。

结果: 17例患者中, A型者1例, B型3例, B/C混合型者3例, C型10例。克隆测序的45个克隆中, 27个(60%)克隆编码前-X多肽, 其中18个(66.7%)克隆来自C基因型。有3种形式突变导致前-X区编码不能。前-X区多肽具有个体化突变现象。

结论: 前-X区编码在B、C基因型中均为普遍存在的现象, 其编码具有C型倾向性。

董菁, 杨倩, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-X区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):794-800

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/794.asp>

0 引言

Gelibert et al^[1-2]于1979年第一次解读了乙型肝炎病毒(HBV)基因组, 全长在3 200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链DNA病毒。之后学者^[3-4]将HBV基因组划分出4个开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区。4个ORF中表达的氨基酸长度不同, S基因编码HBV囊膜蛋白, 包裹HBV病毒; C基因编码核心蛋白, 是HBV基因组的附着部位; P基因编码多聚酶, 在基因组复制过程中起重要作用; X基因编码产物的功能不明确, 研究发现具有反式激活作用^[5-6], 可激活宿主或病毒的基因表达。我国学者^[7-8]于1984年报道了中国大陆HBV全序列, 近来我们利用长距离-精确多聚酶链反应(LA-PCR)方法^[9]研究了乙型肝炎患者血清中存在的HBV病毒基因组, 确定了前-X基因^[10]和前-X基因^[11]的以及上述2个基因的启动子^[12-13], 并以文献流行病学

方法确定了前-X基因和前-X基因的普遍性^[14]. 本文以分子流行病学实验方法证实了前-X区的存在状态.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 血清采集 血清来源: 17例患者, 诊断为病毒性肝炎, 乙型, 慢性, 符合中华医学会传染病与寄生虫病学分会、中华医学会肝病学分会2000年联合制定的《病毒性肝炎防治方案》(试行)^[15], 临床初步检测HBV DNA阳性.

1.1.2 DNA提取 自静脉中采集5 mL全血, 分离血清, 200 μL血清加入蛋白酶K及其缓冲液, 65 °C消化过夜, 饱和酚:氯仿(1:1)抽提总DNA, 无水乙醇沉淀, 加入无DNA酶的RNA酶消化后, -20 °C保存备用.

1.2 方法

1.2.1 HBV基因型分析 参考Naito et al^[16]设立的6种主要基因型分型方法, 建立HBV基因型的检测方法. 简言之, 应用巢式-多引物-多聚酶链反应, 外引物:上游引物序列: 5' - AGC ATG GGA GGT TGG TCT TC-3', 下游引物序列: 5' - AAG GCA TCA AGG CAG GAT AGC-3', 目的片段长度约1429 bp, 自前-S1区起始处至S区终止子下游226 bp. 内引物: 上游引物序列: 5' - GGC TCA AGT TCC GGA ACA GT-3', A基因型特异性下游引物: 5' - CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3', B基因型特异性下游引物: 5' - CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3', C基因型特异性下游引物: 5' - GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'.

外引物扩增PCR程序参数如下: 94 °C 1 min 预变性, 94 °C 1 min 30 s 变性, 59 °C 1 min 30 s 退火, 72 °C 2 min 延长, 共30个循环, 72 °C 延长10 min. 内引物扩增PCR程序参数如下: 94 °C 1 min 预变性, 94 °C 30 s 变性, 58 °C 30 s 退火, 72 °C 30 s 延长, 共35个循环. NT-PCR产物经过3%琼脂糖凝胶电泳后判断HBV基因型.

1.2.2 前-X区的克隆及序列分析 采用本研究组以往报告^[17-19]的PCR-TA克隆-测序方法. PCR扩增前-X区基因: 前-X上游引物为P1: 5' - CCA AGT GTT TGC TGA CGC AAC C', 下游引物为P2: 5' - GGA TCC AGT TGG CAG CAC ACC-3', P1下游第31-33 nt处为前-X区起始密码子ATG, P2上游30-32 nt处为前S1区起始密码子ATG. 前-X区PCR参数如下: 94 °C 1 min 预变性, 94 °C 60 s 变性, 58 °C 60 s 退火, 72 °C 60 s 延长, 共35个循环, 72 °C再延长10 min.

克隆目的片段: 将PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与Promega公司所产的pGEM Teasy载体连接过夜. 将连接好的重组质粒转入细菌JM109, 氨苄青霉素(Amp)和X-gal蓝白斑法筛选阳性菌落, 进一步提取质粒鉴定. DNA测序: 选择经鉴定pGEM Teasy内插入230 bp产物的菌落送检测

序, 由上海博亚公司完成. 测序引物为pGEM Teasy载体自有的T7、SP6测序引物.

1.2.3 序列分析 应用Vector 8.0版软件对进行了测序分析的HBV前-X基因序列进行碱基序列和氨基酸序列一致性分析. 该软件比较后提供两个数据: 阳性率和一致率, 阳性率是选定区域推定序列的核苷酸(氨基酸)序列数目与区域总长度之比, 推定序列是软件自动比较所有序列, 参考每个核苷酸(氨基酸)位点上每个克隆的编码方式, 由大多数克隆(多于70%)编码的核苷酸(氨基酸)组成的一致性序列, 阳性率用于展示区域内部的插入突变或/和缺失突变, 以及较少见的单一位点多种核苷酸(氨基酸)编码方式; 一致率是选定区域全部克隆均为一致的核苷酸(氨基酸)数目与最长的单一克隆核苷酸(氨基酸)序列数目之比, 表示该段区域核苷酸(氨基酸)序列一致性, 用于展示区域内部的替换突变或/和缺失突变.

2 结果

2.1 HBV基因型分型 获得的内引物PCR产物电泳结果见图1.

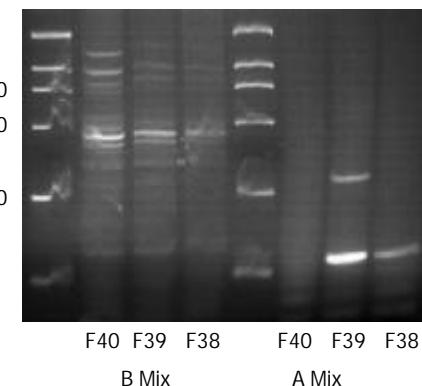


图1 HBV基因型分型电泳图. F40泳道为阴性; F39为B/C基因型混合存在; F38泳道为C基因型.

应用该基因型分型方法, 电泳时展示的HBV A基因型PCR产物长度为68 bp, B型为281 bp, C型为122 bp. 本研究的17例患者中, 基因型为A型者1例, 基因型为B型者3例, B/C混合型者3例, C型10例.

2.2 前-X基因核酸序列分析 前-X基因全长168 bp, 45株核苷酸序列比较见图2. 本研究扩增的靶区域全长231 nt, 包括前-X基因上游30 nt和下游X基因30 nt. 靶区域除去引物区全长187 bp, 比较结果提示阳性率为99.5%, 一致率为78.1%, 其中154 nt编码方式有A/G/C3种; 前-X基因编码框架自第31至第198 nt, 阳性率为99.4%, 一致率为76.8%; 在序列比较中, 我们发现来自同一患者体内的克隆之间的一致性大于95%, 符合准种表现.

图2显示了所有的45个克隆前-X区的核苷酸序列, 以及由这45个克隆推断出的一致性序列. 这45个克隆中, 有27个克隆编码前-X多肽, 占观察序列的60%.

导致前-X基因编码不能的原因在于A²⁶⁰⁸→C/T替换突变或C/A²⁷³³→T替换突变或上述位点的双突变^[14]，研究结果提示双替换突变是导致前-X区编码不能的主要原因，占22.2%。

前-X基因的编码与否与基因型之间的关系见表1。研究提示A型仅有1个克隆，是由于双替换突变导致了编码失败；B型8个克隆中，6个克隆是由于双替换突变导致了编码失败；C型26个克隆中，5个克隆由于A²⁶⁰⁸→C/T替换突变，3个克隆由于C/A²⁷³³→T替换突变导致了编码失败。C型测序的26个克隆中有18个克隆编码前-X区，占69.2%；B型测序的8个克隆中仅有2个克隆编码前-X区，占25%。选择测序的45个克隆中有27个克隆编码前-X区，其中B型2个，C型18个，B/C混合型7例。

值得注意的是患者F298，共选择了4个克隆进行测序，其中克隆F298-1发生A²⁶⁰⁸→C替换突变，导致前-X区编码不能，其他3个克隆未发生替换突变。

表1 前-X区编码突变在HBV基因型中的分布

	A ²⁶⁰⁸ →C/T替换突变	C/A ²⁷³³ →T替换突变	双替换突变	编码前-X区
A型	0	0	1	0
B型	0	0	6	2
C型	5	3	0	18
B/C	0	0	3	7
比例 %	11.1	6.7	22.2	60

31	80
F296-1C (31)ATGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F296-4C (31)ATGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F296-5C (31)ATGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F298-1C (31)CTGGGGCTTGGCTATTGGCCATGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F298-2C (31)ATGGGGCTTGGCTATTGGCCATGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F298-3C (31)ATGGGGCTTGGCTATTGGCCATGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F298-5C (31)ATGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F299-1C (31)CTGGGGCTTGGCTATTGGCCATGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F299-2C (31)CTGGGGCTTGGCTATTGGCCATGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F300-1B/C (31)CTGGGGCTTGGCTATTGGCCATGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F300-2B/C (31)CTGGGGCTTGGCTATTGGCCATGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F300-4B/C (31)CTGGGGCTTGGCTATTGGCCATGCCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F325-2B (31)TTGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F325-3B (31)TTGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F325-4B (31)TTGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F325-6B (31)TTGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCACATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F326-1C (31)ATGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F326-2C (31)ATGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F326-4C (31)ATGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F326-6C (31)ATGGGGCTTGGCCATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F327-1C (31)TTGGGGCTTGGCTATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
F327-2C (31)TTGGGGCTTGGCTATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
Y931-2B (31)ATGGGGCTTGGCTATTGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	

81	130
Y931-3B (31)ATGGGGCTTGGCTATTGGCCATCAGCGCATGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGGCTC	
Y933-1B (31)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTTGAGCTTGTGTCGAGC	
Y933-2B (31)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCCGCTTGTGTCGAGC	
Y940-4C (31)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
Y942-3C (31)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F296-1C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F296-4C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F296-5C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F298-1C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F298-2C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F298-3C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F298-5C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F299-1C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F299-2C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F300-1B/C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F300-2B/C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F300-4B/C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F325-2B (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F325-3B (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F325-4B (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F325-6B (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F326-1C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F326-2C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F326-4C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F326-6C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F327-1C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
F327-2C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
Y931-2B (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
Y931-3B (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
Y933-1B (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
Y933-2B (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
Y940-4C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	
Y942-3C (81)CTCTGCCATCCATACTCGGAAACTCCTAGCAGCTTGTGTCGAGC	

Y943-1A (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y949-4C (131)CGGTCTGGAGCAAAACTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y947-2C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y949-5C (131)CGGTCTGGAGCAAAACTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y947-3C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y982-1B/C(131)CGGTCTGGAGCAAAACTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y949-2C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y982-3B/C(131)CGGTCTGGGGCAAAACTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y949-3C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y982-4B/C(131)CGGTCTGGAGCGAAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y949-4C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y982-5B/C(131)CGGTCTGGGGCAAAACTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y949-5C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y982-6B/C(131)CGGTCTGGAGCGAAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y982-1B/C(81)CCCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y983-2B/C(131)CGGTCTGGAGCGAAAACCTCATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y982-3B/C(81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y983-3B/C(131)CGGTCTGGAGCGAAAACCTCATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y982-4B/C(81)CTCTGCCGATCCGTAUTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y985-2C(131)CGGTCTGGGGCAAAACTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y982-5B/C(81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y985-3C(131)CGGTCTGGGGCAAAACTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y982-6B/C(81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Y985-6C(131)CGGTCTGGGGCAAAACTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y983-2B/C(81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	Consensus (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG
Y985-3C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	
Y985-6C (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	
Consensus (81)CTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCGCTTGTGTCGAGC	
131	181
F296-1C (131)CGGTCTGGGGCAAAACCTTATCGGAACCTGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F296-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F296-4C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGAACCTGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F296-4C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F296-5C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGAACCTGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F296-5C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F298-1C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F298-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F298-2C (131)CGGTCTGGGGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTCGTCCTCTCG	F298-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F298-3C (131)CGGTCTGGGGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTCGTCCTCTCG	F298-3C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F298-5C (131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F298-5C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F299-1C (131)CGATCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F299-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F299-2C (131)CGGTCTGGAGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F299-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F300-1B/C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCTGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F300-1B/C(181)GAAATACACCTCCTTTCC
F300-2B/C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCTGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F300-2B/C(181)GAAATACACCTCCTTTCC
F300-4B/C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCTGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F300-4B/C(181)GAAATACACCTCCTTTCC
F325-2B(131)AGGTCTGGGGCAAACACTCATCGGAACTGACAATTCTGTCGTGCTCTCCG	F325-2B (181)CAAGTACACCTCATTCCC
F325-3B(131)AGGTCTGGGGCAAACACTCATCGGAACTGACAATTCTGTCGTGCCCCCG	F325-3B (181)CAAGTACACCTCATTCCC
F325-4B(131)AGGTCTGGGGCAAACACTCATCGGAACTGACAATTCTGTCGTGCTCTCCG	F325-4B (181)CAAGTACACCTCATTCCC
F325-6B(131)AGGTCTGGGGCAAACACTCATCGGAACTGACAATTCTGTCGTGCTCTCCG	F325-6B (181)CAAGTACACCTCATTCCC
F326-1C(131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCGTTGTCCTCTCG	F326-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F326-2C(131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCGTTGTCCTCTCG	F326-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F326-4C(131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCGTTGTCCTCTCG	F326-4C (181)GAAAGACACCTCCTTTCC
F326-6C(131)CGGTCTGGGGCAAACCTTATCGGCACCGACAACCTCGTTGTCCTCTCG	F326-6C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F327-1C(131)CGGTCTGGAGCAAACCTTCTCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F327-1C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
F327-2C(131)CGGTCTGGAGCAAACACTTCTCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	F327-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
Y931-2B(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	Y931-2B (181)GAAATACACCTCCTTTCC
Y931-3B(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	Y931-3B (181)GAAATACACCTCCTTTCC
Y933-1B(131)AGGTCTGGAGCGAAACCTATCGGAACTGACAATTCTGTCGTGCTCTCCG	Y933-1B (181)CAAGTACACCTCATTCCC
Y933-2B(131)AGGTCTGGAGCGAAACACTCATCGGAACTGACAATTCTGTCGTGCTCTCCG	Y933-2B (181)CAAGTACACCTCATTCCC
Y940-4C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	Y940-4C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
Y942-3C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	Y942-3C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
Y943-1A(131)AGGTCTGGAGCGAAACACTCATCGGAACTGACAATTCTGTCGTGCTCTCCG	Y943-1A (181)CAAGTACACCTCATTCCC
Y947-2C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	Y947-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
Y947-3C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGAACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	Y947-3C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
Y949-2C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	Y949-2C (181)GAAATACACCTCCTTTCC
Y949-3C(131)CGGTCTGGAGCGAAACCTTATCGGCACCGACAACCTGTTGTCCTCTCG	Y949-3C (181)GAAATACACCTCCTTTCC

Y982-5B/C(181)GAAATACACCTCCTTCC
 Y982-6B/C(181)GAAATACACCTCCTTCC
 Y983-2B/C(181)GAAATACACCTCCTTCC
 Y983-3B/C(181)GAAATACACCTCCTTCC
 Y985-2C(181)GAAATACACCTCCTTCC
 Y985-3C(181)GAAATACACCTCCTTCC
 Y985-6C(181)GAAATACACCTCCTTCC
 Consensus(181)GAAATACACCTCCTTCC

图2 前-X基因核酸序列比较. Consensus: 比较后推断的一致性序列.

2.3 前-X基因蛋白质序列分析 45株克隆中有27个克隆编码的前-X多肽，其氨基酸序列比较见图3。前-X多肽全长56 aa，总一致率为73.2%。经过比较，按照一致率的差异分为3部分，1-10 aa为高变区，一致率为60.0%；11-36 aa为高保守区，一致率为88.5%，其中19-36 aa是保守区中的保守区，一致率为94.4%；37-56 aa为另一高变区，一致率为60.0%。

氨基酸序列中的部分替换突变具有来源个体化现象，我们^[20]曾命名其为HBV个体化突变。第26 aa，来

自其他患者的病毒株均编码P，而来自患者Y931的2个克隆编码S；相应的，第40 aa，来自其他患者的病毒株均编码Y，而来自患者Y983的2个克隆编码H。

氨基酸的变异还表现为一些位点的变异具有相对的普遍意义，比如第5 aa的Y(10)/H(17)(括号中为编码该氨基酸残基的克隆数，下同)，第6 aa的W(12)/R(15)，第37 aa的G(11)/S(16)，第38 aa的E(15)/K(12)，第42 aa的N(14)/H(13)。

3 讨论

本研究组^[21-29]在近期的研究中着重阐述了HBV准种现象，在此基础上，我们发现以往界定的HBV前-S1基因之前存在一个ORF，将其命名为前-前-S基因^[10]。同时发现X基因之前存在一融合表达的ORF，命名为前-X区^[11]，为了证实前-X基因的实际存在以及氨基酸序列特点，我们采取横断面研究方式对慢性乙型肝炎患者体内感染的HBV基因组进行了研究。

本研究选择了17例HBV DNA阳性的患者，按照Naito et al^[13]建立的快速分型鉴定方案进行了HBV基因型分型研究，试图探讨HBV基因型别与前-X区编码

		1	56
f298-2	(1)	MGLGYWPSPHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWGETYRNRLCRPLSEIHLFS	
f298-3	(1)	MGLGYWPSPHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWGETYRNRLCRPLSEIHLFS	
f298-5	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
f326-1	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLRCPLSEIHLSS	
f326-2	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLRCPLSEIHLSS	
f326-4	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLRCPLSERHLSS	
f326-6	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLRCPLSEIHLSS	
y931-2	(1)	MGLGYWPSPHAWNLCGSSADPYCGTSSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y931-3	(1)	MGLGYWPSPHAWNLCGSSADPYCGTSSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y940-4	(1)	MGLGYWPSPHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y942-3	(1)	MGLGYWPSPHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y947-2	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y947-3	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y949-2	(1)	MGLGYWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y949-3	(1)	MGLGYWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y949-4	(1)	MGLGYWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y949-5	(1)	MGLGYWPSTHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y982-1	(1)	MGLGHWPSAHAWNLCGSPADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y982-3	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLRCPLSEIHLSS	
y982-4	(1)	MGLGHWPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y982-5	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLSCPLSEIHLSS	
y982-6	(1)	MGLGHWPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	
y983-2	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETHRNRQLCCPLSEIHLSS	
y983-3	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETHRNRQLCCPLSEIHLSS	
y985-2	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLSCPLSEIHLSS	
y985-3	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLSCPLSEIHLSS	
y985-6	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWKGKYRHRQLSCPLSEIHLSS	
Consensus	(1)	MGLGHRPSAHAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSCPQVWSETYRNRLCCPLSEIHLSS	

图3 前-X多肽氨基酸序列比较. Consensus: 比较后推断的一致性序列.

之间的关系。经过分型研究, 本研究抽取的 17 例患者中, 基因型为 A 型者 1 例, 基因型为 B 型者 3 例, B/C 混合型者 3 例, C 型 10 例。自 17 例患者的克隆库中随机选择了共 45 个克隆进行核酸序列测定, 其中 27 个克隆编码前-X 区, 18 个克隆不编码前-X 基因。编码前-X 基因的克隆中以 C 基因型为最多, 有 18 个克隆, 来自 7 例患者; 其中 B 型 2 个克隆, 来自 1 例患者; B/C 混合型 7 个克隆, 来自 2 例患者。10 例患者体内的 HBV 病毒基因组编码前-X 基因, 占采样总数的 58.8% (10/17), 提示多数患者体内的 HBV 基因组编码前-X 基因。进行 HBV 基因型分型的研究试图阐明前-X 基因的存在与 HBV 基因型之间的关系, 结果发现 C 型测序的 26 个克隆中有 18 个(69.2%)克隆编码前-X 区, B 型测序的 8 个克隆中仅有 2 个(25%)克隆编码前-X 区, 提示前-X 基因的编码具有一定的 HBV C 基因型倾向性, 但并不具有基因型特异性。

我们^[14]之前的研究发现前-X 基因编码不能主要由于 3 种突变所导致, 即 $A^{2608} \rightarrow C/T$ 替换突变、 $C/A^{2733} \rightarrow T$ 替换突变以及上述 2 个位点的双替换突变。第一种变异导致前-X 区起始密码子 ATG 突变为 C/TTG, 病毒 X 蛋白自动以下一个 ATG 为起始密码子; 第二种变异导致前-X 区 ATG 与原 X 区之间 ATG 之间第 44 位氨基酸编码子发生终止突变, C/AGA 突变为 TGA, 导致前-X 基因表达被提前终止; 双替换突变是指上述的 2 种突变同时发生。表 1 初步揭示了 HBV 基因型与前-X 基因编码不能之间的关系。结果发现 A 基因型 1 个克隆、B 基因型 6 个克隆和 B/C 混合型 3 个克隆发生了双替换突变, 而 C 基因型前-X 区编码不能的 8 个克隆均表现为单位点替换突变, 其中 $A^{2608} \rightarrow C/T$ 突变 5 个, $C/A^{2733} \rightarrow T$ 突变 3 个, 本组研究结果初步提示 C 基因型 HBV 基因组与其他基因型导致前-X 编码不能的机制是不同的, 相对而言, C 基因型的变异是初步的, 而 A、B 基因型的变异是进一步的。值得注意的是患者 F298, 在选择的 4 个测序克隆中, 其中 1 个克隆发生 $A^{2608} \rightarrow C$ 替换突变而导致前-X 区编码不能, 其他 3 个克隆未发生替换突变, 这提示前-X 区变异是渐变的, 并不是一成不变的。

针对前-X 多肽氨基酸序列进行的分析发现前-X 多肽存在 2 个高度变异区和一个高度保守区。前-X 多肽全长 56 aa, 氨基酸序列总一致率为 73.2%。高度变异区存在于肽段的两端, 分别为 1-10 aa, 一致率为 60.0%; 37-56 aa 为另一高变区, 一致率为 60.0%。上述 2 个区域的一致率较前-X 多肽的总一致率低 13.2%。前-X 多肽的中央部分为高保守区, 11-36 aa 段一致率为 88.5%, 19-36 aa 的一致率高达 94.4%。这些发现对以后前-X 多肽的检测有重要意义。前-X 多肽之中的变异以替换突变为主, 而之中部分位点的变异展示出 HBV 个体化突变特征^[20]。如第 26 aa, 来自其他患者的病毒株均编码 P, 而来自患者 Y931 的 2 个克隆编码 S; 第 40 aa, 来自其他患者的病毒株均编码 Y, 而来自患者 Y983 的 2 个克

隆编码 H, 这些变异提示 HBV 基因组的变异就象人类的指纹, 这在 HBV 生活史中具有什么样的意义, 还需要进一步研究。

前-X 区多肽氨基酸的变异还表现为一些位点的变异具有相对的普遍意义, 比如第 5 aa 的 Y(10)/H(17)(括号中为编码该氨基酸残基的克隆数, 下同), 第 6 aa 的 W(12)/R(15), 第 37 aa 的 G(11)/S(16), 第 38 aa 的 E(15)/K(12), 第 42 aa 的 N(14)/H(13)。这些位点的变化可能具有进一步分型的意义, 需要进一步研究。

总之, 本研究应用分子流行病学研究方法, 自 17 例患者的血清中提取了 HBV DNA 基因组, 之后应用 HBV 基因型分型技术和 PCR-TA 克隆 - 测序技术展示了前-X 基因的存在, 这些样本来自普通 HBV 感染者, 而不是来自原发性肝癌患者^[30-31], 提示前-X 基因的存在是一种普遍现象。结合本研究组针对前-X 基因的研究^[11, 13-14], 我们认为应当加强对前-X 区的研究, 将 Loncarevic et al^[32]最初的研究提高到蛋白水平。本研究还提示前-X 基因存在 HBV C 基因型倾向性, 但不存在基因型的特异性。

4 参考文献

- 1 Gelibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 2 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979;7:335-346
- 3 Kann M, Gerlich. Chapter 7: structure and molecular virology. viral hepatitis (Eds. Zuckerman AJ.), 2nd edition, Harcourt Publishers Limited, 1998:77-106
- 4 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版, 北京: 人民军医出版社, 1997:179-182
- 5 Kumar U, Jayasuryan N, Kumar R. A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein transactivation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 5647-5652
- 6 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 7 吴祥甫, 周翊钟, 冯宗铭, 李载平, 夏绍源. 人乙型肝炎病毒 - HBV adr 血清型基因组的克隆和限制酶切图谱. 中国科学 B 辑 1983; 2:162-167
- 8 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李载平. 克隆的 adr 血清型乙型肝炎病毒(pADR-1)的核苷酸顺序. 中国科学 B 辑 1986;5:55-65
- 9 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
- 10 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-S 区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 11 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
- 12 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-X-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
- 13 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-S 编码基因启动子活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003; 28:763-765
- 14 董菁, 成军, 杨倩. 乙型肝炎病毒基因组高变区界定的初步研究. 世界华人消化杂志 2004;12:42-46
- 15 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防

- 治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 16 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39:362-364
- 17 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 18 Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *Chin J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 19 董菁, 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
- 20 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 21 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
- 22 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 洪源, 成军, 王勤环, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒C基因启动子区异质性检测的初步研究. 临床检验杂志 2002;20:72-74
- 23 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
- 24 董菁, 成军, 王勤环, 施双双, 洪源, 皇甫竞坤, 王刚, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒逆转录酶区基因序列准种与变异研究. 解放军医学杂志 2001;26:823-825
- 25 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒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
- 26 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒前S2基因序列异质性的研究. 中华内科杂志 2002;41:1-4
- 27 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:209-221
- 28 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
- 29 董菁, 刘妍, 皇甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅, 成军. 乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:130-135
- 30 Takahashi K, Kishimoto S, Ohori K, Yoshizawa H, Akahane Y, Okamoto H, Mishiro S. A unique set of mutations in the "preX" region of hepatitis B virus DNA frequently found in patients but not in asymptomatic carriers: implication for a novel variant. *Int Hepatol Commun* 1995;3:131-138
- 31 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-2326
- 32 Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4940

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

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

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因2基因组DNA结构分析及其不同剪切体的克隆化研究

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林

杨倩, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
杨倩, 女, 1970-11-06, 广西桂平人, 汉族, 1999年毕业于西安医科大学, 获硕士学位, 目前在西安交通大学第一医院攻读传染病专业博士研究生, 主要从事传染病临床与基础研究工作。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Cloning and identification of NS5ATP2 gene and its spliced variant transactivated by hepatitis C virus non-structural protein 5A

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

Qian Yang, Jun Cheng, Yan Liu, Yuan Hong, Jian-Jun Wang, Shu-Lin Zhang, Department of Infectious Disease, The First Hospital of Xi' An Jiaotong University, Xi' An 710061, China

Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To clone and identify a new gene NS5ATP2 and its spliced variant transactivated by hepatitis C virus non-structural protein 5A.

METHODS: On the base of subtractive cDNA library of genes transactivated by NS5A protein of hepatitis C virus, the coding sequence of new gene and its spliced variant were obtained by bioinformatics methods. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify NS5ATP2 gene.

RESULTS: The coding sequence of new gene and its spliced variant were cloned and Identification successfully.

CONCLUSION: A novel gene has been recognized as the

new target transactivated by HCV NS5A protein. These results bring some new clues for studying the biological functions of the new gene and pathogenesis of the viral proteins.

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Hong Y, Wang JJ, Zhang SL. Cloning and identification of NS5ATP2 gene and its spliced variant transactivated by hepatitis C virus non-structural protein 5A. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):801-804

摘要

目的: HCV NS5A 病毒蛋白反式激活作用的新的靶基因 NS5ATP2 及其不同剪接体基因序列的确立、克隆化研究。

方法: 依据我室构建的 NS5A 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 利用生物信息学技术获得, 提取 HepG2 细胞的总 RNA, 进行反转录(RT-PCR), 扩增产物与原核表达载体连接, 进行测序鉴定。

结果: 经测序鉴定成功获得新基因的编码序列, 并意外发现了 NS5ATP2 的不同剪接体, 对 NS5ATP2 基因组进行分析, 获得剪接体的编码序列, 并成功进行了克隆化研究。

结论: 利用分子生物信息学技术, 发现并鉴定了 HCV NS5A 反式激活作用的新的靶基因 NS5ATP2(615) 及其可变剪接体 NS5ATP2(216), 为研究新基因的生物学功能及丙肝发病机制提供新的依据。

杨倩, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因2基因组 DNA 结构分析及其不同剪切体的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):801-804

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/801.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是含外膜蛋白的单股正链 RNA 病毒, 属黄病毒科肝炎病毒类。在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌^[1-4]。在体外实验中证实 NS5A 对细胞周期及细胞生长具有调节作用, 可能与慢性肝炎、肝细胞癌的发生发展有着密切的关系^[5-6]。我室利用抑制性消减杂交技术, 对于 NS5A 表达载体转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究, 发现了 NS5A 蛋白可以反式激活一些基因的表达。其中包括未知功能基因, 命名为 NS5ATP2^[7-10]。我们对其进行了克隆

化研究，成功获得了NS5ATP2的编码序列，在此过程中我们意外发现了NS5ATP2基因的不同剪切体，对NS5ATP2基因组进行分析，确定了该基因剪切体的编码序列，并进行了克隆化研究。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料和试剂 肝母细胞瘤细胞系HepG2和感受态大肠杆菌DH5 α 为本室保存，Taq酶购自Promega公司，pGEM-T载体购自Promega公司。玻璃奶回收试剂盒购自博大公司。DNA序列测定由上海申友公司完成。

1.2 NS5ATP2基因序列的确定 利用抑制性消减杂交技术构建NS5A反式激活基因差异表达的cDNA消减文库，挑选90个克隆测序，与GenBank数据库进行初步比较。15个克隆未检索到任何对应的相似序列，可能代表了某些新基因。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NS5ATP2。对NS5ATP2进行电子拼接，发现其开放读码框长615 bp，编码207氨基酸残基^[11-13]。

1.3 多聚酶链反应(PCR)扩增NS5ATP2基因 根据NS5ATP2的全长编码基因，设计上下游引物。上游引物5'-GGA TTC ATG GCT TCG GTC TCC TCT GC-3'，下游引物5'-GGT ACC TCA GGA GTG TGG CTC ACT GG-3'。以反转录产物为模板进行PCR，PCR参数如下：94℃ 2 min 预变性，94℃ 60 s 变性，60℃ 60 s 退火，72℃ 60 s 延伸，共35个循环，72℃再延伸10 min。

1.4 基因克隆化 克隆目的片段 将PCR产物在0.9%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18 h。挑取白色菌落，增菌。提取质粒进行限制性酶切分析鉴定，发现两个大小不一致的酶切片段，挑选相应菌落送测序。

1.5 生物信息学分析 将测序得到的两个核苷酸序列进行分析，其中一个与我们预测的NS5ATP2序列完全一致，而另一个序列与NS5ATP2部分同源，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)进行搜索，确定了两个序列的染色体定位，并对其基因组进行了分析。

2 结果

2.1 目的基因的PCR扩增 以HepG2细胞系cDNA文库为模板，PCR反应后经0.9%琼脂糖凝胶电泳，可见

长度为615 bp和500 bp的两种电泳条带，见图1。PCR产物与T-载体连接，转化大肠杆菌，提取质粒进行酶切鉴定，结果见图2。

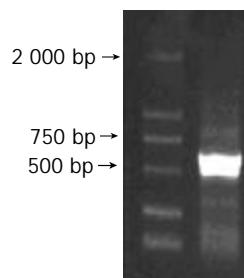


图1 NS5ATP2 PCR电泳图。

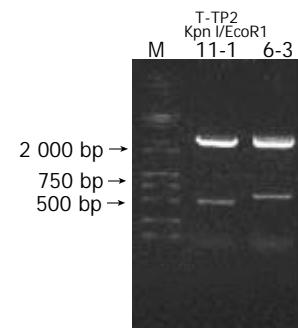


图2 pGEM-T-NS5ATP2酶切电泳图。

2.2 不同剪切体的发现 将连接两个不同大小片段的质粒进行测序，其中一个结果完全符合NS5ATP2的拼接序列，编码序列全长为615 bp，表明我们已顺利得到NS5ATP2基因编码序列。同时我们测序得到另一个与NS5ATP2部分同源序列，测序全长为513 bp，利用生物信息学技术推断其编码序列为219 bp。

2.3 将NS5ATP2(615 bp)与NS5ATP2(513 bp)编码序列进行比较，结果见图3：

615	ATG	GCT	TCG	GTC	TCC	TCT	GCG	ACC	TTC	TCG
513	ATG	GCT	TCG	GTC	TCC	TCT	GCG	ACC	TTC	TCG
615	GGC	CAC	GGG	GCT	CGG	TCC	CTA	CTG	CAG	TTC
513	GGC	CAC	GGG	GCT	CGG	TCC	CTA	CTG	CAG	TTC
615	CTG	CGG	CTG	GTA	GGG	CAG	CTC	AAG	AGA	GTC
513	CTG	CGG	CTG	GTA	GGG	CAG	CTC	AAG	AGA	GTC
615	CCA	CGA	ACT	GGC	TGG	GTA	TAC	AGA	AAT	GTC
513	CCA	CGA	ACT	GGC	TGG	GTA	TAC	AGA	AAT	GTC
615	CAG	AGG	CCG	GAG	AGC	GTT	TCA	GAT	CAC	ATG
513	CAG	AGG	CCG	GAG	AGC	GTT	TCA	GAT	CAC	ATG
615	TAC	CGG	ATG	GCA	GTT	ATG	GCT	ATG	GTG	ATC
513	TAC	CGG	ATG	GCA	GTT	ATG	GCT	ATG	GTG	ATC
615	AAA	GAT	GAC	CGT	CTT	AAC	AAA	GAC	CGA	TGT
513	AAA	GAT	GAC	CGT	CTT	AAC	AAA	GAC	C-----	-

615 GTA CGC CTA GCC CTG GTT CAT GAT ATG GCA
513 -----

615 GAA TGC ATC GTT GGG GAC ATA GCA CCA GCA
513 -----

615 GAT AAC ATC CCC AAA GAA GAA AAA CAT AGG
513 -----

615 CGA GAA GAG GAA GCT ATG AAG CAG ATA ACC
513 ----- GG AAG CTA TGA

615 CAG CTC CTA CCA GAG GAC CTC AGA AAG GAG
615 CTC TAT GAA CTT TGG GAA GAG TAC GAG ACC
615 CAA TCT AGT GCA GAA GCC AAA TTT GTG AAG
615 CAG CTA GAC CAA TGT GAA ATG ATT CTT CAA
615 GCA TCT GAA TAT GAA GAC CTT GAA CAC AAA
615 CCT GGG AGA CTG CAA GAC TTC TAT GAT TCC
615 ACA GCA GGA AAA TTC AAT CAC CCT GAG ATA
615 GTC CAG CTT GTT TCT GAA CTT GAG GCA GAA
615 AGA AGC ACT AAC ATA GCT GCA GCT GCC AGT
615 GAG CCA CAC TCC TGA

图3 NS5ATP2(615 bp)与 NS5ATP2(513 bp)编码序列比较.

2.4 生物信息学分析 登录美国国立卫生院(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)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，确定 NS5ATP2 (615 bp)与 NS5ATP2(513 bp)的染色体定位，并进行比较分析。发现二者均定位于 6q22.1-23.3，但内含子和外显子结构不同，NS5ATP2(615 bp)基因位于 123 630-97 844 nt, NS5ATP2 (513 bp) 基因位于 123 630-122 235 nt, 见图 4, 5:

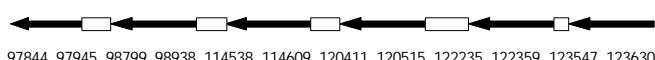


图4 NS5ATP2(615)基因结构示意图.(←外显子 □内含子).

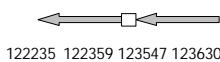


图5 NS5ATP2(513 bp)基因结构示意图.(←外显子 □内含子).

3 讨论

人类基因组的精细完整序列图谱公布，是人类生命科学史上的重要的里程碑，基因组序列的阐明能从根本上影响我们对生物学的认识和对医学的实践。利用基因组 DNA 序列可以为科研提供很多方面的方便，这些基因组序列可以用来帮助寻找新基因^[14]。人类基因大约有 25 000-35 000 条，通过与基因组序列的对比，我们还能发现基因不同的剪切形式，为进一步实验验证提供信息^[15-18]。一个基因可以通过如下几种方式产生多个转录体，如不同的转录起始位点，可变剪接，选择不同的加尾信号位点，RNA 编辑等。可变剪接包括 3 种类型：(1) 内含子的保留；(2) 可变外显子的保留或切除；(3) 3' -

和 5' - 剪接位点的转移(shift)导致外显子的增长或缩短^[19-21]。可变剪接是从相对简单的基因组提高蛋白质组多样性的重要机制，蛋白质组的多样性与多细胞高等生物的复杂性相适应。从可变剪接涉及的基因分布格局分析，可变剪接多发生在参与信号传导和表达调节等复杂过程的基因上，如受体，信号传导通路(凋亡)，转录因子等^[22-26]。对个体分化发育和一些关键的细胞生理过程如凋亡、细胞兴奋等的精确调控有重要意义^[27-29]。一个基因通过可变剪接产生多个转录异构体，各个不同的转录异构体编码结构和功能不同的蛋白质，他们分别在细胞 / 个体分化发育不同阶段，在不同的组织，有各自特异的表达和功能。因此，可变剪接是一种在转录后 RNA 水平调控基因表达的重要机制^[30]。

我室在进行病毒性肝炎发病机制的研究过程中，利用抑制性消减杂交技术、酵母双杂交技术、酵母单杂交技术、基因芯片技术，筛选出乙型肝炎、丙型肝炎病毒蛋白反式激活的新基因、与病毒蛋白 - 蛋白相结合的新基因，如 NS5A-TP4、NS5A-TP6、HCBP6、SPBP1 等，在对上述基因进行功能研究的过程中，我们发现这些新基因与细胞信号传导、细胞生长、癌基因及抑癌基因的表达有着密切的联系，为研究病毒性肝炎的发病机制提供了新的方向、新的线索^[31-34]。NS5A 是非结构蛋白的一种，目前认为 NS5A 蛋白是在细胞蛋白激酶作用下发生磷酸化修饰后发挥生物调节作用的。近年研究发现，NS5A 是转录反式激活因子，其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸，这是真核细胞转录因子特有的结构特征。尽管 NS5A 蛋白是存在于胞质中，但其具有功能性核定位信号(nucleic localization signal, NLS)序列，即 PPRKKRVV(354-362 aa)，因此有核信号转导功能^[35-36]。为进一步研究其对细胞基因表达的调节作用，我室利用抑制性消减杂交技术筛选出 HCV NS5A 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库，对挑选的克隆进行分析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。将该未知功能基因命名为 NS5ATP2。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，TP2 的 ORF 长度为 615 bp，编码 204 个氨基酸残基。根据这一序列设计引物，以人肝癌细胞 cDNA 为模板，PCR 反应扩增 TP2 基因序列。在 NS5A-TP2 基因的克隆化研究过程中，随机挑选的两个克隆进行酶切鉴定时，凝胶电泳得到 600 bp 和 500 bp 两个 DNA 片段，将相应的克隆进行测序，其中一个克隆序列与 NS5A-TP2 推定序列完全一致，表明我们已顺利得到 NS5A-TP2，另一个克隆序列测序全长为 513 bp 与 TP2 部分同源，登录美国国立卫生院(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)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，确定 NS5ATP2(615 bp)与 NS5ATP2(513 bp)的染色体定位，并进行比较分析。发现二者均定位于 6q22.1-23.3，NS5ATP2(615 bp)基因位于 123 630-97 844 nt, NS5ATP2

(513 bp) 基因位于 123 630-122 235 nt, NS5ATP2(615 bp)与NS5ATP2 (513 bp)是由同一基因编码的不同剪切体. 对NS5ATP2 (513 bp)进行生物信息学分析推定该基因的开放读码框架为216 bp, 编码72个氨基酸, 我们根据其开放读码框架将 NS5ATP2 (513 bp)重新命名为 NS5ATP2 (216 bp). 得到 NS5ATP2 基因及其剪切体的编码序列, 是该基因的生物学研究的第一步, 对其进行深入的研究为丙型肝炎的发病机制的研究提供了新的研究方向^[37].

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83-88
- 2 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 3 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
- 4 成军, 张玲霞. 抗 HCV 的基因治疗方案 - 从 HCV - 肝细胞相互作用的分子生物学机制设计. 国外医学·流行病学传染病学分册 1999;26:59-61
- 5 Gong GZ, Waris G, Tanveer R. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 6 Ghosh AK, Steele R, Meyer K. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 7 Diachenko L, Lau YC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization:a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6025-6030
- 8 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
- 9 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 10 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
- 11 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
- 12 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
- 13 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. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:258-250
- 14 Mount SM. Genomic sequence, splicing, and gene annotation. *Am J Hum Genet* 2000;67:788-792
- 15 Aznarez I, Chan EM, Zielenski J, Blencowe BJ, Tsui LC. Characterization of disease-associated mutations affecting an exonic splicing enhancer and two cryptic splice sites in exon 13 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Mol Genet* 2003;12:2031-2040
- 16 Pennacchio LA. Insights from human/mouse genome comparisons. *Mamm Genome* 2003;14:429-436
- 17 Austin CP. The completed human genome: implications for chemical biology. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:511-515
- 18 Tran P, Leclerc D, Chan M, Pai A, Hiou-Tim F, Wu Q, Goyette P, Artigas C, Milos R, Rozen R. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome* 2002;13:483-492
- 19 Slaugenhoupt SA. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene. *Clin Auton Res* 2002;12 (Suppl 1):I15-I19
- 20 Stiles JK, Hiccock PI, Shah PH, Meade JC. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in Leishmania. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;93:781-807
- 21 O'Neill JP, Rogan PK, Cariello N, Nicklas JA. Mutations that alter RNA splicing of the human HPRT gene: a review of the spectrum. *Mutat Res* 1998;411:179-214
- 22 Verma M, Kurl RN, Blass C, Davidson EA. RNA-RNA interaction and gene splicing. *Cancer Biochem Biophys* 1997;15: 211-220
- 23 Kornblith AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A, Werbajh S, Muro AF. The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J* 1996;10:248-257
- 24 Smith CW, Patton JG, Nadal-Ginard B. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu Rev Genet* 1989;23:527-577
- 25 Benjamin PR, Burke JF. Alternative mRNA splicing of the FMRFamide gene and its role in neuuropeptidergic signalling in a defined neural network. *Bioessays* 1994;16:335-342
- 26 Jiang Z, Tang H, Havlioglu N, Zhang X, Stamm S, Yan R, Wu JY. Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta. *J Biol Chem* 2003;278:18997-19007
- 27 Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Epp L, Lu DW, Johanning GL. Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* 2003;22:1528-1535
- 28 Logette E, Wotawa A, Solier S, Desoche L, Solary E, Corcos L. The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. *Oncogene* 2003;22:935-946
- 29 Trott JF, Hovey RC, Koduri S, Vonderhaar BK. Alternative splicing to exon 11 of human prolactin receptor gene results in multiple isoforms including a secreted prolactin-binding protein. *J Mol Endocrinol* 2003;30:31-47
- 30 Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, Oliver A, Varela JM, Jariego C. Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. *Clin Genet* 2002;62:181-188
- 31 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 邵得志, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因. 中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:51-54
- 32 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. 中西医结合肝病杂志 2003;11: 920-924
- 33 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 34 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
- 35 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
- 36 Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 1996;182:203-211
- 37 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

乙型肝炎病毒E抗原结合蛋白E-19的猴同源基因的克隆化与序列分析

吴煜, 成军, 陆荫英, 王琳, 刘妍, 张健, 李克

吴煜, 成军, 陆荫英, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
吴煜, 女, 1968-11-02生, 黑龙江人, 主治医师, 军医进修学院内科传染病专业 2001级硕士学位研究生, 主要从事传染病临床及病毒性肝炎的基础研究。国家自然科学基金资助项目, 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: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Identification and sequence analysis of a *Macaca fascicularis* homologous gene to human hepatitis B virus e antigen binding protein E-19

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

Yu Wu, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To explore the biological and immunoregulatory functions of hepatitis B e antigen (HBeAg) which is a secreted nonparticulate version of the viral nucleocapsid hepatitis B core antigen (HBcAg), yeast-two hybrid technique was performed to seek proteins in hepatocytes interacting with HBeAg and a novel gene named as E-19 was identified. To clone E-19 homologous gene from different species, a *Macaca fascicularis* homologous gene E-19 was identified by bioinformatics.

METHODS: HBeAg bait plasmid was constructed and transformed into yeast AH109 (a type). AH109 was mated with yeast cells Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2 \times YPD medium. Plasmid of true positive blue colonies were extracted and analyzed by DNA sequencing and a new human gene E-19 was identified. A *Macaca*

fascicularis homologous gene E-19 was identified by bioinformatics methods.

RESULTS: A *Macaca fascicularis* homologous gene E-19 was identified by bioinformatics. The *Macaca fascicularis* homologous gene E-19 was consisted of 378 nt and encoded a protein of 125 aa.

CONCLUSION: Human gene E-19, a HBeAg interacting proteins in hepatocytes, is successfully cloned by yeast-two hybrid technique and a *Macaca fascicularis* homologous gene E-19 is identified by bioinformatics.

Wu Y, Cheng J, Lu YY, Wang L, Liu Y, Zhang J, Li K. Identification and sequence analysis of a *Macaca fascicularis* homologous gene to human hepatitis B virus e antigen binding protein E-19. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):805-808

摘要

目的: 乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)对HBV的感染和复制都不是必须的, 普遍认为他与HBV引起免疫耐受, 免疫系统功能障碍有关。应用酵母双杂交技术我们克隆了人肝细胞cDNA文库中与HBeAg相互作用蛋白的基因E-19, 应用生物信息学技术克隆猴的E-19同源基因。

方法: 应用酵母双杂交系统3, 将多聚酶链反应(PCR)法扩增的HBeAg基因连接入酵母表达载体pGBT7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人肝cDNA文库质粒pACT2的酵母细胞Y187进行配合, 提取阳性菌落并测序, 确定人E-19基因序列, 利用生物信息学技术克隆猴的E-19同源基因, 并进行编码产物的序列分析。

结果: 成功克隆出人的HBeAg结合蛋白新基因E-19。应用生物信息学技术, 确定克隆了猴E-19同源基因, 编码基因全长378 nt, 编码产物由125 aa组成。

结论: 成功克隆出人的HBeAg的肝细胞结合蛋白E-19基因, 并发现、确定了猴E-19的同源基因, 为研究E-19基因的结构与功能、表达与调控、生物学意义以及在病毒性肝炎发病机制中的作用奠定了基础。

吴煜, 成军, 陆荫英, 王琳, 刘妍, 张健, 李克. 乙型肝炎病毒E抗原结合蛋白E-19的猴同源基因的克隆化与序列分析. 世界华人消化杂志 2004;12(4):805-808
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/805.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染的慢性化机制是目前乙型肝炎

研究领域中的重要课题，虽然涉及多方面的因素，其中之一就是与HBeAg的免疫学调节作用有关。HBeAg在慢性乙型肝炎发病机制中的作用和分子生物学机制目前还不十分清楚^[1-3]。HBeAg可阻断细胞毒性T淋巴细胞优先清除对HBcAg特异的Th1细胞及Th1细胞介导的抗-HBc抗体反应，使免疫应答转换为Th2细胞亚型，使HBV逃避免疫清除，感染慢性化^[4-7]。为了阐明HBeAg在慢性乙型肝炎发病机制中的作用，必须首先阐明在肝细胞中HBeAg结合的肝细胞蛋白类型，我们应用酵母双杂交技术，从肝细胞的cDNA文库中筛选到一个HBeAg的结合蛋白新基因，命名为E-19，为了寻找不同种属生物的E-19同源基因，我们利用生物信息学技术，鉴定、克隆了猴E-19基因，对于其基因和编码产物序列进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料 AH109酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4[△], gal80[△], LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lac Z MEL1)、预转化的cDNA肝文库(Y187)、pGBK7-BD、pGADT7-AD克隆载体及酵母YPD培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade等培养基、X- α -gal购于Clontech公司。大Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、Eco R I和Pst I购于Takara生物公司。IPTG及X- α -Gal及pGEM-T载体、RT-PCR试剂盒购于Promega公司。HBeAg扩增引物(P1 5'-GAA TTC ATG CAA CTT TTT CAC CTC TG -3', p2 5'-CTG CAG GCC CCA AAG CCA CCC AAG GC-3', 新基因E-19扩增引物(P3 5'-GAA TTC ATG TCA TGG ACA CCC ACC TC -3', P4 5'-GGA TCC AGA AAG AAA CAG GGT GAG GG -3'由合成及DNA测序由上海博亚公司承担。

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交筛选 PCR扩增HBeAg基因与pGBK7载体连接构建表达载体，转染酵母细胞AH109并培养至 $1 \times 10^{12}/L^{-1}$ ，与1ml(1×10^6)的肝文库酵母细胞配合，生长6-18d后挑取真阳性菌落。应用逆转录RT-PCR扩增人E-19基因的全序列。

1.2.2 猴E-19基因的克隆化 以人的HBeAg结合蛋白E-19基因序列作为参照，应用在线核苷酸序列同源性的比对软件(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)，对于核苷酸数据库nr中收录的核苷酸序列进行同源性比对，并确定猴E-19的同源基因。

2 结果

2.1 pGBK7-HBeAg重组诱饵质粒的构建及表达 成功扩增出HBeAg基因片段，连接到pGBK7载体中酶切鉴定结果正确。诱饵质粒转化酵母AH109株。

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

X- α -半乳糖(X- α -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落，在GenBank中寻找同源序列。

2.3 新基因全序及表达载体的克隆及重组结果 RT-PCR方法成功克隆出人E-19新基因的完整序列，大小为351 bp，GenBank注册号AF529373(图1)。

2.4 人E-19猴同源基因的克隆化 利用生物信息学技术，发现、确定了猴E-19的同源基因，为研究E-19基因的结构与功能、表达与调控、生物学意义以及在病毒性肝炎发病机制中的作用奠定了基础(图2)。

2.5 人与猴E-19基因序列及编码产物序列的比较 人与猴E-19基因序列的比较，有13 nt位点的核苷酸序列不同，同源性为96.56%(365/378)；人与猴E-19基因编码产物序列的比较，有6 aa位点的氨基酸残序不同，同源性为95.20%(119/125)。另外，人与猴E-19基因序列及编码产物序列的比较，在人E-19基因序列的255-256 nt之间，猴E-19基因中有一段27 nt的核苷酸序列的插入，即猴E-19蛋白中有一段9 aa的氨基酸残基序列的插入，但是这种变化的生物学意义需要进行深入的研究(图3, 4)。

```

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

```

图1 人E-19新基因序列(GenBank号：AF529373)。

```

1 ATGTCATGGACACCCACCTCTTGTCTCGCGCCCTCGGTGATGGC
M S W T P T S C S C G L G D G
46 ATAGGT CAC ATT TTG GGAGT CAG AGG AGG CCT ACA AGG GCA AGG
I G H I L R V Q R R P T R A R
91 TCAGATGGCAGAGCAAGGTTGGTCTCAGGGCCTCACTAACGCCCTT
S D G R A R L V L R A S L S L
136 AGGGCCCTCCCTCTCCCTGGCCTTGCTGTTGGTAGCTGTCACT
R A P P L L G L G C L V S C H
181 CTCCCCTACTAGGGCCTCTGCTCTATGCTATTCCCTCAGGCCAG
L P L R A S A L C L F P S S Q
226 ACTAGCAGATGGGCCTCCCCCTACCCCTACTTTGCTGGCA
T S R W G L P P T P T F C M A
271 GCAGGTACCCCTGAGGACAAGGACAAGGCCCTGGCCAGTCACT
A G T P E D K D K P L G Q F S
316 GTTCCCCTGCTCTCCCTGGCAGCCTCTCTTGAGGCCCTCA
V P M L L P W A A S L L S P S
361 CCCTGTTCTTGTGA 378
P C F F L *

```

图2 E-19的猴同源基因序列及其编码产物。

人 ATGTCATGGACACCCACCTCTTGTCCCTGCAGCCTCGGTGATGGC
 猴 ATGTCATGGACACCCACCTCTTGTCCCTGCAGCCTCGGTGATGGC
 人 ATAGGTACATTTGGGAGTTAGAGGAGGCCTACAAGGGCAAGG
 猴 ATAGGTACATTTGAGAGTTAGAGGAGGCCTACAAGGGCAAGG
 人 TCAGATGGCAGAGCAAGGTTGGCCTCAGGGCCTCTAAGCCT
 猴 TCAGATGGCAGAGCAAGGTTGGCCTCAGGGCCTCACTAAGCCT
 人 AGGGCCCTCCTCTCCTGGCCTGGCTGTTGGTTAACTGTCAC
 猴 AGGGCCCTCCTCTCCTGGCCTGGCTGTTGGTTAGCTGTCAC
 人 CTTCCACTCAGGGCCTCTGCTCTATATCTATTCCCTCCAGCCAG
 猴 CTCCCACCTCAGGGCCTCTGCTCTATGTCTATTCCCTCCAGCCAG
 人 ACTGGCAGATGGGGCTCCCCCTACCCCT-----
 猴 ACTAGCAGATGGGGCTCCCCCTACCCCTACTTTGCATGGCA
 人 -----GAGGATGAGGACAAGCCCTCGGCCAGTCAGC
 猴 GCAGGTACCCCTGAGGACAAGGACAAGCCCTGGCCAGTCAGT
 人 GTTCCCGTGCTTCTCCCTGGCAGCCTCTCTTGAAGCCCTCA
 猴 GTTCCCAGTGTCTCCCTGGCAGCCTCTCTTGAAGCCCTCA
 人 CCCTGTTCTTCTGTGA
 猴 CCCTGTTCTTCTGTGA

图 3 人和猴 E-19 基因核苷酸序列的比较.

人 MSWPTSCSGLGDIGHILGVQRRPTRAR
 猴 MSWPTSCSGLGDIGHILRVQRRPTRAR
 人 SDGRARLVLRASLSLRAPPLGLGCLVNCH
 猴 SDGRARLVLRASLSLRAPPLGLGCLVSCH
 人 LPLRASALYLFPSQTGRWGLPPTP-----
 猴 LPLRASALCLFPSSQTSRWGLPPTFCMA
 人 -----EDEDKPLGQFSVPVLLPWAASLLSPS
 猴 AGTPEDKDKPLGQFSVPMLLPWAASLLSPS
 人 PCFFL*
 猴 PCFFL*

图 4 人和猴 E-19 基因编码蛋白序列的比较.

3 讨论

全世界有 3.5 亿人处于 HBV 慢性感染状态, 其中有相当部分要发展为肝硬化、肝细胞癌^[8-14]. HBV 感染之后, 一部分患者转为慢性感染, 而另一部分患者可以自愈. 关于 HBV 感染者自愈的机制以及影响因素等始终是人们关注的焦点, 试图通过比较 HBV 感染之后不同的结局之间的差别, 阐明 HBV 感染慢性化的免疫学机制和分子生物学机制, 但是到目前为止, 关于 HBV 感染慢性化的分子生物学机制仍然不十分清楚. HBV 感染后

的结局, 一方面取决于病毒的因素, 更重要的是取决于 HBV 感染者的免疫学状态和反应机制^[15-24]. 长期以来, HBeAg 的免疫学调节作用在 HBV 慢性感染的形成过程中的重要地位成为人们关注的一个关键环节, 但是具体的机制还不清楚. 为了发现 HBeAg 在 HBV 感染慢性化中的可能的意义和机制, 我们利用研究蛋白-蛋白相互作用的酵母双杂交技术, 对于 HBeAg 在肝细胞中结合的蛋白类型进行了细致有效的筛选, 从中发现了一些有益的线索. 其中发现的 HBeAg 结合蛋白 E-19 是一种从来没有研究报道的新基因类型, 关于 E-19 基因的结构与功能、表达与调控、生物学意义以及在病毒性肝炎发病机制中的作用还不清楚, 需要进行系统、深入的研究. 为了研究不同种属的 E-19 基因的结构和功能, 我们利用生物信息学技术, 克隆、鉴定了猴 E-19 的同源基因. 除了与人 E-19 基因序列和编码产物序列具有高度的同源性之外, 在猴 E-19 基因中还发现了一段 27 nt 的 DNA 片段的插入, 其生物学意义有待于进一步的研究证实.

不同种属生物的基因克隆化以及不同种属生物的基因组计划的开展, 积累了大量的不同种属生物的基因核苷酸序列, 形成了一个庞大的数据库, 同时为了配合这些核苷酸序列的分析建立了功能强大的计算机分析软件. 核苷酸数据库的建立和计算机分析技术的结合, 开辟了生物学研究的新的领域, 并逐渐形成了生物信息学(bioinformatics)新兴学科^[25-26]. 生物信息学理论和技术的出现, 极大地加速了基因的分子生物学的发展, 同时为生命科学提供了前所未有的新的机遇. 目前生物信息学技术已然成为基因的分子生物学领域不可或缺的技术手段, 甚至在当今时代, 仅从核苷酸序列数据库的分析入手, 就可以获得大量有价值的信息, 甚至可以直接鉴定、克隆新的基因. 根据不同种属生物基因序列高度同源性的原理, 应用生物信息学技术克隆鉴定新的基因的研究结果越来越多, 已经成为基因的分子生物学领域的重要环节. 我们曾经应用分子生物学与生物信息学的原理和技术, 应用核苷酸数据库结合计算机分析技术, 克隆了利什曼原虫的表面蛋白基因新基因^[27-31]. 同时, 我们在克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白人 HCBP6 基因的同时, 利用分子生物学技术和生物信息学技术相结合的方法, 克隆了不同种属的 HCBP6 的基因序列, 本文同样利用分子生物学技术和生物信息学技术相结合的原理, 克隆、鉴定了猴 E-19 的编码基因, 所有这些研究结果充分说明了生物信息学技术在现代基因的分子生物学研究领域的重要作用和地位^[32-38]. E-19 基因不同生物种属同源基因序列克隆化成功和结构的比较, 必将促进对于 E-19 新基因结构和功能的研究和认识, 最终为阐明 HBV 感染的发病机制做出贡献.

4 参考文献

- Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to

- the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-2021
- 2 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:218-222
- 3 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:178-187
- 4 Wan K, Tang S, Gong H. Relationship between T cell subgroups and HBV markers in the patients with chronic hepatitis B. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 1999;24:590
- 5 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
- 6 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral Res* 2001;52:99-111
- 7 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
- 8 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 9 Nagpal S, Ghosn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 10 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 11 Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, Kajiyama Y, Takeda Y, Higashi S, Hamasaki K, Nakao K, Nakata K, Eguchi K. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:2663-2668
- 12 Miranda J, Cabezas C. Hepatitis B among health workers. *Rev Gastroenterol Peru* 2001;21:128-135
- 13 Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-486
- 14 Marx G, Martin SR, Chicoine JF, Alvarez F. Long-term follow-up of chronic hepatitis B virus infection in children of different ethnic origins. *J Infect Dis* 2002;186:295-301
- 15 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002;76:8609-8620
- 16 Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin-alpha1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002;9:280-287
- 17 Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
- 18 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Nondeletional T-cell receptor transgenic mice: model for the CD4(+) T-cell repertoire in chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2000;74:7587-7599
- 19 Jiang R, Lu Q, Hou J. Polarized populations of T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2000;80:741-744
- 20 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and eantigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- 21 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
- 22 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
- 23 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 24 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 25 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
- 26 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
- 27 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
- 28 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
- 29 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 巴西利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. 寄生虫与医学昆虫学报 2000;7:193-197
- 30 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
- 31 成军, 钟彦伟, 刘妍, 杨继珍, 董菁. 亚马逊利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. 中国地方病杂志 2001;20:175-177
- 32 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
- 33 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
- 34 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
- 35 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
- 36 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
- 37 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
- 38 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

HCBP6对HCV核心蛋白反式激活作用的影响

成军, 李克, 刘妍, 王琳, 陆荫英, 钟彦伟

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

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, 1994-11-17/1997-12-01美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病科完成博士后研究。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400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、《热带病与寄生虫病杂志》副主编、《中华肝脏病杂志》、《World J Gastroenterol》编委等。国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674

军队九、五科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队十、五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队十、五科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Effects of HCBP6 protein on transactivating function of HCV core protein

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

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

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

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

Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To study the inhibitory effects of HCBP6 on the transactivating effect of HCV core protein.

METHODS: The recombinant vectors expressive HCV core protein and HCBP6 protein were constructed, respectively, by routine molecular techniques. The hepatoblastoma cell line HepG2 were co-transfected. The chloramphenicol transferase (CAT) expressive levels under the SV40 early promoter were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

RESULTS: The recombinant vectors of pcDNA3.1(-)-HCBP6 and pcDNA3.1(-)-core were constructed, and demonstrated correctly by restriction enzyme digestion and sequencing analysis. The hepatoblastoma cell line HepG2 was transfected with the vector alone or combined, respectively. The expression level of CAT indicated that the inhibitory rate was 40.4-62.3%.

CONCLUSION: The expression of HCBP6 has inhibitory

effects on the transacting activity of HCV core protein.

Cheng J, Li K, Liu Y, Wang L, Lu YY, Zhong YW. Effects of HCBP6 protein on transactivating function of HCV core protein. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):809-812

摘要

目的: 研究HCBP6蛋白在细胞内表达时, 是否通过蛋白 - 蛋白之间的相互作用, 对HCV核心蛋白的反式激活作用产生影响。

方法: 利用常规的分子生物学技术分别构建HCBP6蛋白和丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白的真核表达载体, 酶联免疫黏附法 enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测CAT的表达水平, 间接测定HCV核心蛋白对于SV40病毒即刻早期启动子的反式激活活性。

结果: 重组表达载体pcDNA3.1(-)-HCBP6、pcDNA3.1(-)-core 经过限制性内切酶作图分析和核苷酸序列分析证实正确无误。转染HepG2细胞之后, HCV核心蛋白的表达, 对于SV40病毒即刻早期启动子的转录表达活性具有显著的反式激活作用。但是, 当与HCBP6蛋白的表达载体进行共转染时, SV40病毒的即刻早期启动子的转录活性受到抑制。重复试验得到了相似的结果。HCBP6蛋白的表达对于HCV反式激活SV40病毒即刻早期启动转录活性的抑制率40.4-62.3%。

结论: HCBP6蛋白在细胞内的表达对HCV核心蛋白反式激活SV40病毒的即刻早期启动子的转录活性具有显著的抑制作用。

成军, 李克, 刘妍, 王琳, 陆荫英, 钟彦伟. HCBP6对HCV核心蛋白反式激活作用的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(4):809-812

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/809.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)是我们应用酵母双杂交(yeast-two hybrid)技术从肝细胞cDNA文库中筛选得到的一种与HCV核心蛋白能够结合的未知功能基因^[1-2]。他位于人22号染色体上的不含有内含子(intron)的基因。HCBP6蛋白也可能分布在细胞核膜的胞质侧, 其生物学功能与生物大分子细胞质 / 核之间的主动运输过程有关^[3-6]。HCBP6蛋白能够上调和下调一系列不同基因的表达水平^[7]。HCBP6蛋白对于新生多肽相关复合体α亚单位(NACA)的基因表达具有显著的上调

作用,提高4.75倍.HCBP6蛋白的表达的确对于NACA的启动子转录活性具有显著的上调作用^[8].因此,认为HCV的核心蛋白可能通过与HCBP6蛋白之间的结合,干扰细胞内正常的新生多肽的转运过程^[9-12].另外,HCV核心蛋白与HCBP6蛋白之间的结合,对于HCV核心蛋白的生物学活性也应该具有显著的影响,但是目前还缺乏这方面的研究资料.我们利用细胞共转染技术,证实HCBP6蛋白在细胞内的表达,可以抑制HCV核心蛋白对于SV40病毒即刻早期启动子的转录表达活性.

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen公司)、SV40病毒即刻早期启动子指导的CAT的报告基因表达载体pCAT3载体购自Promega公司,脂质体FuGENE6购自Roche公司,Taq DNA聚合酶购自鼎国生物公司,限制性内切酶购自Takara公司.质粒DNA提取试剂盒(Promega公司),玻璃奶DNA回收试剂盒(博大公司),CAT ELISA试剂盒(Roche公司).引物合成、核苷酸序列测序由上海博亚公司完成.E.coli DH5 α ,肝母细胞瘤细胞系HepG2为本室保存.pcDNA3.1(-)-HCBP6、pcDNA3.1(-)-core构建和鉴定见文献[7,13-15].

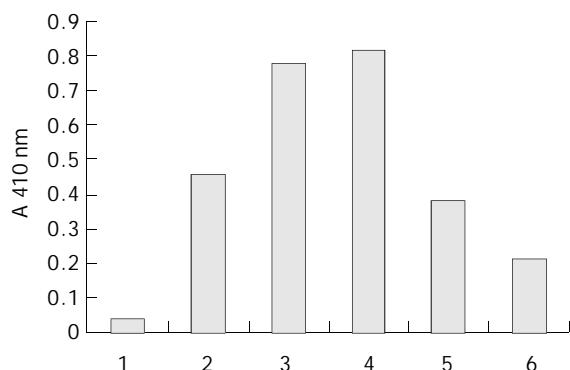


图1 HCBP6对HCV核心蛋白反式激活作用的影响. 1: pCAT3; 2: pCAT3 + pcDNA3.1(-)-Hcbp6; 3: pCAT3 + pcDNA3.1(-)-core; 4: pCAT3 + pcDNA3.1(-)-core + pcDNA3.1(-)-Hcbp6; 5: pCAT3 + pcDNA3.1(-)-core + pcDNA3.1(-)-Hcbp6.

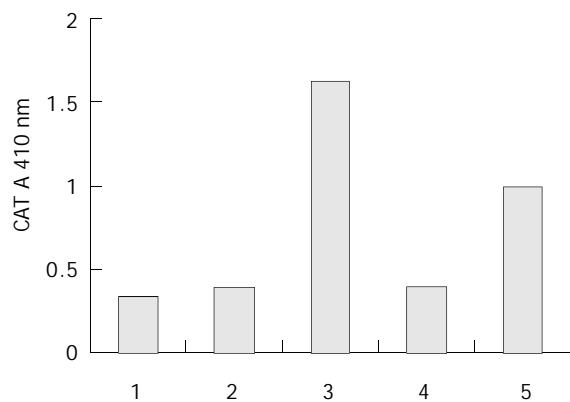


图2 肝母细胞瘤细胞系HepG2的共转染实验. 1: 对照 pCAT3-basic; 2: 空白 pcDNA3.1-; 3: HCV 核心; 4: HCBP6; 5: HCV 核心 + HCBP6.

1.2 方法 HepG2细胞系在含100mL/L小牛血清的DMEM培养液中生长.细胞生长至50-80%融合度时采用脂质体转染法,具体转染方法参照FuGENE6说明书进行,质粒转染48 h后收获细胞进行裂解,提取上清液,取200 μ L用于检测CAT的表达量.具体方法严格按照CAT ELISA试剂盒说明书进行,在415 nm光波下测吸光度A值^[16-20].

2 结果

利用重组表达载体的限制性内切酶作图分析和插入片段的核苷酸序列分析,证实构建的pcDNA3.1(-)-HCBP6、pcDNA3.1(-)-core表达载体正确^[7-13].由2人分别进行共转染实验.第一批实验中,发现HCV核心蛋白的表达对SV40即刻早期启动子的转录活性具有显著的反式激活作用.当与HCBP6蛋白的表达载体进行共转染时,对于HCV核心蛋白的反式激活作用具有显著的抑制作用,抑制率为62.3%(图1).第2批实验中,结果类似.HCV核心蛋白反式激活SV40即刻早期启动子的转录活性达到4.7倍,当与HCBP6蛋白的表达载体进行共转染时,对于HCV核心蛋白的反式激活作用具有显著的抑制作用,抑制率为40.4%(表1,图2).

表1 pCAT3 + pcDNA3.1(-)-core 和 pcDNA3.1(-)-Hcbp6 共转染实验

分组	报告质粒	转染质粒	CAT 酶 A 值	相对倍数
1	pCAT3-promoter	pCAT3-basic	0.345	1.0
2	pCAT3-promoter	pcDNA3.1(-)	0.395	1.0
3	pCAT3-promoter	pcDNA3.1(-)-core	1.629	4.7
4	pCAT3-promoter	pcDNA3.1(-)-HCBP6	0.402	1.0
5	pCAT3-promoter	pcDNA3.1(-)-core pcDNA3.1(-)-HCBP6	0.988	2.8

3 讨论

肝炎病毒蛋白的表达,对于肝细胞的基因表达谱具有显著的影响^[21-26].有些病毒蛋白具有细胞核内定位信号,通过不同的磷酸化修饰,发生细胞质到细胞核的转位,在细胞核内发挥其反式激活作用,这种细胞核内的反式激活作用,或者通过直接与肝细胞基因组DNA序列中的启动子结构结合,发挥转录调节作用;或者通过与细胞核内的相关的转录因子蛋白之间的结合,间接影响肝细胞基因组的转录表达^[27-49].但是,肝炎病毒蛋白的亚细胞定位更为主要的是在细胞质中分布,通过复杂的多环节的信号转导通路,间接对肝细胞基因组的转录表达发挥反式调节作用.肝炎病毒蛋白的反式激活经常会有共同的作用对象,发现一些共同的反式调节靶基因.2种技术同时发现的反式调节基因类型包括:MHBst调节原癌基因c-myc、HBxAg蛋白反式调节S-100钙结合蛋白A11、HCV NS3蛋白反式调节真核翻译延伸因子2(EEF2)、HCV NS5A蛋白反式调节新基因序

列NS3TP6等^[36].

利用报告基因的共转染技术, 我们首先证实了HCV核心蛋白的反式激活作用, 同时发现HBV和HCV反式激活作用的蛋白之间还具有显著的协同作用。我们也曾经利用酵母双杂交技术, 对于HCV核心蛋白的肝细胞内的结合蛋白进行筛选, 获得了一个新的未知功能基因, 命名为HCBP6^[1, 50-61]。除了酵母双杂交的筛选以及回交试验结果证实HCBP6蛋白与HCV核心蛋白之间具有结合作用之外, 我们还利用经典的免疫共沉淀技术证实了这2种蛋白在体外的相互结合^[57]。HCBP6蛋白与绿色荧光蛋白的融合蛋白的表达, 也提示HCBP6蛋白的亚细胞定位在细胞核膜的胞质侧^[3]。因为HCV核心蛋白具有反式激活作用, 在肝细胞内又能够与HCBP6蛋白结合, 因此, 我们推测HCBP6与HCV核心蛋白的结合, 应对于HCV核心蛋白的反式调节作用具有显著的影响。本文结果表明存在这样的生物学效应^[62-70]。目前我们正在研究HCV核心蛋白的反式激活作用, 以及HCBP6蛋白的表达对HCV核心蛋白反式激活作用进行抑制的信号转导途径。相信通过这些研究, 最终阐明HCV核心蛋白在慢性病毒性肝炎、肝纤维化、HCC发生发展中的作用和机制。

4 参考文献

- 1 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
- 2 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
- 3 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
- 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 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
- 6 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
- 7 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
- 8 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体α亚单位基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:959-962
- 9 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NS5ATP3转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004; 12:306-310
- 10 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
- 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 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
- 13 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
- 14 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
- 15 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
- 16 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 17 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒X基因在真核细胞中的表达及反式激活SV40病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 18 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒X基因异质性及其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002; 27:125-127
- 19 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其转录活性的影响. 解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 20 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV核心蛋白与截短型HBV表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 21 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
- 22 成军. 基因芯片技术的原理及其在肝病研究中的应用. 中华肝脏病杂志 2002;10:302
- 23 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型HBsAg中蛋白反式激活基因的克隆. 中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 24 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
- 25 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
- 26 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
- 27 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟劲松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因的克隆化研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:5-7
- 28 刘妍, 成军, 邵得志, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 李克, 李莉. HCV核心蛋白与HBV X蛋白协同反式激活作用的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:39-41
- 29 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
- 30 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
- 31 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5A反式激活基因NS5ATP13的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:260-262
- 32 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
- 33 刘敏, 成军, 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
- 34 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
- 35 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XTP3的克隆化研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:229-232
- 36 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
- 37 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. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:258-250

- 38 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
- 39 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
- 40 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
- 41 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
- 42 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
- 43 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
- 44 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
- 45 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
- 46 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
- 47 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
- 48 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
- 49 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
- 50 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
- 51 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
- 52 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
- 53 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
- 54 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
- 55 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
- 56 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
- 57 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
- 58 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
- 59 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
- 60 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. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:257-259
- 61 成军, 刘妍, 杨倩, 王建军, 洪源, 王琳. 乙型肝炎病毒对于 S100A11 信号转导的影响. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:193-196
- 62 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 e 抗原真核表达载体构建及在酵母中的表达. 临床肝胆病杂志 2003;19:166-168
- 63 Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus x protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* 2003;278:22071-22078
- 64 Goto T, Kato N, Yoshida H, Otsuka M, Moriyama M, Shiratori Y, Koike K, Matsumura M, Omata M. Synergistic activation of the serum response element-dependent pathway by hepatitis B virus x protein and large-isoform hepatitis delta antigen. *J Infect Dis* 2003;187:820-828
- 65 Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Haussinger D. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 2003;17:488-490
- 66 Ning Q, Berger L, Luo X, Yan W, Gong F, Dennis J, Levy G. STAT1 and STAT3 alpha/beta splice form activation predicts host responses in mouse hepatitis virus type 3 infection. *J Med Virol* 2003;69:306-312
- 67 Lin WJ, Li J, Lee YF, Yeh SD, Altuwaijri S, Ou JH, Chang C. Suppression of hepatitis B virus core promoter by the nuclear orphan receptor TR4. *J Biol Chem* 2003;278:9353-9360
- 68 Lara-Pezzi E, Gomez-Gaviro MV, Galvez BG, Mira E, Iniguez MA, Fresno M, Martinez-A C, Arroyo AG, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110:1831-1838
- 69 Mundt B, Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 2003;17:94-96
- 70 Petrusis JR, Kusnadi A, Ramadoss P, Hollingshead B, Perdew GH. The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem* 2003;278:2677-2685

丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白上调 NS3TP6 基因启动子表达活性的研究

洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军

洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
洪源 男, 1974-12, 福建省莆田市人, 汉族。1998年毕业于第四军医大学军医系, 获医学学士学位, 2003年毕业于解放军军医进修学院, 获得内科传染病学硕士学位, 主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Up-regulating effect of hepatitis C virus NS5A protein on NS3TP6 gene promoter

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

Yuan Hong, Qian Yang, Jun Cheng, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the regulatory effects of non-structural protein 5A of hepatitis C virus (HCV NS) protein on NS3TP6 gene promoter.

METHODS: The sequence of NS3TP6 gene promoter was identified in GenBank by bioinformatics and amplified from HepG2 genome by polymerase chain reaction (PCR), which was cloned into pCAT3 reporter vector. The HepG2 cell line was transfected by pCAT3-NS3TP6-p, and co-transfected by pCAT3-NS3TP6-p and pcDNA3.1(-)-NS5A, respectively. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity was detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

RESULTS: The recombinant vector of reporter gene expressive vector pCAT3-NS3TP6-p was approved correctly by restriction enzyme digestion and sequencing analysis. In the transfection experiment of HepG2, pCAT3-NS3TP6-p had higher activity of CAT expression than that of pCAT3-basic demonstrated by an ELISA kit. The expression level

of CAT in co-transfection of pCAT3-NS3TP6-p and pcDNA3.1(-)-NS5A was 1.87 times as higher as that of pCAT3-NS3TP6-p plasmid alone.

CONCLUSION: Cell transfection and ELISA technology are successfully used to prove the results from microarray of HCV NS5A, which brings some new clues for studying the trans-regulated and immune regulation mechanism of NS5A.

Hong Y, Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ. Up-regulating effect of hepatitis C virus NS5A protein on NS3TP6 gene promoter. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):813-816

摘要

目的: 探讨丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白5A(NS5A)对NS3TP6启动子转录的激活作用。

方法: 以我实验室前期研究中得到的HCV NS5A/NS3的基因表达谱芯片结果为基础, 利用生物信息学技术确定NS3TP6的启动子区域(NS3TP6-p), 聚合酶链反应(PCR)扩增NS3TP6-p, 克隆至真核报告载体pCAT3中, 构建pCAT3-NS3TP6-p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(-)-NS5A共转染HepG2细胞系, 用ELISA法检测CAT的表达活性。

结果: 限制性内切酶消化和序列分析结果表明, 构建的NS3TP6-p指导的报告基因表达载体pCAT3-NS3TP6-p正确无误。pCAT3-NS3TP6-p在HepG2细胞中能够启动CAT的表达; 共转染实验中pCAT3-NS3TP6-p+pcDNA3.1(-)-NS5A组CAT的表达活性是pCAT3-NS3TP6-p单独转染试验的1.87倍。

结论: 我室克隆的NS3TP6启动子有指导下游基因转录表达的活性; HCV的NS5A蛋白具有对NS3TP6基因启动子的转录具有反式激活作用。本实验进一步验证了我室利用基因表达谱技术研究HCV NS5A蛋白反式激活作用的结果, 为进一步阐明丙型肝炎病毒非结构蛋白5A的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

洪源, 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(4):813-816

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/813.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的

单股正链RNA病毒。在大多数感染人群中HCV表现为持续性感染，并可导致慢性肝炎、肝硬化，或肝细胞癌(HCC)，而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10]。HCV基因组含有单一的开放读码框架，编码3 010-3 033个氨基酸残基(aa)的多肽前体，两侧是5' - 非翻译区及3' - 非翻译区。因为HCV的基因复制形式没有经过DNA阶段，不存在HCV基因组与肝细胞基因组DNA的整合，所以，HCV主要是通过基因组编码蛋白和肝细胞蛋白之间的相互作用及肝细胞蛋白与HCV调节基因的相互作用造成对肝细胞的损伤。其中非结构蛋白NS5A具有多种生物学功能，在HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14]。研究表明，NS5A上存在干扰素α敏感决定区(ISDR)，与干扰素α治疗的敏感性相关^[15-16]；此外，NS5A还是一种作用很强转录激活因子^[17-21]，调控着细胞基因的转录，还包括对细胞周期及细胞生长的调节，并与感染HCV的细胞发生恶性转化过程有关。对于NS5A蛋白的反式调节功能，我实验室已证明他可以反式激活SV40早期启动子/增强子^[21]，并应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)和基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[24-26]等不同的技术对NS5A/NS3的反式调节基因进行了研究^[22-23]。为了对NS5A反式调节基因的筛选结果进行验证，我们选取了基因表达谱芯片得到的NS5A反式调节基因-NS3TP6为研究对象，利用生物信息学手段对NS3TP6上游调控序列进行分析、克隆，并与报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)构建表达质粒，与NS5A表达载体共转染，研究NS5A对NS3TP6启动子(promoter)是否具有激活作用，使下游CAT基因的表达增强，这一结果也为研究NS5A的信号传导途径提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌DH5α，肝母细胞瘤细胞系HepG2、pcDNA3.1(-)-NS5A，为本室保存。pGEM-T、pCAT3载体购自Promega公司，脂质体FuGENE6购自Roche公司，Taq DNA聚合酶购自鼎国生物公司，限制性内切酶购自Takara公司。质粒DNA提取试剂盒(Promega公司)，玻璃奶DNA回收试剂盒(博大公司)，CAT ELISA试剂盒(Roche公司)。引物合成、核苷酸序列测序由上海博亚公司完成。

1.2 方法

1.2.1 启动子结构分析 根据GenBank中NS3TP6基因组序列，确定NS3TP6的转录起始点，选取其上游1 000 bp，通过在线分析(<http://www.fruitfly.org>)预测其启动子活性区域。设计并合成引物，在上下游引物的5' - 端分别加上Kpn I和Xho I酶切位点序列。上游引物：5' - GGT ACC TTC TTG ACT TTT GGT GTC TTG-3'；下游引物：5' - CTC GAG CAG CAT TCA GTC TAC AAC CAG-3'。

1.2.2 质粒构建 PCR扩增NS3TP6启动子序列，玻璃奶纯化回收DNA片段，在T4 DNA连接酶的作用下，

与pGEM-T载体连接，转化大肠杆菌DH5α，挑取在选择平皿(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色阳性菌落提取质粒，经酶切(Kpn I/Xho I)及测序鉴定。Kpn I/Xho I双酶切重组质粒pGEM-T-NS3TP6-p，玻璃奶纯化回收酶切产物，定向克隆至pCAT3载体，构建成重组质粒pCAT3-NS3TP6-p。经双酶切及菌落PCR鉴定连接产物，试剂盒法提取质粒以备转染。

1.2.3 细胞培养及pCAT3-NS3TP6-p转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2细胞系在含10%小牛血清的DMEM培养液中生长。细胞生长至50-80%融合度时采用脂质体转染法，具体转染方法参照FuGENE6说明书进行，质粒pCAT3-NS3TP6-p转染48 h后收获细胞。

1.2.4 共转染实验 细胞生长至50-80%融合度时，质粒pCAT3-NS3TP6-p与pcDNA3.1(-)-NS5A共转染HepG2细胞系。具体转染方法参照FuGENE6说明书进行，转染48 h后收获细胞。

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

2 结果

2.1 NS3TP6启动子结构 根据GenBank中基因组序列，确定NS3TP6的转录起始点，选取其上游1 080 bp，其核苷酸序列见图1。对此序列进行分析发现有多个TATA盒及TATA样盒存在。

```

1   TCTTGACTTTGGTGTCTTG AAATAGAAGA TTATTTTGT ATGTATGTAT
51  CTACCTCACAGAAGTTATTG ATTTGGTGGAAAGAGCACTAG GAGTAGAGTC
101 AGAAAAGCTGGAAAAATCCTGCAGCTCC TTATATTTAACCTTTGCG
151 TATAGAATTATAACTAAATG AGTTCATTGA TTTGTGTGTG TAAAAGTGCT
201 TAGTACAATGCTAGACTTATCATTATCA ATAAATATCA TTCTTAAAC
251 TGACCATAAAATATTAGAA AAGTAGAATA TCTAGACAAT ATTITAGAAA
301 AAGGGAGCTTAAGAATTGGAAAATGTCA TTCACTGTCCAATGTCTG
351 CCAAGCTAAAGCTCTCACTACAGGGAGAGG TATAGTTAG ATGTTAGAGT
401 GTAAACCCAA TTTTTAATG TGGTCATAGTTAATTCTTATGCCCTG
451 CAATTGTTGAATTCACTAAAGCCTTTTTCATCCTGA AATTAAAAA
501 AATTATCTAG TGGTTCTTTTGCTTCA TGGATTCACT GTCTCAAAT
551 AAACCTTTGA ACTTTGGGAA ATTTATGCCA TATGAGGTTT GAGGTTTGA
601 CTCAACTTTTCCCATTAGATATACAGTTATGCCAACCTCTCATTGTA
651 TAAATGTACGGTTATTAAATTCAGAAACAATCACA ATATGTTATC
701 CTATTGGATACTAGTTACAA GTTTCTTTG TTTTATTAG ATTTCTGAAA
751 CTGATGAAAAAGAACGCTGCTGCATGAAA ACTGCTGATGCAAGATGAA
801 ATTGCCTGGCTCAGGCTGGAAAAAGACACA ATAAGAAACC AAAACCTGGA
851 AAATAAAACTTAAAGAATTGAAATGTGAAAGAACGCTGAAGAC
901 TTCAAAAGGCTTAAACGGAATGGGAAACATTAGCAAAACGATAGCC
951 TGTTACAGTGGACAGCTGCTGCTGACA GATGAAAACAACACGCTGCA
1001 TTCCAAAAGTGGAGAAGCAAAGAGAGTAGGCAAAGACTGGAAACAGAAA
1051 TGCAATCATGTGGTTGTAGACTGAATGCTG

```

图1 NS3TP6基因转录起始点上游序列。

2.2 在线分析 (<http://www.fruitfly.org>) 预测其启动子活性区域

Start End Score Promoter Sequence
639 689 0.90 cctctcattgtataatgtacgggttattttaaatccagaacaatca
2.3 重组质粒的构建 以 HepG2 基因组为模板, PCR 扩增 NS3TP6 启动子序列, 1 000 bp 处出现所需条带。将扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 双酶切鉴定, 并送测序鉴定正确。双酶切产物与 pCAT3 载体连接, 双酶切鉴定如图 2 所示(4 000 bp 的 pCAT3-basic 载体片段和 1 081 bp 的 NS3TP6 启动子片段), 连接转化生长的菌落进行 PCR 鉴定所示, 于 1 081 bp 处可见理想条带。

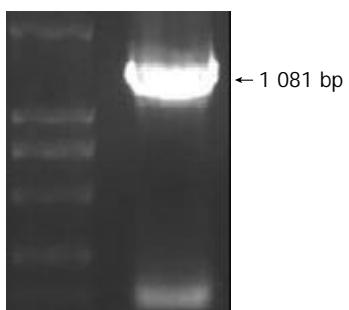


图 2 以 HepG2 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 NS3TP6 启动子序列。

2.4 重组质粒转染实验及报告基因 CAT 的检测 将重组质粒 pCAT3-NS3TP6-p 转染 HepG2 细胞, 可见 pCAT3-NS3TP6-p 具有启动子活性, pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pCAT3-NS3TP6-p 共转染后, CAT 的表达较对照质粒明显升高, 说明 NS5A 对 NS3TP6 启动子具有激活作用(表 1), 重复试验得到同样的结果(表 2)。

表 1 pCAT3-NS3TP6-p+pcDNA3.1(-)-NS5A 共转染后 CAT 的表达

组别	质粒	吸光度(A值)
阴性对照	pCAT3-basic	0.033
阳性对照(control)	pCAT3-control	2.215
实验组	pCAT3-NS3TP6-p	0.165
共转染组	pCAT3-NS3TP6-p+pcDNA3.1(-)-NS5A	0.329

表 2 pCAT3-NS3TP6-p+pcDNA3.1(-)-NS5A 共转染重复实验

组别	质粒	吸光度(A值)
阴性对照	pCAT3-basic	0.045
阳性对照(control)	pCAT3-control	0.879
实验组	pCAT3-NS3TP6-p	0.182
共转染组	pCAT3-NS3TP6-p+pcDNA3.1(-)-NS5A	0.317

3 讨论

HCV 非结构蛋白 NS5A 为丝氨酸磷酸化蛋白, 因磷酸化程度的不同而存在 p56 和 p58 两种胞质磷酸化蛋白形式。NS5A 定位于肝细胞内质网核周区网状膜, 形成核糖核蛋白复合物, 在病毒基因组的翻译中起重要的作

用。同时 NS5A 因为能直接与双链 RNA 依赖的蛋白激酶结合, 并使其失活, 从而抵抗 IFN α 的抗病毒而受到广泛的重视^[27-30]。目前研究认为 NS5A 除上述的作用外, 还具有转录反式激活因子的功能, 但其确切的机制及途径并不十分清楚。研究发现 NS5A 可以引起胞内 Ca²⁺ 分布异常, 启动 Ca²⁺ 相关的信号传导途径, 导致转录因子蛋白 NF- κ B 和 STAT-3 转位于核内, 发挥其反式激活作用^[31-36]。

尽管 NS5A 蛋白是存在于胞质中, 但研究发现其具有功能性核定位信号(nucleic localization signal, NLS)序列, 即 PPRKKR₃₆₂VV(354-362 aa), 因此有核信号转导功能^[37]。Satoh et al^[38]为了说明 NS5A 蛋白的细胞定位, 他们采用多种 NS5A 蛋白 N- 端或 C- 端缺失突变体, 通过在细胞株中短暂表达的亚细胞定位分析发现, N- 端缺失的 NS5A 蛋白位于细胞核, 并且只要 NS5A 蛋白 N- 端 27 个氨基酸残基序列缺失, 就可使其定位于胞核中, 因此他们认为 NS5A 蛋白的细胞定位主要决定于其 N- 端的分子结构。同时, 他们也研究了 NS5A 蛋白的分解过程, 认为 NS5A 蛋白裂解仅发生在其 N- 端和 C- 端的少数几个位点, 此裂解作用可以被凋亡刺激剂加强, 被半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK 所抑制, 说明 NS5A 蛋白的裂解来源于一种或几种半胱氨酸蛋白酶样的蛋白酶。基于对 NS5A 蛋白突变的分析, 他们推测裂解产物包括一种去除 N- 端和 C- 端的 NS5A 蛋白(155-389 aa), 与此种裂解产物相同氨基酸序列的多肽存在于细胞核中。我们利用基因芯片技术对于 HCV 的 NS5A 反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 其中上调 NS3TP6 基因表达的能力最强 - Cy5/Cy3 值达 3.4。NS3TP6 基因为邵清 et al^[39]于 2003 年从人肝组织 cDNA 文库中测序得来, 目前对于他的功能研究并不多。通过美国国立图书馆(NCBI)在线软件分析, 确定 NS3TP6 基因的启动子序列, 构建 CAT 表达的载体, 与 NS5A 表达载体共转染, 结果表明 NS5A 可以激活 NS3TP6 基因的启动子, 与对照组相比 A 值升高约 2 倍, 重复试验亦得到同样的结果。结合基因芯片结果, 我们认为 NS5A 上调 NS3TP6 基因的表达, 可能与 NS5A 对基因启动子的激活有关, 这一结论还需要 NS5A 胞质信号传导通路阻断试验进一步证实。总之, 本研究验证了前期 NS5A 反式激活基因的筛选结果, 为丙肝病毒的反式调节机制提供了新的线索。

4 参考文献

- Zandman-Goddard G, Levy Y, Weiss P, Shoenfeld Y, Langevitz P. Transverse myelitis associated with chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:111-113
- Moriguchi H, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection. *Gastroenterology* 2003;124:1166-1167
- Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, Dhali GK, Chaudhuri S, Maity SG, Naik TN, Bhattacharya SK, Mazumder DN. Hepatitis C virus infection in the general population: A community-based study in West Bengal, India. *Hepatology* 2003; 37:802-809

- 4 Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. Racial differences in the relationship between hepatitis C infection and iron stores. *Hepatology* 2003;37:795-801
- 5 Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- 6 Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
- 7 Chen S, Wang Y. Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002; 16:219-222
- 8 Hui CK, Belaye T, Montegrande K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
- 9 Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Leparc G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
- 10 Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
- 11 Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013
- 12 Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T, Daub H. Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003;84:555-560
- 13 Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 2003;148:237-251
- 14 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- 15 Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002;76:11079-11090
- 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 17 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 18 成军. 慢性丙型病毒性肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 19 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997; 71:8856-8859
- 20 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 21 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活SV40病毒启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;24:81-83
- 22 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003; 28:40-43
- 23 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
- 24 Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Walmsley A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarray platform. *Biosens Bioelectron* 2003;18:175-184
- 25 Barsky V, Perov A, Tokalov S, Chudinov A, Kreindlin E, Sharonov A, Kotova E, Mirzabekov A. Fluorescence data analysis on gel-based biochips. *J Biomol Screen* 2002;7:247-257
- 26 Chan K, Baker S, Kim CC. Genomic Comparison of salmonella enterica serovars and salmonella bongori by use of an *S. enterica* serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* 2003;185:553-563
- 27 Francois C, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatignol A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol* 2000;74:5587-5596
- 28 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110
- 29 Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, Mathews MB. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J Virol* 2001;75:1265-1273
- 30 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R Jr, Wang CF, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication Proc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4650-4655
- 31 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 32 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
- 33 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- 34 Park KJ, Choi SH, Choi DH, Park JM, Yie SW, Lee SY, Hwang SB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates c-Jun N-terminal kinase through interaction with TNF receptor-associated factor 2. *J Biol Chem* 2003[Epub ahead of print]
- 35 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 36 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
- 37 Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 1996;182:203-211
- 38 Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270:476-487
- 39 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

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

乙型肝炎病毒E抗原肝细胞结合蛋白E-18调节基因的表达谱芯片研究

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞

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

陆荫英, 女, 1973-08-27生, 贵州贵阳人, 汉族, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础研究及临床工作。

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”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and identification of genes trans-regulated by a novel HBeAg binding protein E-18 with microarray assay

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

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.

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

Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the biological functions of a novel hepatitis B virus e antigen (HBeAg) binding protein E-18, and to use cDNA microarray technique to screen genes regulated by E-18.

METHODS: A novel gene E-18 coding for HBeAg was screened and identified by using yeast two-hybrid system 3 and co-immunoprecipitation technique. The E-18 coding DNA fragment was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique from HepG2 cell. The expressive vector of pcDNA3.1(-)-E-18 was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-E-18, respectively by using lipofectamine. The total RNA was isolated and reverse transcribed. The cDNA of each sample were subjected to microarray screening

with 1 152 cDNA probes and analyzed by bioinformatics.

RESULTS: E-18 cDNA sequence was obtained and identified by yeast two-hybrid screening and bioinformatics analysis. The expressive vector was constructed and confirmed by DNA sequencing analysis and restriction enzyme digestion. High quality mRNA and cDNA of transfected HepG2 cells had been prepared and successful microarray screening conducted. From the scanning results, there were 52 differential expression genes, of which 36 genes were down-regulated, and 16 genes were up-regulated.

CONCLUSION: Microarray technique is successfully used to screen the genes trans-regulated by E-18. The expression of E-18 protein affects the expression spectrum of HepG2 cell.

Lu YY, Liu Y, Cheng J, Ling YD, Chen TY, Shao Q, Wang L, Zhang LX. Screening and identification of genes trans-regulated by a novel HBeAg binding protein E-18 with microarray assay. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):817-820

摘要

目的: 应用基因芯片技术对于pcDNA3.1(-)和pcDNA3.1(-)-E-18分别转染的HepG2细胞的基因表达谱进行分析, 筛选能被E-18反式调节的靶基因, 研究未知功能的HBeAg结合蛋白E-18的生物学功能。

方法: 应用酵母双杂交技术和体外免疫共沉淀技术筛选并验证HBeAg的肝细胞结合蛋白基因, 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从HepG2细胞中扩增E-18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(-)-E-18。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: 筛选出肝文库中HBeAg结合蛋白E-18的编码基因, 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定鉴定正确。提取转染细胞的总mRNA并进行逆转录成为cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1 159个基因表达谱的筛选中, 发现有52个基因有差异表达, 其中36种基因表达水平显著下调, 16种基因表达水平显著上调。

结论: 成功地应用DNA芯片技术筛选出HBeAg结合蛋白新基因E-18的反式调节蛋白, 证明E-18基因的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。

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E-18调节基因的表达谱芯片研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):817-820
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/817.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)在临幊上作为判断HBV活动性复制的指标之一, 普遍认为他是一种免疫耐受因子, 调节乙型肝炎的免疫发病机制^[1-4]. 但HBeAg与肝细胞之间的相互作用以及作用后产生的效应, 目前研究较少且没有明确的结果, 因此寻找HBeAg与肝细胞间的相互作用蛋白, 并进一步明确其间的作用机制、作用效应, 有助于发现新的HBV感染防治方法. 我们用酵母双杂交技术和体外免疫共沉淀技术筛选并验证了一个未知功能的HBeAg结合蛋白基因E-18的存在, 并进一步用基因表达谱芯片技术筛选能被E-18反式调节的蛋白基因, 为全面深入了解E-18的功能及其在HBV致肝细胞损伤中的作用研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞及感受态大肠杆菌JM109(本室保存), 酵母双杂交系统-3试剂盒及相关试剂、PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒、50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning试剂盒(Clontech); pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS转染试剂(Gibco), mRNA Purification试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), High Pure PCR Product Purification试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6通用引物及pGEM-Teasy载体(Promega), Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、EcoR I、BamH I和Pst I等限制性内切酶购于Takara生物公司, 新基因E-18扩增引物(P1 5'-GAA TTC ATG TCC AGG TGG ACT CTG AG-3', P2 5'-CTC GAG TCA AAA GTC CAC AAA ACT GC-3')的合成及DNA测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法

1.2.1 HBeAg肝细胞结合蛋白E-18的酵母双杂交筛选及鉴定 应用酵母双杂交技术筛选HBeAg肝细胞结合蛋白的研究原理、方法、操作步骤以及E-18基因真核表达载体的构建等参考相关的研究论文^[5-13].

1.2.2 真核表达载体及细胞转染 E-18蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-E-18由本室构建. 用Lipofectamine PLUS转染试剂将2 μg pcDNA3.1(-)-E-18及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞, 48 h后收获细胞.

1.2.3 细胞mRNA提取 使用mRNA Purification试剂盒, 直接提取转染了E-18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.

1.2.4 探针标记 逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-

dUTP标记对照组细胞mRNA(5 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.

1.2.5 芯片制备 包含的1152个cDNA由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行PCR扩增, PCR产物长度为1 000-3 000 bp. 靶基因以0.5 μg/ μL溶解于3×SSC溶液中, 用Cartesian公司的Cartesian 7 500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用2 g/L SDS、水及2 g/L的硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用.

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

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

2 结果

2.1 以HBeAg为“诱饵”筛选肝细胞文库及鉴定结果筛选出HBeAg结合蛋白新基因E-18^[17], 免疫共沉淀技术再次证实.

2.1 E-18蛋白的表达载体构建 E-18蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-E-18构建成功, 经相应的限制性内切酶消化鉴定正确.

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

2.3 E-18蛋白调节的基因表达 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E-18蛋白的上调基因. 研究发现有16种基因的表达水平上调(表1), 36种基因表达水平下调(表2).

表1 E-18蛋白影响表达上调的基因

基因种类	GenBank号(NM)
博来霉素水解酶	000386
DNA依赖蛋白酶催化亚基	U47077
苹果酸脱氢酶	005917
cAMP依赖蛋白激酶	002736
磷脂酶B	006330
焦磷酸酶	021129

鲨烯环氧酶	003129
遍在蛋白特异性蛋白酶 1	003368
遍在蛋白整合酶 E2D	003340
C5 类固醇脱氢酶	014814
平滑肌细胞相关蛋白 -3	AB01473
维生素 A 反应素	005215
TGF-β 受体	D50683
鸟苷酸环化酶 β3	003276
染色体分离基因 -1	001316
酪蛋白激酶 1	001892
FKBP 相关蛋白	053274
胸腺素	BD017169
选择素 2	003591
CGI-107 蛋白	016045
cofilin 亚型 1	AF134802
NCK- 相关蛋白	013436
附加素 A4	001153
podocalyxin	005397
细胞分裂周期素 23	004661
mastermind	014757
CD53 抗原	000560
视网膜母细胞瘤结合蛋白	AJ243706
结直肠癌突变基因	006407
结直肠癌缺失基因	002387
P53 结合蛋白 -1	005657
氯化物细胞内途径蛋白 4	013943
钙黏蛋白相关蛋白	004389
未知基因 KIAA0107	006918
未知基因 KIAA1641	025190
未知基因 MGC: 9535	000857

表 2 E-18 蛋白影响表达下调的基因

基因种类	GenBank 号(NM)
谷胱甘肽过氧化物酶	001509
Na、K-ATP 酶	D00099
组织蛋白酶 E	001910
胰岛素样生长因子	X57025
RNA 聚合酶 II	002695
EDRK 富集因子 2	005770
金属硫蛋白	005950
肌糖蛋白 1G	000232
G 蛋白通路抑制因子 1	004172
prosaposin	002778
胞膜糖蛋白	007002
局限性小肠结肠炎因子	016353
未知蛋白	AK055991
未知蛋白	AK000383
未知蛋白	AK025912
未知蛋白	AF090094

3 讨论

HBeAg 在 HBV 感染形成的免疫耐受过程中起着关键作用, 是研究有效防治乙型肝炎病毒(HBV)感染的关键点之一^[14-18]. 通过酵母双杂交技术和体外免疫共沉淀技术, 我们发现并验证了肝细胞中与 HBeAg 有相互作用未知蛋白 E-18. 为研究 E-18 的生物学功能, 用基因表达谱芯片技术对新蛋白 E-18 作了初步的研究, 发现受其影响表达水平改变的基因, 以期从中找出线索, 为深入研究 E-18 的具体生物学功能奠定基础^[19-21].

构建 pcDNA3.1(-)-E-18 真核表达载体, 将空载体作为对照共同转染 HepG2 细胞, 应用基因表达谱芯片, 发现 E-18 的表达可使 HepG2 细胞中 36 种基因的表达水平下调, 16 种基因表达水平上调. 在差异表达的基因中包括各种参与氧化还原反应的酶类(Na、K-ATP 酶、谷胱甘肽过氧化物酶、苹果酸脱氢酶、磷脂酶 B、焦磷酸酶、鲨烯环氧酶、C5 类固醇脱氢酶)、细胞信号转导和细胞周期相关蛋白基因(G 蛋白通路抑制因子 1、TGF-β1 受体、鸟苷酸环化酶 β3、酪蛋白激酶 1、cAMP 依赖蛋白激酶)、免疫反应调节蛋白基因(FKBP 相关蛋白、胸腺素、选择素 2)及肿瘤发生相关基因(视网膜母细胞瘤结合蛋白、结直肠癌突变基因、结直肠癌缺失基因、p53 结合蛋白 -1)等及未知基因. 其中 Prosaposin(多聚顺反子 polycistronic)为含 511 个氨基酸的糖蛋白, 存在于各种组织和体液中, 同时以分泌型和膜整合型 2 种形式存在, 是 saposin 的前体, 含有 80 个固定的氨基酸残基是结构域, 有相同的半胱氨酸残基、糖基化作用位点、超螺旋区及蛋白裂解位点, 能激活鞘类磷脂溶酶体水解酶, 具有特异性水解酸性神经鞘磷脂的活性, 还能刺激神经节苷脂(GM)1β- 半乳糖苷酶的活性, 推测在体外具有结合和运送神经节苷脂的活性^[22-24], E-18 对其起上调作用. FKBP 是亲免疫家族中的一员, 是免疫抑制剂藤霉素(FK-506)和拉帕霉素的细胞内受体^[25], E-18 下调其表达, 提示 E-18 可能通过影响免疫抑制剂与 FKBP 结合来调节免疫. 肌动蛋白解聚因子(actin-depolymerizing factor, ADF/cofilin)是肌动蛋白相关蛋白家族中的成员, 是肌动蛋白生长锥的一个重要调节因子, 对于肌动蛋白在各种细胞中的迅速转位非常重要, 在生长椎中与肌动蛋白协同存在, 协助轴突的延伸及细胞运动, 其活性受 LIM 激酶和磷酸酯酶的可逆性磷酸化作用调节^[26-27]. NCK 相关蛋白 1(NCKAP1)是 Nap1 类似物, 位于人类 2q32 染色体上, 能诱导神经元细胞的凋亡^[28]. 黏附素 4 属于黏附素家族, 是一类钙依赖的磷脂结合蛋白, 功能未完全明了, 其中部分成员是膜相关因子, 参与胞饮和胞吐过程. 黏附素 4 与家族其他成员间约有 45-59% 的同源性, 有相同的大小及内含子、外显子, 编码蛋白具有 ATP 结合活性, 在体内有抗凝血和抑制磷脂酶 A2 的活性^[29]. Mastermind 是一种 Notch 通路中的重要蛋白质, 决定着细胞的命运, 他可与细胞内 Notch 受体结

合形成复合物，并能增加Notch诱导基因的表达，有证据表明该蛋白可能在Notch通路中作为一种转录的协同激活因子起效，还有报道Mastermind还是Notch增强子复合物从染色体上解聚激活转录过程中的调控元件^[30]。氯化物细胞内途径蛋白通过离子泵作用调节囊泡内pH值，通过介导氯的渗透维持大的细胞内pH值^[31]。E-18能下调上述基因的表达，提示其可能通过多种途径干预细胞生理活动。

随着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以及他们在疾病发生、发展、转化过程中的变化规律的研究逐渐成为生命科学的热点，同时由于新技术的不断创新，使一系列的研究成为可能。我们成功应用基因表达谱芯片技术对E-18新基因的反式调节基因进行了初步的研究，为下一步的深入研究奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-2021
- 2 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:218-222
- 3 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:178-187
- 4 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
- 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 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 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 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
- 10 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
- 11 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:450-451
- 12 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
- 13 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
- 14 Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin-alpha1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002;9:280-287
- 15 Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
- 16 Milich DR. Do T cells “see” the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- 17 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
- 18 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
- 19 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
- 20 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 21 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
- 22 Morimoto S, Martin BM, Kishimoto Y, O'Brien JS. Saposin D: a sphingomyelinase activator. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156:403-410
- 23 Kretz KA, Carson GS, Morimoto S, Kishimoto Y, Fluharty AL, O'Brien JS. Characterization of a mutation in a family with saposin B deficiency: a glycosylation site defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2541-2544
- 24 Hiraiwa M, Soeda S, Kishimoto Y, O'Brien JS. Binding and transport of gangliosides by prosaposin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11254-11258
- 25 Neye H. Mutation of FKBP associated protein 48 (FAP48) at p roline 219 disrupts the interaction with FKBP12 and FKBP52. *Regul Pept* 2001;97:147-152
- 26 Gungabissoon RA, Bamburg JR. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem* 2003;51:411-420
- 27 Hussey PJ, Allwood EG, Smertenko AP. Actin-binding proteins in the Arabidopsis genome database: properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002;357:791-798
- 28 Suzuki T, Nishiyama K, Yamamoto A, Inazawa J, Iwaki T, Yamada T, Kanazawa I, Sakaki Y. Molecular cloning of a novel apoptosis-related gene, human Nap1 (NCKAP1), and its possible relation to Alzheimer disease. *Genomics* 2000;63:246-254
- 29 Kojima K, Yamamoto K, Irimura T, Osawa T, Ogawa H, Matsumoto I. Characterization of carbohydrate-binding protein p33/41: relation with annexin IV, molecular basis of the doublet forms (p33 and p41), and modulation of the carbohydrate binding activity by phospholipids. *J Biol Chem* 1996;271:7679-7685
- 30 Fryer CJ, Lamar E, Turbachova I, Kintner C, Jones KA. Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* 2002;16:1397-1411
- 31 Chuang JZ, Milner TA, Zhu M, Sung CH. A 29 kDa intracellular chloride channel p64H1 is associated with large dense-core vesicles in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 1999;19:2919-2928

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

基因表达谱芯片技术筛选肝再生增强因子反式调节基因

王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 刘敏

王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 刘敏, 中国人民解放军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
王琳, 女, 实验技师。主要从事肝炎病毒蛋白结合蛋白和分子生物学调节机制的研究。

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

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and identification of genes transactivated by human augmenter of liver regeneration by microarray assay

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Jian Zhang, Qing Shao, Min Liu

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Jian Zhang, Qing Shao, Min Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

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

Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: Augmenter of liver regeneration (ALR) is a protein that plays a role in liver regeneration. In order to clarify the effect of the expression of ALR on profile of the hepatocytic gene expression, we analyzed difference between the HepG2 cells transfected with ALR and controls by using gene chip technology.

METHODS: Total RNA was extracted from HepG2 cells, and RT-PCR was performed to amplify the coding region of ALR. The expression of ALR in the transfected HepG2 cells was confirmed by Western blot. Total mRNA was isolated from the transfected HepG2 cells with pcDNA3.1(-) and pcDNA3-ALR, respectively. cDNA was prepared by reverse transcription. Microarray assay was conducted for screening of up-and down-regulated genes in both HepG2 cells.

RESULTS: The expressive vector of pcDNA3(-)-ALR was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The expression of ALR was confirmed by Western blot. After screening with cDNA microarray, we found 2 genes were up-regulated, and 24 genes including TNFRSF1A-associated via death domain, tissue inhibitor of metalloproteinase 1, epididymal androgen-related protein, down-regulated.

CONCLUSION: ALR is a cell growth factor, which has some influences on gene expression profile of hepatocytes; Microarray technology is a method to analyze gene expression spectra of trans-regulation of a protein and conducive to understand the regulative effect of ALR on hepatocytes and other biological function.

Wang L, Li K, Cheng J, Zhang J, Shao Q, Liu M. Screening and identification of genes transactivated by human augmenter of liver regeneration by microarray assay. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12 (4):821-823

摘要

目的: 为了阐明人肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)的表达对于肝细胞基因表达谱的影响, 我们应用基因芯片技术, 对于转染和未转染的HepG2细胞进行了分析。

方法: 从HepG2细胞RNA中用反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)扩增出ALR编码区DNA, 常规分子生物学技术构建ALR的真核表达载体pcDNA3.1(-)-ALR, 利用脂质体转染技术转染HepG2细胞, ALR的表达以Western blot杂交技术证实。从转染和非转染细胞HepG2种提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 并进行基因芯片技术分析。

结果: 经过限制性内切酶分析和序列测定, 证实pcDNA3.1(-)-ALR构建正确。ALR在HepG2细胞中的表达以Western blot杂交技术得到证实。对于ALR重组表达载体和空白载体转染的HepG2细胞的基因表达谱, 利用基因芯片技术进行分析。结果表明, 2种基因的表达水平上调, 24种基因的表达水平下调。这些基因包括淀粉酶α、肿瘤坏死因子受体、金属蛋白酶1组织抑制因子、性激素相关蛋白等基因, 相信这些类型的基因在ALR所发挥的生物学效应起到重要的作用。

结论: ALR对于肝细胞基因表达谱存在一定影响; 基因芯片技术是分析蛋白反式调节基因表达谱的重要技术途径, 有助于了解ALR对肝细胞和其他生物学功能的调节作用。

王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 刘敏. 基因表达谱芯片技术筛选肝再生增强因子反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):821-823

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/821.asp>

0 引言

肝脏是为数不多能够再生的哺乳动物器官, 生长因子在肝再生启动及其进程中发挥着举足轻重的作用^[1-7]。肝再生增强因子(augmentor of liver regeneration, ALR)或称肝细胞生成素(hepatopoietin, HPO), 是一种刺激肝细胞增生的小分子物质, 组织分布广泛, 缺乏特异性, 但并不排除其作用靶位是特异的。除了主要的促进肝再生活性外, ALR还参与核及线粒体转录文本的合成、稳定, 及一些重要脏器(如生殖细胞)的发育过程。我们

曾经利用酵母双杂交方法发现了一些与 ALR 具有结合作用的蛋白质^[8-11], 现应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对于 ALR 反式调节的靶基因进行了筛选, 从另一角度探讨 ALR 潜在的生物学功能.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态 E.coli 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). 真核表达载体及细胞转染 ALR 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-ALR 为本室构建^[25]. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-ALR 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 方法 细胞 mRNA 提取使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 ALR 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. 参照 Schena et al 的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 5 × SSC+2 g/L SDS 20 μL 杂交液中. 包含 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 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), 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 °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. 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 小于 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱^[12-19].

2 结果

真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-ALR 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.

2.1 ALR 上调基因两条(表 1).

表 1 部分表达显著增加的基因

GenBank 号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_000699	淀粉酶 α2A(AMY2A)	2.053
NM_016045	推测蛋白(CGI-107 protein, LOC51012)	2.056

2.2 ALR 下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCV NS3 蛋白得下调基因. 结果有 24 种基因的表达水平下调(表 2).

表 2 部分表达显著下降的基因

GenBank 登陆号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_001509	谷胱甘肽过氧化物酶 5 转录变体 1 (附睾雄激素相关蛋白)(GPX5)	0.183
NM_002388	小染色体维持缺陷 3(MCM3)	0.287
NM_021016	妊娠特异 β 1 糖蛋白 3(PSG3)	0.302
NM_003254	金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1)	0.341
NM_004728	天冬 - 谷 - 丙 - 天冬 / 组 氨酸多肽 21 盒(DDX21)	0.351
NM_003998	NFKB1	0.367
NM_003330	硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)	0.369
NM_001554	富含半胱氨酸的血管生成诱导物 61(CYR61)	0.370
NM_002820	甲状腺旁腺激素样激素(PTHHLH)	0.374
NM_003789	肿瘤坏死因子受体超家族 1A 死亡 域转录变异体 1 (TRADD)	0.376
NM_003564	(transgelin 2, TAGLN2)	0.380
NM_005573	核纤层蛋白 B1 (LMNB1)	0.383
NM_005053	酿酒酵母 RAD23 同源物 (RAD23A)	0.405
NM_007002	细胞膜糖蛋白 M, 110 000 (GP110)	0.428
NM_005770	small EDRK-rich factor 2, (SERF2)	0.441
NM_001823	脑肌酸激酶(CKB)	0.449
NM_001343	disabled (Drosophila) homolog 2 (mitogen-responsive phosphoprotein) (DAB2)	0.453
NM_014889	金属蛋白酶(MP1)	0.454
NM_002782	妊娠特异 β 1 糖蛋白 6(PSG6)	0.454
NM_003752	真核转录起始因子 3 亚单位 8 (EIF3S8)	0.455
NM_005160	肾上腺 β 受体激酶 2(ADRBK2)	0.473
NM_003682	MAPK 激活死亡域(MADD)	0.476
NM_000048	精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL)	0.483
NM_005950	金属硫蛋白 1G(MT1G)	0.491

3 讨论

肝炎、肝硬化在我国发病率高、危害严重, 预防肝坏死与促进肝再生已成为目前临床肝损伤各种治疗的出发点. ALR 是一种能够特异作用肝细胞或肝癌细胞细胞因

子，具有明确救治功能和药用价值。他促使肝细胞从G₁期向S期过渡，有助于肝再生的完成^[20-30]。ALR调控肝再生的作用机制是研究的关键，但还不能取得一致。

我们利用基因芯片技术对ALR上调、下调基因进行分析，结果表明24种基因的表达水平下调，包括肿瘤坏死因子受体、金属蛋白酶1组织抑制因子、激素相关蛋白等基因。肿瘤坏死因子受体胞质内保守的死亡域(TRADD)是触发细胞凋亡通路的必要的成分，MADD被鉴定为TNFR1信号复合物含死亡域蛋白家族成员，他们在TNF起始的不同信号级联反应中起到中枢调节作用，资料显示MADD可激活丝裂源活化蛋白激酶(MAPK)的ERK及JNK途径并使胞质内磷脂酶A₂的磷酸化进而导致花生四烯酸的释放，除了介导炎症的发生还参与TNF诱导的凋亡。ALR对这两种基因均有一定的下调，可能的解释是在肝再生过程中对细胞凋亡产生部分抑制作用，新增肝脏组织以自分泌形式分泌生长因子为其他细胞的再生提供丝裂源和死亡信号的抑制分子。ALR下调的另一种感兴趣蛋白是金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP1)，TIMP是参与细胞外基质降解代谢的基质金属蛋白酶(MMP)特异性抑制物，可以抑制所有MMP的活性，在肝纤维化的发生发展中起重要作用。我国学者认为TIMP1可特异性地结合激活间质胶原酶从而抑制其对胶原蛋白的分解，促进肝纤维化形成，而重组ALR有减轻实验性肝纤维化形成的作用。TIMP1表达的上调或下调的效应方向依赖于细胞背景，我们发现ALR在人肝癌细胞(HepG2)中下调TIMP1基因的表达，这种活性对于有序的肝再生和抗肝纤维化治疗是十分有利的。此作用被另一组实验所证实，王爱民等观察到大剂量ALR对TIMP1基因的表达有明显的抑制作用。实验结果发现ALR下调了一些激素相关蛋白，如谷胱甘肽过氧化物酶5，该蛋白可保护精子细胞膜免受脂质过氧化的损害，ALR能够显著下调其基因的表达，可能与ALR在调节生殖细胞发育过程中有关系，但是具体作用不明。此外，ALR下调一些核酸与蛋白的翻译与修饰功能相关蛋白：天冬-谷-丙-天冬/组氨酸多肽21盒、真核转录起始因子3亚单位8、NFκB1等。受ALR上调的蛋白很少，其中包括一个未知功能基因，我们正对其进行克隆，并将在真核细胞内证实这种上调作用。

4 参考文献

- 1 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
- 2 Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, Azzarone A, Iacobellis A, Deleo A, Hagiyama M, Whiteside TL, Starzl TE. The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenter of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology* 1997;25:411-415
- 3 Yang XM, He FC. The advance of augmenter of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:725-727
- 4 Chen L, An W, Tan X, Gao D, Dai J. Phosphorylation of hepatic stimulator substance on mitogen-activated protein kinase in BEL-7402 hepatoma cells. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:22-24
- 5 Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, Lill R. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* 2001;2:715-720
- 6 Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, Francavilla A, Hofhaus G. Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig Liver Dis* 2001;33:173-180
- 7 Gandhi CR, Kuddus R, Subbotin VM, Prelich J, Murase N, Rao AS, Nalesnik MA, Watkins SC, DeLeo A, Trucco M, Starzl TE. A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats. *Hepatology* 1999;29:1435-1445
- 8 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
- 9 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
- 10 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 Pancreatic Dis Int* 2002;1:87-91
- 11 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
- 12 成军. 基因芯片技术的原理及其在肝病研究中的应用. 中华肝脏病杂志 2002;10:302
- 13 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
- 14 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
- 15 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
- 16 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
- 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 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
- 19 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
- 20 王刚, 刘妍, 卞劲松, 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
- 21 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
- 22 成军, 李莉, 张玲霞, 陆荫英. 肝再生增强因子的作用机制. 临床肝胆病杂志 2002;18:146-148
- 23 王琳, 李克, 成军, 陆荫英. 人肝再生增强因子表达载体的构建及其在酵母中的表达. 中华肝脏病杂志 2002;10:384
- 24 Cheng J. Progress in Augmenter of liver regeneration superfamily. *Shengwuxue Zazhi* 2000;17:4-7
- 25 Shen M, Qiu DK, Chen Y, Xiong WJ. Effects of recombinant augmenter of liver regeneration protein, danshen and oxymatrine on rat fibroblasts. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1129-1133
- 26 Xu W, Wang S, Wang G, Wei H, He F, Yang X. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:318-325
- 27 Yang XM, Hu ZY, Xie L, Wu ZZ, Wu CT, He FC. In vitro stimulation of HTC hepatoma cell growth by recombinant human augmenter of liver regeneration (ALR). *Shengli Xue bao* 1997;49:557-561
- 28 Yang X, Wang A, Zhou P, Wang Q, Wei H, Wu Z, He F. Protective effect of recombinant human augmenter of liver regeneration on CCl4-induced hepatitis in mice. *Chin Med J (Engl)* 1998;111:625-629
- 29 Adams GA, Maestri M, Squiers EC, Alfrey EJ, Starzl TE, Dafoe DC. Augmenter of liver regeneration enhances the success rate of fetal pancreas transplantation in rodents. *Transplantation* 1998;65:32-36
- 30 Giorda R, Hagiyama M, Seki T, Shimonishi M, Sakai H, Michaelson J, Francavilla A, Starzl TE, Trucco M. Analysis of the structure and expression of the augmenter of liver regeneration (ALR) gene. *MolMed* 1996;2:97-108

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

血清类粘蛋白2下调乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子I转录活性的研究

洪源,成军,杨倩,刘妍,王建军

洪源,成军,杨倩,刘妍,王建军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
洪源,男,1974-12,福建省莆田市人,汉族。1998年毕业于第四军医大学军医系,获医学学士学位,2003年毕业于解放军军医进修学院,获得内科传染病学硕士学位,主要课题方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人:成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Down-regulating effect of orosomucoid 2 on preS1 promoter of hepatitis B virus

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

Yuan Hong, Jun Cheng, Qian Yang, Yan Liu, Jian-Jun Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070690; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate activity of orosomucoid 2 (ORM2) on preS1 promoter (SP I) of hepatitis B virus (HBV).

METHODS: Yeast one-hybrid system was employed in screening of DNA-binding proteins specifically recognizing HBV-SP I sequence, in which ORM2 was identified in GenBank by bioinformatics. For further studying the interaction between ORM2 and HBV-SP I, the sequence of ORM2 was amplified from HepG2 genome by polymerase chain reaction (PCR) technique, which was then cloned into pcDNA3.1(-) expression vector. The HepG2 cell line was transfected by pCAT3- SP I, and co-transfected by pCAT3-SP I and pcDNA3.1(-)-ORM2, respectively. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity was detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

RESULTS: pCAT3-SP I had higher activity of CAT than pCAT3-basic by ELISA kit. The expression of CAT from pCAT3-SP I was increased 81.9%, as compared with that in the co-transfection of pCAT3-SP I and pcDNA3.1(-)-ORM2.

CONCLUSION: Cell transfection and ELISA technology are successfully used to prove the results from yeast one-hybrid system, which brings some new clues for studying the specific binding proteins of HBV- SP I and its transcriptional regulation mechanism.

Hong Y, Cheng J, Yang Q, Liu Y, Wang JJ. Down-regulating effect of orosomucoid 2 on preS1 promoter of hepatitis B virus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):824-827

摘要

目的:探讨血清类粘蛋白2(ORM2)对乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原基因启动子I (HBV-SP I)转录的激活作用。

方法:以我实验室前期得到的HBV-SP I 的酵母单杂交系统筛选结果为基础,利用生物信息学技术确定ORM2的基因编码区域,聚合酶链反应(PCR)扩增ORM2 编码基因,克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(-)中,构建 pcDNA3.1(-)-ORM2载体;将该质粒与SP I 的氯霉素乙酰转移酶(CAT)报告载体pCAT3-SP I 共转染肝癌细胞系HepG2细胞系,并以 pCAT3-SP I 单独转染 HepG2 细胞系作为对照,酶联免疫吸附法(ELISA)检测CAT的表达活性。

结果: pCAT3-SP I 在HepG2细胞中能够启动CAT的表达;共转染实验中pCAT3-SP I +pcDNA3.1(-)-ORM2组CAT的表达活性较pCAT3-SP I 下降了81.9%。

结论: ORM2蛋白具有对HBV-SP I 的反式抑制作用。本实验验证了我室利用酵母单杂交技术筛选HBV-SP I 特异结合蛋白的结果,为进一步了解HBV-SP I 的转录调控机制及其与SP I结合的反式作用因子提供了新的线索。

洪源,成军,杨倩,刘妍,王建军. 血清类粘蛋白2下调乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子I 转录活性的研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):824-827
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/20.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种严重危害人类健康的致病因子。他感染人体除引起急慢性乙型肝炎和肝硬化外,还与肝癌的发生有密切关系^[1-4]。HBV 属嗜肝 DNA 病毒,目前在其基因组中已发现并鉴定的顺式元件有4个启动子、2个增强子和糖皮质激素应答元件。其中表面抗原基因含有两个串联的启动子 SP I 和 SP II。SP I (219-2 780 nt)的主要作用是调节 2.4 kb mRNA 的转录,

编码表面抗原大蛋白^[5-8]. 有研究^[9]证实, SP I 含有典型 TATA 盒序列, 是 HBV 转录调节的重要组分, 也是 HBV 嗜肝性的重要原因之一. 为了寻找与 SP I 结合的肝特异性转录作用因子, 我室^[10]应用酵母单杂交体系^[11-23], 以 SP I 核心序列为“诱饵”, 对人肝细胞 cDNA 文库成功进行了筛选, 得到了 12 个结合蛋白基因. 本实验为了对 SP I 酵母单杂交的筛选结果进行验证, 选取了其中的一个反式作用因子基因 - 血清类粘蛋白 2(ORM2)为研究对象, 利用生物信息学手段对 ORM2 基因编码序列进行分析、克隆, 与真核表达载体 pcDNA3.1(-)连接, 构建了表达质粒; 与 SP I 的 CAT 报告载体 pCAT3-SP I 共转染, 旨在研究 ORM2 对 SP I 是否具有激活作用, 使下游 CAT 基因的表达发生变化, 这一结果也为研究 HBV 的转录调节机制提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态 E.coli 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 pGEM-Teasy 载体(Promega). 真核表达载体及 pCAT3-SP I 重组质粒为本室构建.

1.2 方法

1.2.1 基因编码序列分析 根据 GenBank 中 ORM2 的基因组序列, 确定 ORM2 的翻译起始子及终止密码子. 设计并合成引物, 在上下游引物的 5' - 端分别加上 EcoR I 和 Xho I 酶切位点序列. 上游引物: 5' -GAA TTC ATG GCG CTG TCC TGG GTT CT-3'; 下游引物: 5' -CTC GAG GAT CCA AGG CTG TGT CCT GC-3', 全长共 625 bp.

1.2.2 质粒构建 以 HepG2 细胞基因组为模板, 进行聚合酶链反应(PCR)反应, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 玻璃奶回收 DNA 片段, 纯化. 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 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(EcoR I/Xho I)及测序鉴定. EcoR I/Xho I 双酶切重组质粒 pGEM-T-ORM2, 玻璃奶纯化回收酶切产物, 定向克隆至 pcDNA3.1(-)载体, 构建成重组质粒 pcDNA3.1(-)-ORM2. 经双酶切及菌落 PCR 鉴定连接产物, 试剂盒法提取质粒.

1.2.3 细胞培养及 pCAT3-SP I 转染 HepG2 细胞系 HepG2 细胞系在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中生长. 细胞生长至 50-80% 时采用脂质体转染法, 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行, 质粒 pCAT3-SP I 转染 48 h 后收获细胞.

1.2.4 共转染实验 细胞生长至 50-80% 融合度时, 质粒 pCAT3-SP I 与 pcDNA3.1(-)-ORM2 共转染 HepG2 细

胞系. 具体转染方法参照 FuGENE6 说明书进行, 转染 48 h 后收获细胞.

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

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-ORM2 重组质粒的构建 利用自行设计的引物成功扩增出 ORM2 的基因编码序列, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约 625 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, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带(3 000 bp 的 pGEM-T 载体和 625 bp 的 ORM2 DNA 片段), 与预期一致(图 2). 将双酶切产物与 pcDNA3.1(-)载体连接, 双酶切鉴定如图 3 所示(5 400 bp 的 pcDNA3.1(-)载体和 625 bp 的 ORM2 DNA 片段), DNA 测序结果和 GenBank 中 ORM2 的基因序列完全一致.

2.2 pCAT3-SP I 重组质粒的瞬时转染及报告基因 CAT 表达的检测 将重组质粒 pCAT3-SP I 转染 HepG2 细胞, CAT ELISA 结果如表 1 所示, 具有启动子活性.

2.3 pCAT3-SP I 与 pcDNA3.1(1)-ORM2 重组质粒共转染及 CAT 表达的检测 将 pCAT3-SP I 与 pcDNA3.1(-)-ORM2 共转染 HepG2 细胞时, CAT 的表达较 pCAT3-SP I 单独转染明显降低, 如表 2 所示, 说明 ORM2 对 HBV-SP I 具有反式抑制作用.

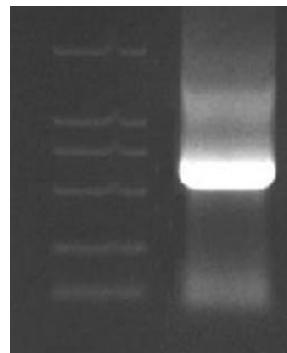


图 1 以 HepG2 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 ORM2 序列.

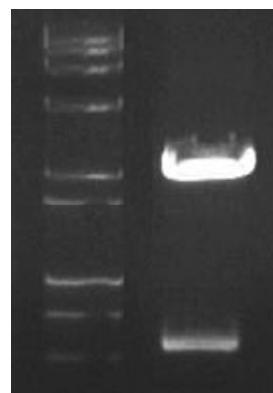


图 2 pGEM-T-ORM2 双酶切鉴定(EcoR I/Xho I).

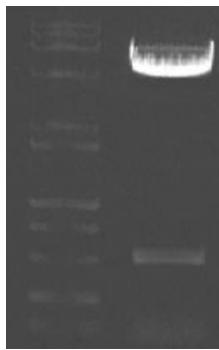


图3 pcDNA3.1(-)-ORM2双酶切鉴定(EcoR I/Xho I).

表1 pCAT3-SP I 转染 HepG2 细胞后 CAT 的表达(A 值, mean±SD)

组别	质粒	吸光度
阴性对照组	pCAT3-basic	0.450±0.012
阳性对照组	pCAT3-promoter	0.875±0.022
实验组	pCAT3-SP I	2.136±0.051

表2 pCAT3-SP I 与 pcDNA3.1(-)-ORM2 共转染 HepG2 后 CAT 的表达(A 值, mean±SD)

组别	质粒	吸光度
阴性对照组	pCAT3-basic	0.338±0.002
阳性对照组	pCAT3-promoter	0.612±0.007
实验对照组	pCAT3-SP I	2.143±0.028
共转染组	pCAT3-SP I +pcDNA3.1(-)-ORM2	0.389±0.075

3 讨论

SP I 是 HBV 的一个重要转录元件, 调节 HBV 表面抗原大蛋白的表达。对携带 HBV DNA 的转基因小鼠及感染 HBV 的黑猩猩模型的研究^[24-25]表明, 表面抗原主蛋白可在不同的组织中表达, 而表面抗原大蛋白只在肝内特异发现, 这一结果强烈提示: 表面抗原大蛋白的表达具有肝特异性, SP I 在肝特异性表达中起着关键作用。Raney et al^[6]通过应用瞬时转染分析、体外 RNase 保护分析等方法, 对这一现象的原因进行了研究, 结果显示, 肝细胞核因子 1(HNF1)与 SP I 的结合可能是主要原因。将该因子去除后, SP I 的转录活性下降了 20 倍。同时可能还有其他肝特异因子参与调节。为了寻找新的肝特异结合蛋白, 我室以 SP I 核心序列为“诱饵”, 整合入酵母基因组, 构建了酵母报告株; 经加入人肝 cDNA 文库进行筛选, 得到了 12 个双阳性克隆, 共表达 10 种蛋白, 其中有血清类粘蛋白 2、丝氨酸脱水酶、人肝细胞生长因子样蛋白等已知功能蛋白及 3 个未知功能蛋白。为了对这一结果进行验证并深入研究 HBV 的转录调控机制, 我们选取了其中的一个已知功能基因 - ORM2 为研究对象, 以 CAT 为报告基因, 在真核细胞内对二者的相互作用进行了共转染验证。

人血清类粘蛋白又称为 $\alpha 1$ -酸糖蛋白($\alpha 1$ -acid glycoprotein, AGP), 是分子量为 41-43 kDa, 等电点(pi)

为 2.8-3.8 的糖蛋白^[26]。在人、鼠和其他物种中, 他都是一种主要的血浆急性期反应蛋白。当有组织损伤或感染时, 在糖皮质激素和细胞因子的联合作用下, 其表达水平明显升高, 可作为感染性肠炎的诊断标志之一^[27]。他的氨基酸序列首先从人的血浆中分离得到, 从不同个体的血浆中分离得到的 ORM 序列具有很大的异质性^[28]。其中 ORM2 编码基因位于 ORM1 下游约 3.3 kb 处, 由 2 个分离的基因座组成; Northern blot 杂交检测结果显示^[29], 人肝脏中的 ORM mRNA 主要来自 ORM1 编码基因的转录, ORM2 在肝脏中的表达水平很低。尽管对 ORM 的结构研究早已开始, 但目前对他的生物学功能了解的仍不十分清楚。一般认为, 他在血浆中可以结合和携带亲脂性药物, 使药物发挥效用; 依赖碳端氨基酸, 发挥免疫应答介导和结合活性; 对 ORM 转基因鼠的研究可以在小鼠体内了解与 ORM 结合药物的效果, 揭示免疫反应中应答元件和组织特异性元件的功能^[30]。

本实验的主要目的是验证前期酵母单杂交的筛选结果, 在共转染实验中 pCAT3-SP I 和 pcDNA3.1(-)-ORM2 组的 CAT 的表达活性较 pCAT3-SP I 单独转染下降了 81.9%, 说明 ORM2 可与 HBV-SP I 结合, 且对 SP I 的转录活性有明显的抑制作用。尽管这一结论与体内的结论不符, 因为在体内 ORM2 主要分布于血浆中, 与 HBV-SP I 的核内分布存在着一定的区室阻隔。但这一结果有可能为今后 HBV 的治疗开辟一条新途径。

4 参考文献

- Yan JC, Ma JY, Pan BR, Ma LS. Studies on virus hepatitis B in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:611-616
- Wang WL, Gu GY, Hu M. Expression and significance of HBV genes and their antigens in human primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:392-396
- Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF- α , 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 PMID: 11819544
- Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114
- Wei Y, Etiemble J, Renard CA, Tiollais P, Buendia MA. Unusual activation of the integrated preS1 promoter of woodchuck hepatitis virus in a liver tumour. *J Gen Virol* 1996;77: 177-182
- Raney AK, Easton AJ, McLachlan A. Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter. *J Gen Virol* 1994; 75:2671-2679
- Gallina A, De Koning A, Rossi F, Calogero R, Manservigi R, Milanesi G. Translational modulation in hepatitis B virus preS-S open reading frame expression. *J Gen Virol* 1992;73:139-148
- Xu Z, Jensen G, Yen TS. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1997;71:7387-7392
- Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J. Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:566-570
- 洪源, 成军. 应用酵母单杂交技术筛选乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 的结合蛋白. 中华流行病学杂志 2003;24:000-000
- Li JJ, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 1993;262:1870-1873
- Liu JD, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M. Identifying DNA-

- binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *Methods* 1993;5:125-137
- 13 Alexander MK, Bourns BD, Zakian VA. One-hybrid systems for detecting protein-DNA interactions. *Methods Mol Biol* 2001; 177:241-259
- 14 Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9578-9582
- 15 Chevray P, Nathans D. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5789-5793
- 16 Dalton S, Treisman R. Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 1992;68:597-612
- 17 Chew LJ, Huang F, Boutin JM. Identification of nuclear orphan receptors as regulators of expression of a neurotransmitter receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274:29366-29375
- 18 Wei Z, Angerer RC, Angerer LM. Identification of a new sea urchin ets protein, SpEts4, by yeast one-hybrid screening with the hatching enzyme promoter. *Mol Cell Biol* 1999;19:1271-1278
- 19 Sieweke M. Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen. *Methods Mol Biol* 2000;130:59-77
- 20 Huang J, Hou CH, Qian RL. Screening of genes related to the expression of human epsilon-globin Gene by using yeast one-hybrid system. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:246-250
- 21 Wilson TE, Padgett KA, Johnston M, Milbrandt J. A genetic method for defining DNA-binding domains: application to the nuclear receptor NGFI-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 9186-9190
- 22 Lisowsky T, Polosa PL, Sagliano A, Roberti M, Gadaleta MN, Cantatore P. Identification of human GC-box-binding zinc finger protein, a new Kruppel-like zinc finger protein, by the yeast one-hybrid screening with a GC-rich target sequence. *FEBS Lett* 1999;453:369-374
- 23 Mak KL, Longcor LC, Johnson SE, Lemercier C, To RQ, Konieczny SF. Examination of mammalian basic helix-loop-helix transcription factors using a yeast one-hybrid system. *DNA Cell Biol* 1996;15:1-8
- 24 Araki K, Miyazaki O, Hino N, Tomita N, Chisaka O, Matsubara K, Yamamura K. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:207-211
- 25 Farza H, Hadchouel M, Scotto J, Tiollais P, Babinet C, Pourcel C. Replication and gene expression of HBV in a transgenic mouse that contains the complete viral gene. *J Virol* 1988;62:4144-4120
- 26 Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:157-171
- 27 Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:359-367
- 28 Merritt CM, Board PG. Structure and characterisation of a duplicated human alpha 1 acid glycoprotein gene. *Gene* 1988; 66:97-106
- 29 Dente L, Pizza MG, Metspalu A, Cortese R. Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein. *EMBO J* 1987;6:2289-2296
- 30 Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev* 2001;33:161-235

World Journal of Gastroenterology 栏目设置

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

应用酵母双杂交技术筛选人白细胞中与NS5ATP9蛋白结合蛋白的编码基因

李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 张建, 邵清, 刘敏, 程明亮

李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 张建, 邵清, 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
程明亮, 贵阳医学院第一附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004
李强, 男, 生于 1969-09-10, 四川泸州市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肝病的基础及临床研究。
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: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and cloning of genes coding for leukocyte proteins interacting with NS5ATP9 by yeast-two hybrid technique

Qiang Li, Yao-Dong Liang, Jun Cheng, Lin Wang, Jian Zhang, Qing Shao, Ming Liu, Ming-Liang Cheng

Qiang Li, Yao-Dong Liang, Jun Cheng, Lin Wang, Jian Zhang, Qing Shao, Ming Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Ming-Liang Cheng, The First Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the biological functions of NS5ATP9, and to screen proteins in leukocytes interacting NS5ATP9 protein by yeast-two hybrid.

METHODS: The NS5ATP9 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and NS5ATP9 bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3, and the yeast AH109 was then transformed. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing leukocytes cDNA library plasmid in 2×YPD medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-

His-Ade) containing X- α -gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid DNA from blue colonies, we underwent analysis by bioinformatics.

RESULTS: Forty six colonies were sequenced, among which thirteen colonies were Homo sapiens immunoglobulin light chain, ten ubiquitin, two ferritin heavy chain, eleven Homo sapiens rearranged immunoglobulin lambda light chain, one 14-3-3 family protein, one Meningococcus PorA protein, three RNA polymerase III, one tobacco mitogen activated protein kinase, two cytochrome P450 II, one SLIT2 protein, and one dependent-protein kinase catalytic subunit.

CONCLUSION: Genes of NS5ATP9 interacting proteins in leukocytes are successfully cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of NS5ATP9 and associated proteins.

Li Q, Liang YD, Cheng J, Wang L, Zhang J, Shao Q, Liu M, Cheng ML. Screening and cloning of genes coding for leukocyte proteins interacting with NS5ATP9 by yeast-two hybrid technique. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):828-831

摘要

目的: 我们在以往的研究中, 应用抑制性消减杂交技术(SSH)筛选得到了丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白9(NS5ATP9), NS5ATP9是一种未知功能新基因。为了进一步研究NS5ATP9的生物学功能, 应用酵母双杂交技术, 筛选并克隆人白细胞中与NS5ATP9蛋白相互作用蛋白的基因, 进一步阐明NS5ATP9的生物学功能及其作用途径。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增NS5ATP9基因, 连接入酵母表达载体pGBKT7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞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和X- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选阳性菌落并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出NS5ATP9基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四重缺陷(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基上生长, 又能在铺有X- α -gal的四缺培养基上变蓝的真阳性菌落46个, 其中含人类免疫球蛋白轻链13个, 核小体表面蛋白10个, 铁蛋白重链2个, 人类重组免疫球蛋白 λ 轻链11个, 14-3-3家族蛋白1个, 脑膜炎球菌PorA蛋白1个, RNA多聚酶III3个, 烟草有丝分裂原激活蛋白激酶1个, 细胞色素P450 II 2个, SLIT2蛋白1个, DNA依赖

蛋白激酶催化亚基 1 个.

结论: 成功克隆出丙型肝炎病毒 NS5ATP9 蛋白的结合蛋白, 为进一步研究 NS5ATP9 的生物学作用提供了新的线索.

李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 张建, 邵清, 刘敏, 程明亮. 应用酵母双杂交技术筛选人白细胞中与 NS5ATP9 蛋白结合蛋白的编码基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):828-831

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/828.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)严重危害人们的身体健康, 全世界慢性感染的人数超过 1.7 亿^[1]. 感染 HCV 后, 引起急慢性肝炎、肝脂肪变、肝纤维化甚至发展成为肝细胞癌. 而对于慢性丙型肝炎的治疗, 目前主要用干扰素 α 和利巴韦林抗病毒治疗, 但其疗效有限, 仅仅达 20-40%. 大量的研究表明, 作为 HCV 非结构蛋白 5A (HCV NS5A) 是干扰素 α 作用的靶位, 是否也可能是其他抗病毒药物的靶位, 这就有必要对他的功能作深入的研究.

我们实验室应用抑制性消减杂交技术(SSH)及生物信息学技术(bioinformatics), 筛选出 HCV NS5A 反式激活新型靶基因 NS5ATP9, 在 GenBank 中注册, 注册号为 AF529370. NS5ATP9 基因的编码序列全长为 336 个核苷酸(nt), 编码产物由 111 个氨基酸残基(aa)组成. 我们已经应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对于 NS5ATP9 反式调节基因进行筛选, 成功筛选出反式调节作用的靶基因, 为了进一步从不同的角度研究 NS5ATP9 的作用, 我们又运用酵母双杂交技术筛选 NS5ATP9 蛋白结合蛋白基因, 对这种基因的功能进行初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD 克隆载体、pGADT7-AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒, *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、以及预转化的 cDNA 白细胞文库(Y187)、质粒 pACT2 表达 AD/cDNA 文库融合蛋白(PT3183-1), 以上产品均购自 Clontech 公司. 酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基 SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司, Nco I、BamH I、半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 PCR 扩增 NS5ATP9 基因, 凝胶电泳、回收、连接到 T 载体、酶切、测序符合率达 100%, 与 pGBKT7 载体连接, 用 Nco I 和 BamH I 双酶切鉴定后, 表明酵母表达载体 pGBKT7-NS5ATP9 构建成功, 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109 后, 在四缺培养基上培养以排除其自身激活作用^[2-3].

1.2.2 诱饵与白细胞文库的酵母配合 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于 1×10^9 细胞/ml)与白细胞文库混合, 30 °C 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 18 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.

1.2.3 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 分析, 所获基因都能在 GenBank 数据库中找到同源基因.

2 结果

2.1 部分筛选克隆 Bgl II 酶切鉴定结果 pACT2 内含有两个 Bgl II 酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 使用该内切酶消化将释放出自白细胞文库的基因片段(图 1).

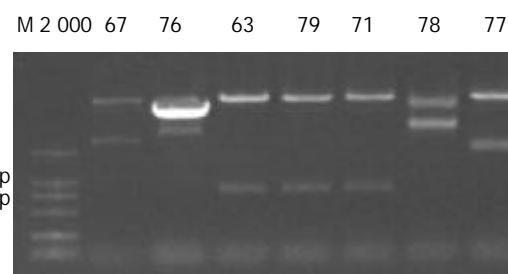


图 1 酵母双杂交技术筛选的部分克隆的 Bgl II 酶切鉴定.

2.2 cDNA 测序与同源性分析初步结果 配合后筛选出既能在 4chongquexian 重缺陷(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有 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 46 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 46 个均与已知基因的部分序列高度同源(98-100%), 详细结果见表 1.

表 1 诱饵与白细胞文库酵母菌株配合结果

序号	筛选出目的基因	同源性	相同克隆数
1	人类免疫球蛋白轻链	99%	13
2	核小体表面蛋白	98-100%	10
3	铁蛋白重链 1	98-99%	2
4	人类重组免疫球蛋白 λ 轻链	98-99%	11
5	14-3-3 家族蛋白	100%	1
6	脑膜炎球菌 PorA 蛋白	99%	1
7	RNA 多聚酶 III	99%	3
8	烟草有丝分裂原激活蛋白(MAP)激酶	100%	1
9	细胞色素 P450 II	99%	2
10	SLIT2 蛋白	99%	1
11	DNA 依赖蛋白激酶催化亚基	98%	1

3 讨论

丙型肝炎病毒基因编码10种蛋白，包括结构蛋白和非结构蛋白。非结构蛋白NS5A与丙型肝炎的致病有关，而丙型肝炎的致病机制可能与病毒蛋白对肝细胞或白细胞的作用有关。非结构蛋白5A反式激活蛋白9(NS5ATP9)是NS5A的反式激活新型靶基因编码的蛋白，研究他的功能对理解NS5A蛋白的作用具有重要意义。因此，我们利用1990年代初出现的酵母双杂交技术，进行了白细胞文库的筛选，希望筛选出与病毒蛋白相互作用的蛋白基因。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，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^[4-8]。

我们在真核表达载体pGBK-T7中构建pGK7-NS5ATP9诱饵质粒并在酵母菌株AH109中表达了NS5ATP9基因，与人白细胞cDNA文库的酵母菌株Y187进行配合，筛选出与之相互作用的蛋白基因11种。其中，有基因编码的蛋白属于14-3-3家族的蛋白，通过结合磷酸丝氨酸，遏制蛋白介导信号转导，他普遍存在与动、植物中，编码的蛋白与RAF1和CD25磷酸酶相互作用，在连接有丝分裂信号和细胞周期中起重要作用^[9-17]。脑膜炎球菌PorA蛋白用作疫苗是很有前途的，虽然已经搞清楚这个蛋白的结构，但是对他的结构与PorA蛋白抗体的关系还知知甚少，研究发现可能主要与效应器功能活动和可变区基因序列有关^[18]。由RNA多聚酶III引起转录包含多聚酶的复原，启动，延伸，终止的步骤。多聚酶III由16个亚单位组成，一部分受HeLa细胞修饰，能分解成hRPC32、hRPC39、hRPC62亚复合物，但他的核心缺乏亚复合物，不能与附属因子连接而使启动子依赖的转录起动。特有的转录启动能力需要自然亚复合物恢复。亚单位的一部分与RNA多聚酶III转录起始因子的两个亚复合物(hTBP/hTFIIB90)相互作用。这些说明hRPC32-hRPC39-hRPC62亚复合物经TFIIB、hRPC39相互作用指导RNA多聚酶III结合到TFIIB-DNA复合物^[19-21]，提示NS5ATP9可能与转录有关。烟草有丝分裂原激活蛋白激酶在细胞的分裂中起重要作用，而NS5ATP9能与他相互作用，提示他可能与肝细胞的分化有关^[22]。SLIT2是一种分泌型的富含亮氨酸重复区的蛋白质，有明确的肿瘤抑制作用，SLIT2转染COS-7细胞的培养液能延缓细胞的生长和诱导SW48结肠癌细胞凋亡，SLIT2的过表达可以抑制70%的体外培养乳腺癌细胞的集落化生长，在发生肺癌及乳腺癌时，由于其启动子的甲基化或等位基因的丢失而导致其失活^[23-26]。铁蛋白是主要铁储存蛋白，由两部分亚基(重链和轻链)构成。基因分析显

示他由多基因家族或者多个外显子编码。细胞内铁蛋白的生物合成受铁的调节，他是翻译调节的顺式元件，在铁蛋白重链5'-非翻译前导区。鼠纤维母细胞瞬时转染体\稳定转化体能激活人铁蛋白重链mRNA的转录。mRNA翻译是基因表达调控的重要机制，不同亚单位说明铁吸收、存储、释放的不同。铁蛋白重链使细胞内铁分离，刺激铁调节蛋白2的表达，c-myc抑制了他的表达而使铁库储存铁增加。这就调控细胞内铁的浓度，对细胞增生调控起重要作用^[27-36]。

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对NS5ATP9生物学功能的影响及其确切的作用，为寻找与HCVNS5A的靶位相互作用的蛋白开辟新道路。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

- Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C-viral infection in Japan. *Hepatology* 1995;22:1883-1885
- Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yeast two hybrid 'bait' vector in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002; 10:129-132
- Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002; 185:471-486
- Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 1997;91: 961-971
- Conklin DS, Galaktionov K, Beach D. 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7892-2896
- Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Honore B, Andersen AH, Walbum E, Vandekerckhove J, Celis JE. Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signaling pathway. *J Mol Biol* 1993;231:982-998
- Yu T, Robb VA, Singh V, Gutmann DH, Newsham IF. The 4.1/ezrin/radixin/moesin domain of the DAL-1/Protein 4.1B tumour suppressor interacts with 14-3-3 proteins. *Biochem J* 2002;365:783-789

- 13 O' Kelly I, Butler MH, Zilberberg N, Goldstein SA. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 2002;111:577-588
- 14 Li Y, Inoki K, Yeung R, Guan KL. Regulation of TSC2 by 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 2002;277:44593-44596
- 15 Shumway SD, Li Y, Xiong Y. 14-3-3beta binds to and negatively regulates the tuberous sclerosis complex 2(TSC2) tumor suppressor gene product, tuberin. *J Biol Chem* 2003;278:2089-2092
- 16 Li Y, Inoki K, Vacratsis P, Guan KL. The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3. *J Biol Chem* 2003;278:13663-13671
- 17 Parvaresch S, Yesilkaya T, Baer K, Al-Hasani H, Klein HW. 14-3-3 binding to the IGF-1 receptor is mediated by serine autophosphorylation. *FEBS Lett* 2002;532:357-362
- 18 Wang J, Jarvis GA, Achtman M, Rosenqvist E, Michaelsen TE, Aase A, Griffiss JM. Functional activities and immunoglobulin variable regions of human and murine monoclonal antibodies specific for the P1.7 PorA protein loop of Neisseria meningitidis. *Infect Immun* 2000;68:1871-1878
- 19 Wang Z, Roeder RG. Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* 1997;11:1315-1326
- 20 Jones E, Kimura H, Vigneron M, Wang Z, Roeder RG, Cook PR. Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against subunits of human RNA polymerases I, II, and III. *Exp Cell Res* 2000;254:163-172
- 21 Hu P, Wu S, Sun Y, Yuan CC, Kobayashi R, Myers MP, Hernandez N. Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol Cell Biol* 2002;22:8044-8055
- 22 Calderini O, Glab N, Bergounioux C, Heberle-Bors E, Wilson C. A novel tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase. *J Biol Chem* 2001;276:18139-18145
- 23 Allol A, Morton D, Maher ER, Latif F. SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63:1054-1058
- 24 Allol A, Da Silva NF, Viacava P, Minna JD, Bieche I, Maher ER, Latif F. SLIT2, a human homologue of the *Drosophila* Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. *Cancer Res* 2002;62:5874-5880
- 25 Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 1999;400:331-336
- 26 Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M. Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 1999;96:771-784
- 27 Boyd D, Jain SK, Crampton J, Barrett KJ, Drysdale J. Isolation and characterization of a cDNA clone for human ferritin heavy chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4751-4755
- 28 Costanzo F, Santoro C, Colantuoni V, Bensi G, Raugei G, Romano V, Cortese R. Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for a human apoferritin H chain: evidence for a multigene family. *EMBO J* 1984;3:23-27
- 29 Boyd D, Vecoli C, Belcher DM, Jain SK, Drysdale JW. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *J Biol Chem* 1985;260:11755-11761
- 30 Worwood M, Brook JD, Cragg SJ, Hellkuhl B, Jones BM, Perera P, Roberts SH, Shaw DJ. Assignment of human ferritin genes to chromosomes 11 and 19q13.3-19qter. *Hum Genet* 1985;69:371-374
- 31 Costanzo F, Colombo M, Staempfli S, Santoro C, Marone M, Frank R, Delius H, Cortese R. Structure of gene and pseudogenes of human apoferritin H. *Nucleic Acids Res* 1986;14:721-736
- 32 Chou CC, Gatti RA, Fuller ML, Concannon P, Wong A, Chada S, Davis RC, Salser WA. Structure and expression of ferritin genes in a human promyelocytic cell line that differentiates in vitro. *Mol Cell Biol* 1986;6:566-573
- 33 Hentze MW, Keim S, Papadopoulos P, O'Brien S, Modi W, Drysdale J, Leonard WJ, Harford JB, Klausner RD. Cloning, characterization, expression, and chromosomal localization of a human ferritin heavy-chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7226-7230
- 34 Dhar M, Chauthaiwale V, Joshi JG. Sequence of a cDNA encoding the ferritin H-chain from an 11-week-old human fetal brain. *Gene* 1993;126:275-278
- 35 Wu KJ, Polack A, Dalla-Favera R. Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 1999;283:676-679
- 36 Cozzi A, Corsi B, Levi S, Santambrogio P, Albertini A, Arosio P. Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem* 2000;275:25122-25129

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

应用白细胞cDNA文库的酵母双杂交技术筛选HCTP4结合蛋白基因

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东

刘敏, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
成军, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东, 中国人民解放军第302医院传染病研究所
基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
刘敏, 女, 1969-02-19生, 陕西省西安市人, 主治医师, 西安交通大学2000
级内科学在读博士研究生
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第
302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实
验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening of HCTP4 interacting proteins in leukocytes by yeast-two hybrid technique

Min Liu, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Lin Wang, Qing Shao,
Jian Zhang, Yao-Dong Liang,

Min Liu, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Lin Wang, Qing Shao, Jian Zhang,
Yao-Dong Liang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious
Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation,
No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique
Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for
Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth
Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5
Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center,
Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100
Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the biological function of HCTP4, yeast-
two hybrid was performed to screen proteins interacting
with HCTP4 in leukocytes.

METHODS: The HCTP4 gene was amplified by polymerase
chain reaction (PCR) and HCTP4 bait plasmid was con-
structed by using yeast-two hybrid system 3, then the con-
structed vector was transformed into yeast AH109. The
transformed yeast mated with yeast Y187 containing leu-
kocytes cDNA library plasmid in 2xYPD medium. Diploid
yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium
(SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient
medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing α -gal for se-
lecting two times and screening. After extracting and
sequencing of plasmid from blue colonies, we underwent
analysis by bioinformatics.

RESULTS: Forty-four colonies were sequenced, among

which twenty-five colonies were immunoglobulin lambda
light chain, six human DNA sequences from clone RP11-
189K21, four human DNA sequences from clone RP11-
507C10, two homo sapiens 12p BAC RPCI11-75L1, one
homo sapiens BAC clone RP11-21M10, one homo sapiens
ubiquitin ligase mind bomb (MIB), one homo sapiens genomic
DNA, chromosome 11 clone: RP11-867O8, one human DNA
sequence from clone RP3-509I19, one homo sapiens small
nuclear ribonucleoprotein polypeptide G, one homo sapiens
UMP-CMP kinase (UMP-CMPK), and a new gene.

CONCLUSION: Genes of HCTP4 interacting proteins in leu-
kocytes are successfully cloned and the results bring some
new clues for studying the biological functions of HCTP4
and associated proteins.

Liu M, Cheng J, Zhang SL, Wang L, Shao Q, Zhang J, Liang YD.
Screening of HCTP4 interacting proteins in leukocytes by yeast-two
hybrid technique. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):832-835

摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与HCTP4蛋白结合
的蛋白的编码基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增 HCTP4 基因, 连接入
酵母表达载体 pGBTKT-7 中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞
AH109 并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的
酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重
筛选阳性菌落, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌(DH5 α),
提出质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出 HCTP4 基因并在酵母细胞中表达, 配合
后选出在四缺(SD/-Trp - Leu - Ade - His)培养基及铺有 X- α -
半乳糖(X- α -gal)的四重缺陷培养基上均能生长并变成蓝色
的真阳性菌落 44 个, 其中 25 个免疫球蛋白 λ 轻链; 6 个来
自 RP11-189K21 克隆的人 DNA 序列; 4 个来自 RP11-
507C10 克隆的人 DNA 序列; 2 个人 BAC 克隆 RPCI11-
75L1; 1 个人 BAC 克隆 RP11-21M10; 1 个人 遍素酶智能弹
(MIB); 1 个来自 RP11-867O8 克隆的人 DNA 基因; 1 个来
自 RP3-509I19 克隆的人 DNA 序列; 1 个小核糖核蛋白 G;
1 个 UMP-CMP 激酶; 1 个新基因。

结论: 成功克隆出 HCTP4 的结合蛋白, 为进一步研究丙型
肝炎病毒(HCV)的作用提供了新线索。

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东. 应用白细胞 cDNA 文库的酵母双
杂交技术筛选 HCTP4 结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):832-835
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/832.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组为一线状单股正链 RNA 病毒, 属黄病毒属。由编码区、5' - 非编码区和3' - 非编码区组成。编码区包括两部分, 即结构区与非结构区。前者较保守, 后者易发生变异。结构区分 C 区和 E 区, 相应的编码物分别是核心蛋白和囊膜蛋白, 由他们组成病毒颗粒。HCV 核心蛋白位于病毒多肽的氨基末端, 被宿主的信号肽酶切割后产生。丙型肝炎病毒核心蛋白除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外, 还具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能, 其氨基酸序列高度保守, 临床和实验研究显示 HCV 核心(core)蛋白与肝硬化、肝细胞癌(HCC)发生发展过程密切相关^[1-2]。为了从不同的角度对HCV核心蛋白的反式调节基因进行验证及研究, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)和分子克隆方法对 HCV 核心蛋白反式调节的靶基因成功地进行了筛选和克隆, 并将其中一新的靶基因命名为 HCTP4^[3], 为更加广泛深入地研究HCV核心蛋白的反式调节基因HCTP4, 我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中与 HCTP4 结合蛋白基因。

1 材料和方法

1.1 材料 *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、cDNA 淋巴文库、以上产品均购自 Clontech 公司。酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基 SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, X- 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

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 HCTP4 的酵母表达载体 pGBK7-HCTP4 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109 由本室构建。

1.2.2 酵母淋巴文库的构建 cDNA 淋巴文库进行增菌后, 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 1×10^9 细胞 /mL。

1.2.3 诱饵与淋巴文库的酵母配合 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于 1×10^9 细胞 /mL)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。

1.2.4 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒。提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序。阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank

比对, 进行生物信息学分析, 并把所获新的基因存入 GenBank 数据库。

2 结果

2.1 cDNA 测序与同源性分析初步结果 配合后筛选出既能在 4 重缺陷(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有 X- α -gal 的 4 重缺陷培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 44 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较。其中有 1 个克隆为新基因, 其余 43 个均与已知基因的部分序列高度同源(93-100%), 详细结果见表 1。

表 1 HCTP4 蛋白结合的白细胞中蛋白的类型

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	免疫球蛋白 λ 轻链	95%	25
2	来自 RP11-189K21 克隆的人 DNA 序列	99%	6
3	来自 RP11-507C10 克隆的人 DNA 序列	95%	4
4	人 BAC 克隆 RPCI11-75L1	99%	2
5	人 BAC 克隆 RP11-21M10	96%	1
6	人遍素酶智能弹(MIB)	100%	1
7	来自 RP11-867O8 克隆的人 DNA 基因	99%	1
8	来自 RP3-509I19 克隆的人 DNA 序列	93%	1
9	小核糖核蛋白 G	100%	1
10	UMP-CMP 激酶	99%	1
11	新基因	100%	1

3 讨论

研究新基因的结构与功能是目前分子生物学研究领域中最具挑战性的工作之一, 可以从不同角度入手^[4-5]。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。该方法建立以来, 经过不断的完善和发展, 不但可以检测已知蛋白质之间的相互作用, 更重要的在于发现新的与已知蛋白质相互作用的未知蛋白。蛋白质与蛋白质的相互作用是很多生命现象的基础^[6-9]。本研究应用的是酵母双杂交系统 3 (Clontech 公司商品化的双杂交系统), 由于有 3 个表达基因用来筛选及严格的对照, 其阳性率达 95% 以上, 假阳性率 5% 以下。

我们在真核表达载体 pGBK-T7 中构建 pGBK7-HCTP4 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HCTP4 基因, 与人淋巴 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合。挑取阳性克隆 44 个, 筛选出与 HCTP4 相互作用的蛋白基因 11 种, 其中免疫球蛋白 λ 轻链、智能弹(mind bomb, MIB)、小核糖核蛋白 G、UMP-CMP 激酶与免疫调节、信号转导及能量供给等作用相关。

本研究挑取阳性克隆 44 个, 其中免疫球蛋白 λ 轻链 25 个, 占 56.8%。用抑制性消减杂交法筛选 HCV 肿瘤相关性基因显示免疫球蛋白轻链与染色体易位及核

苷酸修复有关^[10]。高度保守的HCV核心蛋白具有免疫调节功能^[11-12]，HCV核心蛋白与免疫球蛋白轻链的相互作用在HCV患者慢性化及肿瘤发生中起一定作用。我们用酵母双杂交法进一步证明了HCV核心蛋白的反式调节基因HCTP4与免疫调节相关。

智能弹(mind bomb, MIB)是一种泛素酶，是通过Delta有效激活Notch信号的基础。MIB与细胞内Delta区相互作用促进他的内在化和遍在性。细胞移植研究表明MIB的功能是有效的激活邻近细胞Notch的信号基础^[13]。穿膜蛋白Notch作为信号受体，穿膜蛋白Delta作为配体介导几个不同组织的细胞分化信号。Notch信号可能是从细胞表面直接传递到细胞核，Notch受体在正常发育和肿瘤发生中均有重要作用^[14]。

在剪接体装配的早期阶段小核糖核蛋白是必需的，核糖核蛋白复合物为核前-mRNA剪接提供动力^[15]。核苷单磷酸激酶(UMP/CMP)位于细胞质和细胞核^[16]，催化三磷酸腺苷(ATP)末端的磷酸盐转移到UMP或CMP^[17]。动力学分析表明UMP/CMP激酶优先选择用ATP作为磷酸盐供体，但UMP和CMP作为磷酸盐受体是平等的^[18]。Liou et al^[19]研究显示UMP/CMP激酶对于细胞核酸合成所需的UDP，CDP和dCDP的形成有重要的作用。Pasti et al^[20]报道UMP-CMP激酶在UTP，CTP和dCTP磷酸化作用中具有重要的催化作用。细胞激酶磷酸化作用在核酸类似物的抗病毒治疗中是必需的。几种胞苷和脱氧胞苷是重要的抗肿瘤和抗病毒药，这些药物在发挥治疗作用要求逐步磷酸化作用到他们的三磷酸盐结构。UMP/CMP激酶对于核酸类似物的磷酸化作用已明确。通过细胞酶磷酸化脱氧胞苷是活化这些物质的首要条件^[16, 20]。

丙型肝炎病毒核心蛋白长191aa，是一种多功能蛋白质，具有调节细胞凋亡^[21-23]、脂代谢^[24]、转录、免疫呈递等作用^[25]。尽管循环中可见到HCV抗体，但HCV患者感染仍持续且可进展到肝硬化、肝癌^[26]。HCV不但在肝细胞复制，而且在单核细胞、B细胞和T细胞也可复制^[27-32]。HCV感染外周血细胞改变免疫细胞功能，引起无效的免疫反应在HCV发病机制中有重要作用^[33]。HCV核心蛋白具有广泛的反式激活作用^[34-35]，与宿主蛋白相互作用，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。我们用酵母双杂交法筛选与HCTP4相互作用的蛋白，进一步验证了HCV具有免疫调节、信号转导等多种功能。

4 参考文献

- 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997;37-42.
- 刘妍, 成军. HCV致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:10-13.
- 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.
- Lahm A, Yagnik A, Tramontano A, Koch U. Hepatitis C virus proteins as targets for drug development: the role of bioinformatics and modelling. *Curr Drug Targets* 2002;3:281-296.

- Walewski JL, Gutierrez JA, Branch-Elliman W, Stump DD, Keller TR, Rodriguez A, Benson G, Branch AD. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA* 2002;8:557-571.
- Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98.
- Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376.
- Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454.
- Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486.
- Kotaka M, Chen GG, Lai PB, Lau WY, Chan PK, Leung TW, Li AK. Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus by suppression subtractive hybridization. *Oncol Res* 2002;13:161-167.
- Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbelenya AE, Lo SY, Ou JH, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:1301-1309.
- Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:9417-9426.
- Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ, Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, Ariza-McNaughton L, Weissman AM, Lewis J, Chandrasekharappa SC, Chitnis AB. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* 2003;4:67-82.
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science* 1995;268:225-232.
- Labourier E, Rio DC. Purification of Drosophila snRNPs and characterization of two populations of functional U1 particles. *RNA* 2001;7:457-470.
- Van Rompay AR, Johansson M, Karlsson A. Phosphorylation of deoxycytidine analog monophosphates by UMP-CMP kinase: molecular characterization of the human enzyme. *Mol Pharmacol* 1999;56:562-569.
- Schlichting I, Reinstein J. Structures of active conformations of UMP kinase from Dictyostelium discoideum suggest phosphoryl transfer is associative. *Biochemistry* 1997;36:9290-9296.
- Zhou L, Lacroute F, Thorneburg R. Cloning, expression in Escherichia coli, and characterization of Arabidopsis thaliana UMP/CMP kinase. *Plant Physiol* 1998;117:245-254.
- Liou JY, Dutschman GE, Lam W, Jiang Z, Cheng YC. Characterization of human UMP/CMP kinase and its phosphorylation of D-and L-form deoxycytidine analogue monophosphates. *Cancer Res* 2002;62:1624-1631.
- Pasti C, Gallois-Montbrun S, Munier-Lehmann H, Veron M, Gilles AM, Deville-Bonne D. Reaction of human UMP-CMP kinase with natural and analog substrates. *Eur J Biochem* 2003;270:1784-1790.
- 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.
- Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002;296:84-93.
- Zhu N, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology* 2001;283:178-187.

- 24 Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G, Lotteau V. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 2002;76:6919-6928
- 25 McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000;7:2-14
- 26 Chien DY, Choo QL, Ralston R, Spaete R, Tong M, Houghton M, Kuo G. Persistence of HCV despite antibodies to both putative envelope glycoproteins. *Lancet* 1993;342:933
- 27 Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zeldis JB. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992;166:1276-1280
- 28 Bronowicki JP, Loriot MA, Thiers V, Grignon Y, Zignego AL, Brechot C. Hepatitis C virus persistence in human hematopoietic cells injected into SCID mice. *Hepatology* 1998;28:211-218
- 29 Chang TT, Young KC, Yang YJ, Lei HY, Wu HL. Hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: comparing acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1996;23:977-981
- 30 Lerat H, Berly F, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspe G. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996;97:845-851
- 31 Saleh MG, Tibbs CJ, Koskinas J, Pereira LM, Bomford AB, Portmann BC, McFarlane IG, Williams R. Hepatic and extrahepatic hepatitis C virus replication in relation to response to interferon therapy. *Hepatology* 1994;20:1399-1404
- 32 Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993;74:669-676
- 33 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
- 34 Bergqvist A, Rice CM. Transcriptional activation of the interleukin-2 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2001;75:772-781
- 35 Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus core protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on Egr1 and Sp1 sites. *Virology* 2001;283:167-177

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 电子版

《World Journal of Gastroenterology, WJG》网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于 2003-04-15 开通, 截止 2003-10-26 点击率已达 452392 人次。WJG 电子版由以下 7 个栏目组成。(1)期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子。(2)出版: 出版, 版权, 征订。(3)投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式。(4)新闻: IM 收录期刊、JCR 报道的影响因子。(5)投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计 28 项。(6)电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引。WJG 电子期刊功能包括 HTM、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等。

(7) 参考文献链接: WJG 对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID 等内容的正确性, 并与 PubMed 和 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp> 中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要。

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

应用酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库与NS5ATP1结合蛋白基因

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东

刘敏, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
成军, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东, 中国人民解放军第302医院传染病研究所
基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
刘敏, 女, 1969-02-19生, 陕西省西安市人, 主治医师, 西安交通大学2000
级内科学在读博士研究生。
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“十一、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第
302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实
验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening of NS5ATP1 interacting proteins in leukocytes by yeast-two hybrid technique

Min Liu, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Lin Wang, Qing Shao,
Jian Zhang, Yao-Dong Liang,

Min Liu, Jun Cheng, Shu-Lin Zhang, Lin Wang, Qing Shao, Jian Zhang,
Yao-Dong Liang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the biological function of NS5ATP1 and to screen proteins in leukocytes interacting with NS5ATP1 by yeast-two hybrid.

METHODS: The NS5ATP1 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and NS5ATP1 bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3, then the constructed vector was transformed into yeast AH109. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing leukocytes cDNA library plasmid in 2×YPD medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing α -gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, the results were analyzed by bioinformatics.

RESULTS: Ten colonies were sequenced, among which two

colonies were human HLA-B27 mRNA, two homo sapiens arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial) (ASNA1) gene, one homo sapiens haplotype E22i mitochondrion, one homo sapiens pyrin (MEFV) gene, one homo sapiens cofilin 1, one homo sapiens chromosome 15, one homo sapiens chromosome 17, clone RP11-353N14, and one new gene.

CONCLUSION: Genes of NS5ATP1 interacting proteins in leukocytes are successfully cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of NS5ATP1 and associated proteins.

Liu M, Cheng J, Zhang SL, Wang L, Shao Q, Zhang J, Liang YD. Screening of NS5ATP1 interacting proteins in leukocytes by yeast-two hybrid technique. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):836-839

摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与NS5ATP1结合蛋白的编码基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增NS5ATP1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(DH5 α), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出NS5ATP1基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基及铺有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10个, 其中2个人HLA-B27; 2个人亚砷酸盐转移子(arsA); 1个人单倍型E22i线粒体; 1个人pyrin (MEFV); 1个人肌动蛋白素1(cofilin 1); 1个人染色体15; 1个来自RP11-353N14克隆人的DNA基因, 位于染色体17; 1个新基因。

结论: 成功克隆出NS5ATP1的结合蛋白, 为进一步研究HCV的作用提供了新线索。

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东. 应用酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库与NS5ATP1结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):836-839

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/836.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组为一线状单股正链RNA病

毒, 属黄病毒属. 丙型肝炎病毒(HCV)的感染不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生密切相关. 病毒性肝炎的发病机制中涉及到复杂的反式调节机制^[1-2]. 肝炎病毒的反式调节机制至少包括三方面的含义: 一方面是肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因组表达调节的反式调节, 即肝炎病毒蛋白与肝细胞基因组启动子 DNA 结合, 对于肝细胞基因表达谱产生影响; 第二方面是肝细胞蛋白对于肝炎病毒基因表达的反式调节; 第三方面是肝炎病毒蛋白对于肝炎病毒基因组的反式调节. 关于肝炎病毒反式调节机制的研究, 从理论上可以加深对于肝炎病毒的分子生物学调节控制的深入了解, 为探索抗肝炎病毒的新技术、新疗法奠定坚实的理论基础^[3]. 为了从不同的角度对HCV NS5A的反式调节基因进行验证及研究, 我们应用抑制性消减杂交技术(cDNA microarray)和分子克隆方法对 HCV NS5A 反式调节的靶基因成功地进行了筛选和克隆, 并将其中一新的靶基因命名为 NS5ATP1^[4], 为更加广泛深入地研究 HCV NS5A 的反式调节基因 NS5ATP1, 我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中与 NS5ATP1 结合蛋白基因.

1 材料和方法

1.1 材料 *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、预转化的cDNA白细胞文库Y187酵母株(K1612-1)、酵母YPD 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)等均购自 Clontech 公司, 半硫氨酸腺苷、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. cDNA 白细胞文库插入序列扩增引物(P1:5'-TAC CAC TAC AAT GGA TG-3', 2:5' -TTT TCA GTA TCT ACG AT-3')合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 PCR 扩增 NS5ATP1 基因, 与酵母表达载体 pGBKT7 连接, 酶切鉴定后用醋酸锂法将 pGBKT7- NS5ATP1 转入酵母细胞 AH109.

1.2.2 酵母白细胞文库的构建 cDNA 白细胞文库进行增菌后, 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 1×10^9 细胞 /mL.

1.2.3 诱饵与白细胞文库的酵母配合 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于 1×10^9 细胞/mL)与白细胞文库混合, 30 °C 轻摇配合过夜, 20-24 h 后可见少许颗粒状物, 显微镜下可见三叶状体. 将配合产物铺板, SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 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.

1.2.4 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落, 用 cDNA 白细胞插入序列引物做 PCR 扩增, 行凝胶电

泳有阳性条带后按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 比对, 进行生物信息学分析, 并把所获新的基因存入 GenBank 数据库.

2 结果

2.1 pGBKT7- NS5ATP1 诱饵质粒的构建及表达 利用自行设计的引物成功克隆出 NS5ATP1 基因, 酶切鉴定与预期片段符合后连接到用相同酶所切的 pGBKT7 载体中. 再次酶切鉴定结果正确. 由此表明 NS5ATP1 已按正确方向克隆入酵母表达载体 pGBKT7 中, pGBKT7- NS5ATP1 诱饵质粒构建成功.

2.2 配合后 cDNA 筛选配合后筛选出既能在 4 缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有 X- α -gal 的 4 缺培养基上生长并变成蓝色的真阳性菌落 10 个, 行 PCR 验证有插入序列, 结果见图 1.

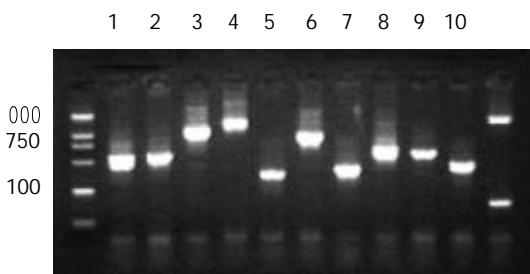


图 1 文库扩增筛选菌落 PCR 扩增结果.

2.3 cDNA 测序与同源性分析初步结果 阳性菌落测序后, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中有 1 个克隆为新基因, 其余 9 个均与已知基因的部分序列高度同源(98-100%), 详细结果见表 1.

表 1 NS5ATP1 蛋白结合的白细胞中蛋白的类型

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	人 HLA-B27	98%	2
2	人亚砷酸盐转移子(arsA)	100%	2
3	人单倍型 E22i 线粒体	99%	1
4	人 pyrin (MEFV)	99%	1
5	人肌动蛋白素 1(cofilin 1)	99%	1
6	人染色体 15	98%	1
7	来自 RP11-353N14 克隆的人 DNA 基因, 位于染色体 17	100%	1
8	新基因	100%	1

3 讨论

丙型肝炎病毒基因编码一多聚蛋白的前体可被宿主和病毒的蛋白酶切割产生至少 10 个独特的蛋白. HCV 非

结构蛋白5A(HCV NS5A)基因(位于6 258-7 601 bp之间)编码的56 kD的NS5A蛋白(448 aa)具有多种生物学功能,除了参与HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程外,NS5A蛋白还是一种作用很强的转录激活因子,能够影响细胞信号转导途径,激活多种病毒及细胞基因启动子,调控着细胞基因的转录,与感染HCV的细胞发生恶性转化过程密切相关^[5-8].不同磷酸化形式的NS5A蛋白具有反式激活作用也是目前关于NS5A生物学功能研究的热点,推测NS5A蛋白的这种反式激活作用,可能是HCV感染与肝细胞癌发生发展密切相关的重要的分子生物学机制^[9-10].

我们用酵母双杂交技术对新基因NS5ATP1进行进一步研究获得10个阳性克隆.其中人白细胞抗原2个.HCV的免疫发病机制为众多的研究所证实,尽管血中出现HCV抗体,但HCV仍持续感染,考虑机体不能产生有效的免疫清除病毒^[11-14].HCV持续感染与遗传性免疫缺陷和紊乱有关^[15].患者人白细胞抗原与HCV的基因型、疾病的预后、干扰素的疗效有关^[16-17].本研究证实NS5A相关基因NS5ATP1可与ILA-B27结合,可能影响机体免疫系统.

亚砷酸盐是一种强毒性和致癌物,与三价和五价离子反应影响多种生物化学过程.在细菌,亚砷酸盐的解毒作用通过特有的染色体和质粒传递的操纵子编码的流出系统分别传递低水平和高水平的抗亚砷酸盐物质完成.亚砷酸盐质粒携带的砷操纵子由两个调节基因(ArsR and ArsD)及三个结构基因(ArsA, ArsB, and ArsC)组成^[18].ArsA,外周膜阴离子易位的ATP酶ArsAB的外周膜成分,通过一个连接子序列相连^[19].氧化阴离子依赖性的ATP酶由ArsA基因编码且与ArsB编码通道穿膜蛋白相关.ArsC是一种亚砷酸盐还原酶.在大肠杆菌,ArsA与ArsB共同操纵穿膜通道,使亚砷酸盐流出.人源性细菌ArsA(hARSA-I)与细菌arsA类似,是非穿膜区ATP酶超家族的一员.Southern和Northern分析表明在人基因有两个杂交基因且许多组织表达hARSA-I.Western分析表明交叉反应的37 kDa和42 kDa蛋白存在于两个不同的人细胞系.hARSA-I与细菌ArsA不同hASNA-I是亚砷酸盐诱导的而不是亚砷酸盐依赖的ATP酶,但与细菌ArsA有一些相同的生化特性^[20].肝脏是机体的解毒器官,HCV感染引起肝功能损伤,毒性产物蓄积.本研究证实NS5ATP1可与ArsA结合,影响机体的解毒功能.

FMF是一种隐性遗传性疾病,特征性表现是间断发作性的发热、疼痛.典型发作持续1-3 d,伴随病变部位大量白细胞积聚.FMF的反应基因称为MEFV,MEFV基因位于16号染色体短臂,编码抗炎性蛋白,他的蛋白产物称为pyrin或marenostatin^[21].Pyrin是一种781个氨基酸的蛋白,以组织限制性的方式存在于中性白细胞、单核细胞和嗜酸细胞及皮肤纤维组织、滑膜、和腹膜.pyrin是含PyD蛋白家族的一员,可能与凋亡、

炎症和天然免疫有关.用酵母双杂交方法证实pyrin可与长195 aa的凋亡颗粒蛋白ASC结合,ASC是一种凋亡前蛋白,在HL-60细胞,反义的ASC多聚核酸可阻止抗肿瘤药依托泊甙诱导的凋亡.ASC转染细胞可形成颗粒,ASC与pyrin共转染细胞,颗粒阳性细胞增加且存活时间延长.免疫荧光研究显示pyrin与ASC共同定位于颗粒.并证实pyrin在凋亡通道中有作用^[22-23].Pyrin在成熟的中性粒细胞表达,推测具有炎性调节因子作用.体外用炎前因子γ干扰素、肿瘤因子、脂多糖刺激单核细胞可诱导MEFV表达增加,而抗炎因子IL-4、IL-10和转移生长因子抑制这种表达^[24].Mansfield et al^[25]证实pyrin在白细胞细胞支架水平调节炎性反应.本研究证实NS5ATP1与pyrin结合,从而参与炎症反应及细胞凋亡.

肌动蛋白素(Cofilin)通过切断肌动蛋白丝和增加解聚作用在肌动蛋白动力中发挥重要作用.肌动蛋白细胞骨架识别在许多细胞基础活动中扮演重要脚色,包括细胞移动、黏附、形态发生和细胞动力.Cofilin的活性通过磷酸化和去磷酸化可逆调节.Cofilin调节肌动蛋白细胞骨架改型从而影响许多细胞的活性,包括细胞能动性、黏附性和细胞分裂.肌动蛋白的识别常常通过细胞外刺激启动,如结合生长因子和化学吸引剂细胞表面受体和基质蛋白整合素受体.肌动蛋白丝运动经历肌动蛋白识别,通过几种肌动蛋白结合蛋白协同调节.其中,cofilin和他相关的因子肌动蛋白解聚因子(ADF)结合肌动蛋白单体、丝且有效的解聚和切断肌动蛋白丝.因此,他们在快速转换肌动蛋白丝中有重要作用.本研究证实NS5ATP1与肌动蛋白素结合,影响细胞的基础活动^[26-27].

尽管循环中可见到HCV抗体,但HCV患者感染仍持续且可进展到肝癌、肝硬化.HCV不但在肝细胞复制,而且在单核细胞、B细胞和T细胞也可复制.HCV感染外周血细胞改变免疫细胞功能,引起无效的免疫反应在HCV发病机制中有重要作用.我们用酵母双杂交方法筛选出NS5ATP1结合蛋白,表明NS5ATP1在干预细胞免疫、参与炎性反应和细胞凋亡、影响细胞解毒及细胞的基础活动中有一定作用.NS5ATP1作为一个新基因其功能还需进一步研究.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997;37-42
- 2 刘妍, 成军. HCV致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 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 刘敏, 成军, 王琳, 张树林, 邵清, 张健, 梁耀东. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因1的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2004;12:代发表
- 5 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 6 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412

- 7 Ide Y, Zhang L, Chen M, Inchauspe G, Bahl C, Sasaguri Y, Padmanabhan R. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 1996;182:203-211
- 8 Gong GZ, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 9 Pawlotsky JM, Germanidis G. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 1999;6:343-356
- 10 Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21:4801-4811
- 11 Urbani S, Uggeri J, Matsuura Y, Miyamura T, Penna A, Boni C, Ferrari C. Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology* 2001;33:1533-1543
- 12 Hue S, Cacoub P, Renou C, Halfon P, Thibault V, Charlotte F, Picon M, Rifflet H, Piette JC, Pol S, Caillat-Zucman S. Human leukocyte antigen class II alleles may contribute to the severity of hepatitis C virus-related liver disease. *J Infect Dis* 2002;186:106-109
- 13 Penna A, Missale G, Lamonaca V, Pilli M, Mori C, Zanelli P, Cavalli A, Elia G, Ferrari C. Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;35:1225-1236
- 14 Nelson DR. The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:931-953
- 15 Isagulants MG, Ozeretskovskaya NN. Host background factors contributing to hepatitis C virus clearance. *Curr Pharm Biotechnol* 2003;4:185-193
- 16 Renou C, Halfon P, Pol S, Cacoub P, Jouve E, Bronowicki JP, Arpurt JP, Rifflet H, Picon M, Causse X, Canva V, Denis J, Tran A, Bourliere M, Ouzan D, Pariente A, Dantin S, Alric L, Cartier V, Reville M, Caillat-Zucman S. Histological features and HLA class II alleles in hepatitis C virus chronically infected patients with persistently normal alanine aminotransferase levels. *Gut* 2002;51:585-590
- 17 Yu ML, Dai CY, Chen SC, Chiu CC, Lee LP, Lin ZY, Hsieh MY, Wang LY, Chuang WL, Chang WY. Human leukocyte antigen class I and II alleles and response to interferon-alpha treatment, in Taiwanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003;188:62-65
- 18 Kurdi-Haidar B, Heath D, Aebi S, Howell SB. Biochemical characterization of the human arsenite-stimulated ATPase (hASNA-I). *J Biol Chem* 1998;273:22173-22176
- 19 Jia H, Kaur P. Biochemical evidence for interaction between the two nucleotide binding domains of ArsA. Insights from mutants and ATP analogs. *J Biol Chem* 2003;278:6603-6609
- 20 Kurdi-Haidar B, Aebi S, Heath D, Enns RE, Naredi P, Hom DK, Howell SB. Isolation of the ATP-binding human homolog of the arsA component of the bacterial arsenite transporter. *Genomics* 1996;36:486-491
- 21 Cattan D, Dervichian M. Familial Mediterranean fever. *Rev Prat* 2002;52:149-154
- 22 Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, Gumucio DL. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:39320-39329
- 23 Fairbrother WJ, Gordon NC, Humke EW, O'Rourke KM, Starovasnik MA, Yin JP, Dixit VM. The PYRIN domain: a member of the death domain-fold superfamily. *Protein Sci* 2001;10:1911-1918
- 24 Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, Kingma DW, Horwitz ME, Mansfield E, Holland SM, O' Shea JJ, Rosenberg HF, Malech HL, Kastner DL. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000;95:3223-3231
- 25 Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentijevich I, Kastner DL. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood* 2001;98:851-859
- 26 Toshima J, Toshima JY, Amano T, Yang N, Narumiya S, Mizuno K. Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell* 2001;12:1131-1145
- 27 Idrissi FZ, Wolf BL, Geli MI. Cofilin, but not profilin, is required for myosin-I-induced actin polymerization and the endocytic uptake in yeast. *Mol Biol Cell* 2002;13:4074-4087

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

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 TAHCCP2 的调节基因

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 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 100039

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

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

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: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and identification of the genes transactivated by human gene 2 transactivated by hepatitis C virus core protein using microarray assay

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Chun-Hua Wang

Jian-Jun Wang, Yan Liu, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

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

Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To screen and identify the up- and down-regulated genes of TAHCCP2 in the hepatocyte, and to investigate its possible function of TAHCCP2 in vivo by cDNA microarray assay.

METHODS: Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatics techniques were used for screening and cloning of the target gene TAHCCP2 transactivated by HCV core protein. Total mRNA was isolated from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, cDNA was prepared by reverse transcription. Microarray was conducted for screening of up-and down-regulated genes of both HepG2 cells.

RESULTS: The expressive vector of pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. After screening with DNA microarray, we found that 4 genes were down-regulated.

CONCLUSION: The obtained sequences may be target

genes transactivated by TAHCCP2, among which some genes coding proteins involve inoxidative stress, cell growth and energy metabolism. Advanced experiments need to be done to prove this finding.

Wang JJ, Liu Y, Cheng J, Yang Q, Ji D, Dang XY, Xu ZQ, Wang CH. Screening and identification of the genes transactivated by human gene 2 transactivated by hepatitis C virus core protein using microarray assay. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):840-842

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片技术了解TAHCCP2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: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆HCV核心蛋白反式激活的新型靶基因 TAHCCP2. 以 TAHCCP2 表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-) 为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA. 应用基因表达谱芯片技术对差异表达mRNA进行检测和分析。

结果: TAHCCP2表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP2经酶切鉴定和DNA测序鉴定正确。经基因表达谱芯片分析, 4种基因的表达水平下调。

结论: 筛选到的一些与体内氧化应激、细胞生长和能量代谢相关的基因, 推测了TAHCCP2可能存在调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花. 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 TAHCCP2 的调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):840-842

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/840.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区. 多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中核心区(1-573 nt)编码的21 kDa HCV核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质, 在HCV致病过程中可能起着重要的作用^[1-5], 最近研究其与HCV感染后脂肪肝的形成也有一定关系^[6-9]. 本室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达 HCV 核心蛋白载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 结合生物信息学技术

(bioinformatics)克隆了核心蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2(TAHCCP2). 并应用基因表达谱芯片技术筛选与克隆 TAHCCP2 调节的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索, 为研究 HCV 的致病机制及探索未知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 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); FuGENE6 转染试剂(Roche), mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, 丙型肝炎病毒核心蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-core 由本室构建. T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega). DNA 序列测定由上海申友公司完成.

1.2 方法

1.2.1 消减杂交文库的建立及克隆分析 分别将 pcDNA3.1 (-)-core 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 按 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒扩增差异表达的 cDNA. 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 进行电子拼接, 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, 确定新型基因序列. 从 HepG2 细胞提取总 RNA, 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序列, 并测序证实, 命名为 HCV 核心蛋白反式激活基因 2(TAHCCP2), 在 GenBank 中注册, 注册号为 AY039043. TAHCCP2 基因的编码序列全长为 429 个核苷酸(nt), 编码产物由 142 个氨基酸残基(aa)组成.

1.2.2 真核表达载体及细胞转染 TAHCCP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 由本室构建. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.3 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 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.

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

1.2.5 芯片制备 包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号

转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000 bp-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用. 1.2.6 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+0.2% SDS、0.1% × SSC+0.2% SDS、0.1% × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干. 1.2.7 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 的表达载体构建 TAHCCP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 经测序及酶切鉴定均正确.

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

2.3 TAHCCP2 基因下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 TAHCCP2 的下调基因. 在本研究中发现有 4 种基因的表达水平下调(表 1), 未发现表达水平明显上调的基因.

表 1 TAHCCP2 基因下调基因类型

编号	Cy5/Cy3 比值	基因名称
1	0.096	谷胱甘肽过氧化物酶 2 (GPX2)
2	0.337	烯醇化酶 3 (ENO3)
3	0.467	HGF 激活因子(HGFAC)
4	0.467	人类假想蛋白

3 讨论

HCV 核心蛋白是一种多功能蛋白质, 具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能. 核心蛋白对细胞信号转导途径, 尤其是核因子-κB (NF-κB)、激活因子 1(AP-1)和血浆反应因子(SRE)相关途径具有明显的增强作用; 在 HepG2 细胞中, 核心蛋白激活人类 c-myc 基因、劳氏肉瘤病毒长末端重复序列(RSV LTR)和 SV40 早期启动子^[10]; 核心蛋白还能抑制或增强 p53 基因启动子功能^[11-12], 这些证据表明核心蛋白具有

潜在的致癌作用。Aoki et al [13]发现HCV核心蛋白通过和14-3-3蛋白相互作用表现出一种新型的Raf-1激酶激活蛋白特性，可能对肝细胞的生长起调节作用。HCV核心蛋白的反式激活功能在HCV致病中发挥重要的作用，研究其作用分子生物学机制有助于理解HCV感染的慢性化和致癌作用机制。

本室利用抑制性消减杂交技术对于表达HCV核心蛋白载体转染的HepG2细胞进行研究，结合生物信息学技术克隆了HCV核心蛋白反式激活作用的新靶基因，命名为HCV核心蛋白反式激活基因2(TAHCCP2)，并构建其真核表达载体TAHCCP2-3.1(-)。应用基因表达谱芯片技术筛选与克隆TAHCCP2调节的基因，推测其在体内可能存在功能的线索。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。本实验我们用分子生物学技术构建了TAHCCP2的真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP2，并用空载体作为阴性对照，利用脂质体转染HepG2细胞，之后从中提取总RNA，逆转录为cDNA，进行基因芯片技术分析。结果表明，4种基因的表达水平下调，无表达水平明显上调的基因。

在下调表达的基因中，谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)是参与体内氧化应激作用的重要的酶^[14-16]。氧化应激可导致体内活性氧簇(ROS)和ROS清除分子数量的失衡。这一过程中，GPX1可以减少细胞内大部分的ROS，起到重要作用。GPX1的过表达可以延迟细胞生长，保护他们不受GSH和过氧化氢毒性作用的损害^[17]。肝细胞生长因子激活剂(HGF-A)是一种常见的激活HGF的丝氨酸蛋白酶，可以使非活性状态的单链的肝细胞生长因子(HGF)转化为有活性的二聚体结构。HGF是一种多功能的多肽，参与肿瘤的生长，组织发生和损伤的修复。他的作用依赖与被HGFA激活和结合到特异的HGF受体(c-Met)上^[18]。研究发现HGF对于肝损伤后的修复、毛发生长、上皮细胞的分裂和抗凋亡因子的产生也有重要意义^[19-22]。烯醇化酶是参与体内糖酵解途径的酶类，其表达水平的降低可能会影响体内的能量代谢。

通过表达谱芯片技术对TAHCCP2的调节基因的分析，我们发现他所下调的3种基因涉及体内氧化应激、细胞生长和能量代谢，主要起到负性调节的作用。作为体内正常存在的基因，在HCV核心蛋白存在时表达增加，负性调节上述基因，可能与HCV感染后的发病机制有一定的关系。关于其在体内与各种活性因子的具体调节机制，仍需进一步实验来验证。

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 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 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 成军，李克，陆荫英，董菁，李莉，王琳，钟彦伟。丙型肝炎病毒调节

- 5 基因区结合蛋白的研究进展。世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 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 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
- 8 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
- 9 王琳，李克，成军，陆荫英，张健。丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用。世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 10 Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses:C-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 11 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 12 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- 13 Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-141
- 14 Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol* 2000;74:1736-1741
- 15 De Haan JB, Crack PJ, Flentjer N, Iannello RC, Hertzog PJ, Kola I. An imbalance in antioxidant defense affects cellular function:the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. *Redox Rep* 2003;8:69-79
- 16 Buerkert E, Arnold C, Hammarberg T, Radmark O, Steinhilber D, Werz O. The C2-like {beta}-barrel domain mediates the Ca2+-dependent resistance of 5-lipoxygenase activity against inhibition by glutathione peroxidase-1. *J Biol Chem* 2003;8:69-79
- 17 Hassan AM. Glutathione peroxidase activity in blood cells from aspirin-induced asthma patients. *Ann Clin Biochem* 2003;40:369-373
- 18 Faucher K, Rabinovitch-Chable H, Barriere G, Cook-Moreau J, Rigaud M. Overexpression of cytosolic glutathione peroxidase (GPX1) delays endothelial cell growth and increases resistance to toxic challenges. *Biochimie* 2003;85:611-617
- 19 Nagashima M, Hasegawa J, Kato K, Yamazaki J, Nishigai K, Ishiwata T, Asano G, Yoshino S. Hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator, and c-Met in synovial tissues in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 2001;28:1772-1778
- 20 Kaibori M, Inoue T, Oda M, Naka D, Kawaguchi T, Kitamura N, Miyazawa K, Kwon AH, Kamiyama Y, Okumura T. Exogenously administered HGF activator augments liver regeneration through the production of biologically active HGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:475-481
- 21 Yamazaki M, Tsuboi R, Lee YR, Ishidoh K, Mitsui S, Ogawa H. Hair cycle-dependent expression of hepatocyte growth factor (HGF) activator, other proteinases, and proteinase inhibitors correlates with the expression of HGF in rat hair follicles. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999;4:312-325
- 22 Ohshima M, Sakai A, Sawamoto Y, Seki K, Ito K, Otsuka K. Hepatocyte growth factor (HGF) system in gingiva: HGF activator expression by gingival epithelial cells. *J Oral Sci* 2002;44:129-134
- 23 Somerset DA, Strain AJ, Afford S, Whittle MJ, Kilby MD. Hepatocyte growth factor activator (HGF-A) and its zymogen in human placenta. *Placenta* 2000;21:615-620

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

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

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 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

纪冬, 男, 内蒙古自治区人, 医师, 毕业于第一军医大学, 现为军医进修学院内科传染病专业2002级硕士学位研究生, 主要从事传染病临床及病毒性肝炎的基础研究。

国家自然科学基金资助项目, 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: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and cloning of the target genes transactivated by human gene 1 transactivated by hepatitis C virus NS3 protein using suppression subtractive hybridization

Dong Ji, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Qian Yang, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang

Dong Ji, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Qian Yang, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30070689, No. C30371288; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To clone and identify human genes transactivated by human gene 1 transactivated by hepatitis C virus NS3 protein (NS3TP1) by constructing a cDNA subtractive library with suppression subtractive hybridization (SSH).

METHODS: Suppression subtractive hybridization and bioinformatics were used for screening and cloning of the target genes transactivated by NS3TP1 protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)-NS3TP1 and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed cDNA sequence between the two groups. After restriction enzyme Rsa I digestion, small sizes cDNAs were

obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. Tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent polymerase chain reaction (PCR) twice, and then was subcloned into pGEM-Teasy plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with *E. coli* strain DH5 α . The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

RESULTS: The subtractive library of genes transactivated by NS3TP1 was constructed successfully. The amplified library contained 68 positive clones. Colony PCR showed that these clones contained 200-1000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 36 clones, randomly, and the full length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 23 coding sequences were obtained, which consisted of 20 known and 3 unknown ones.

CONCLUSION: The obtained sequences may be target genes transactivated by NS3TP1, among which some genes coding proteins involve in cell cycle regulation, metabolism, immunity and cell apoptosis. This finding brings some new clues for studying the biological functions of NS3TP1.

Ji D, Cheng J, Wang JJ, Liu Y, Yang Q, Dang XY, Wang CH. Screening and cloning of the target genes transactivated by human gene 1 transactivated by hepatitis C virus NS3 protein using suppression subtractive hybridization. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):843-846

摘要

目的: 筛选与克隆丙型肝炎病毒(HCV)NS3反式激活基因1的反式激活基因, 了解其可能存在的调节功能线索。

方法: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆NS3TP1反式激活的新型靶基因。以NS3TP1表达质粒pcDNA3.1(-)-NS3TP1转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA并逆转录为cDNA, 经Rsa I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聚合酶链反应(PCR), 将产物与pGEM-Teasy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: 成功构建人NS3TP1反式激活基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到68个阳性克隆, 进行菌落PCR分析, 均得到200-1 000 bp插入片段。随机挑选其中36个插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序

列,结果共获得23种编码基因,其中3个为未知功能的新基因。

结论:筛选到的cDNA全长序列,包括一些与细胞生长调节、物质代谢、免疫及细胞凋亡密切相关的蛋白编码基因,推测了NS3TP1可能存在的调控机制的线索。

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(4):843-846

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/843.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(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^[1-2]。我室对NS3反式激活基因进行筛选和克隆化研究,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开放读码框架(ORF),并对其进行克隆化研究,顺利得到了NS3TP1基因编码序列。为了解其细胞内功能,我们利用抑制性消减杂交技术构建NS3TP1作用于肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞的反式调节cDNA消减文库,筛选差异表达的基因片段,并应用生物信息学进行分析,为了解NS3TP1的功能、进一步探讨HCV发病及致癌机制提供新的研究方向。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞及感受态大肠杆菌DH5 α 为本室保存,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×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning试剂盒购自Clontech公司,High Pure PCR Product Purification试剂盒购自Boehringer Mannheim公司,T7、SP6通用引物及pGEM-Teasy载体购自Promega公司。

1.2 真核表达载体的细胞转染 NS3TP1真核表达质粒pcDNA3.1(-)-NS3TP1由本室构建。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。

1.3 细胞mRNA提取 使用mRNA Purification试剂盒,直接提取转染了重组表达质粒及空载体的HepG2细胞mRNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析。

1.4 消减杂交文库的建立 采用Clontech公司的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Rsa I(一种识别4碱基序列的内切酶)消化,产生相对较短的平端片段,纯化酶切产物。将Tester的dscDNA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Adaptor 1和Adaptor 2,然后与过量的Driver dscDNA进行杂交;合并两种杂交产物后再与Driver dscDNA作第2次杂交;然后将杂交产物做选择性PCR扩增,使Tester dscDNA中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

1.5 消减文库扩增及克隆鉴定分析 扩增产物与pGEM-Teasy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18 h.共得到68个白色菌落,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(200-1 000 bp),随机挑选其中个36个克隆增菌,测序(上海申友公司),并且应用生物信息学将测得序列GenBank数据库进行同源性分析。

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-NS3TP1的表达载体构建 NS3TP1真核表达质粒pcDNA3.1(-)-NS3TP1经测序及酶切鉴定均正确。

2.2 mRNA的定性定量分析 使用高质量的mRNA是保证cDNA高产量的前提。紫外分光检测显示,转染了pcDNA3.1(-)-NS3TP1质粒及空载体的HepG2细胞mRNA分别为4.84 μ g和6.13 μ g,A₂₆₀/A₂₈₀=1.92.2.0%琼脂糖凝胶电泳见mRNA为大于0.5 kb清晰慧尾片状条带。

2.3 dscDNA两端连接效率检测 dscDNA与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤。将连接有adaptor 1和adaptor 2的两组dscDNA分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶G3PDH引物)进行28个循环扩增,产物用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。

2.4 cDNA消减文库消减效率的鉴定 分别取1 μ L抑制性及非抑制性PCR产物为模板,用看家基因G3PDH引物进行PCR扩增,分别在18、23、28、33次循环结束时从体系中吸取5 μ L进行电泳鉴定。结果显示:与非抑制性PCR产物相比,抑制性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)。

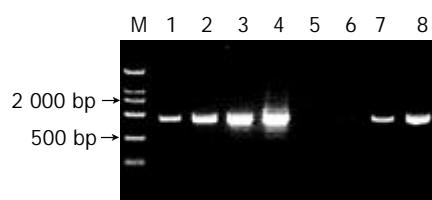


图1 消减效率分析结果。1-4:未消减组,引物为G3PDH3'、5',PCR循环次数分别为18、23、28、33;5-8:消减组,引物为G3PDH3'、5',PCR循环次数分别为18、23、28、33。

2.5 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 200~1000 bp 大小不等的插入片段, 所获得的 68 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).

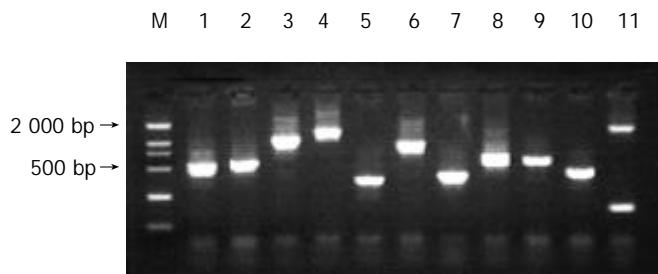


图 2 部分克隆菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.6 cDNA 测序与同源性分析初步结果 挑选其中 36 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 有 33 个与已知基因的部分序列高度同源(97~100%), 3 个克隆未检索到任何对应的相似序列, 可能代表了某些新基因, 详细结果见表 1.

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白名称	同源克隆数	同源性(%)
核糖体蛋白	9	98~100
CDC28 蛋白激酶	3	99~100
皮肤 T 细胞淋巴瘤肿瘤抗原 HD-CL-08	2	99~100
真核翻译延长因子	2	99~100
胰岛素样生长因子结合蛋白	2	97~100
β5- 微管蛋白	1	100
RAS 癌基因家族 RAB10	1	100
纤维结合素	1	100
白蛋白	1	100
线粒体单倍体	1	100
细胞色素 C 氧化酶亚单位 IV 亚型 1(COX4I1)	1	100
真核翻译起始因子 3	1	100
肝丙酮酸脱氢酶	1	100
ATP 合酶、H ⁺ 转运、线粒体 F1 复合体	1	99
α-2 巨球蛋白	1	99
膜整合溶酶体 / 后期核内体蛋白	1	99
凋亡抑制子(IEX-1L)	1	99
蛋白二硫化物异构酶相关蛋白	1	99
甲状腺激素受体相互作用蛋白 3(TRIP3)	1	98
蛋白激酶 WEE1	1	97
新基因序列	3	
克隆总计	36	

3 讨论

HCV NS3 蛋白为一多功能蛋白, 近年研究表明他对多

种基因具有反式激活作用^[3~4], 为了解 NS3 在丙肝发病机制中的作用, 我室构建出 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, 其中一个命名为 NS3TP1, GenBank 收录 AY116969. 对其进行克隆化研究, 反应产物经测序完全符合计算机分析结果, 表明我们顺利得到了 NS3TP1 编码序列. NS3TP1 的 ORF 长度为 1 932 个核苷酸(nt), 编码 642 个氨基酸残基(aa)^[5]. 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, 利用抑制性消减杂交技术^[6] (suppression subtractive hybridization, SSH) 筛选并克隆 NS3TP1 反式激活的靶基因, 推测其在体内可能存在功能的线索.

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^[7]. 我们将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS3TP1, 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 NS3TP1 反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 挑选 36 个克隆测序分析, 主要包括两种类型的序列, 即已知功能的基因序列和未知功能的基因序列. 在本次实验中共获得 3 个差异表达的未知序列, 对其基因结构和功能正在研究之中.

在已知功能基因序列中, 主要包括以下几种类型: (1)细胞内结构与细胞生长相关蛋白, 如线粒体蛋白、核糖体蛋白、纤维结合素、β5- 微管蛋白、真核翻译起始因子、真核翻译延长因子等, 在细胞生长、分化、黏附中起重要作用. (2)参与细胞内代谢的蛋白基因, 如白蛋白在各种物质代谢中起运输作用, 并且是维持血浆胶体渗透压的重要物质. 肝丙酮酸脱氢酶参与了三羧酸循环等的代谢. 细胞色素 C 氧化酶是线粒体呼吸链的终末酶, 他是一个多亚单位的酶复合体. 功能是将电子从细胞色素 c 传递到分子氧, 并且为线粒体内膜提供一部分的电化学梯度. 复合体由线粒体及核编码的共 13 个亚单位组成, 线粒体编码的亚单位是电子转运体并且有质子泵活性, 而核编码的亚单位功能尚不清楚, 但他们可能发挥了对于复合体的调控作用. 本实验筛选到的细胞色素 c 氧化酶 IV 亚型 1(COX4I1) 属于核编码的亚单位, 位于 NOC4 基因的 3' - 端, 并且与之共用一个启动子. 这很可能说明了 HCV NS3 蛋白涉及到了线粒体的呼吸链, 改变了细胞的正常的能量代谢. (3)参与信号转导途径, 影响 HCV 与宿主细胞的相互反应, 导致肝硬化、肝癌等病理改变. 如 CDC28 蛋白激酶属于细胞周期素依赖性激酶(CDK) 家族, 是细胞由 G1 期到 S 期、G2 期到 M 期所必需, 影响着细胞分裂的过程^[8], 近年研究认为 CDK 在慢性肝炎向肝细胞癌(HCC) 的转换过程

中具有十分重要的意义^[9]。蛋白激酶 WEE1 为一种细胞周期调节蛋白，主要通过阻断 M 期启动因子(MPF)，包括 cdc2 激酶和细胞周期蛋白 B，特异性的调控细胞 G2/M 的转换，抑制细胞的有丝分裂。既往研究发现，WEE1 激酶的活性和水平在 S 期均升高，在细胞进入 M 期时则很快下降^[10]，研究者认为这种现象可能是由于当 DNA 的复制被阻断时，WEE1 激酶的降解就被抑制，在进入 DNA 复制期间有一种因子可以使 WEE1 激酶保持持续的高水平直至进入 M 期，推测这种因子即 c-Fos/AP-1^[11]。王建军 et al^[12] 研究发现了 HCV 核心蛋白可以上调 WEE1 基因的表达，而本研究则说明了 HCV NS3 也可以上调 WEE1 基因。RAS 癌基因家族 RAB10 为 RAS 样小分子量的 GTP 结合蛋白，主要负责真核细胞内的膜运输。癌基因 RAS 可以与 RAF 超家族结合，从而启动 MAPK 信号转导途径^[13]，HCV NS3 与 RAS 家庭成员相互作用的关系还需进一步的研究。凋亡抑制子 IEX-1L，Wu et al^[14] 于 1998 年克隆出来，他们运用 mRNA 差异性展示技术发现了与早期即刻反应基因 IEX-1 同源的基因^[15]，但他在 IEX-1 编码区 211 位点上有 111 个核苷酸的插入，故将之命名为 IEX-1L，认为他是 IEX-1 未经过剪切的形式，包含了 IEX-1 全部的内含子。IEX-1L 可以保护细胞免于由 Fas 或肿瘤坏死因子(TNF) α 介导的凋亡，并且还发现用 α 干扰素(IFN) 处理 JurKat 细胞时，NF-kappaB 的细胞存活功能是通过 IEX-1L 来完成的，因为他是惟一的核因子(NF-kappaB)蛋白调节基因。本实验得到 NS3TP1 可以反式激活 IEX-1L，提示了 NS3 蛋白与 IFN α 治疗 HCV 时的耐药有关。(4) 肝外组织相关性基因。如甲状腺激素受体相互作用蛋白 3(TRIP3)、胰岛素样生长因子结合蛋白、皮肤 T 细胞淋巴瘤肿瘤抗原，可能与 HCV 所致自身免疫性损伤有关，但具体意义尚待进一步研究。

通过对 NS3TP1 的上述反式激活基因的分析，我们发现他与体内物质代谢、信号转导、凋亡关系密切，在病毒感染后肝细胞恶性变方面有一定的作用，而且还与肝外组织有关，这可能与 HCV 所致肝外疾患有一定的关系。NS3TP1 是正常人体存在的基因，在病毒蛋白 NS3 的存在下其功能被进一步激活。关于其在体内与各种活性因子的具体调节机制，仍需进行详细的实验来

研究。对新基因的研究及其功能的确定是分子生物学领域一项很具有挑战性的工作，NS3TP1 抑制性消减文库的建立为研究其功能提供了理论依据，并为 HCV 感染慢性化机制提供了新的研究方向。

4 参考文献

- 1 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
- 2 Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Lan KH, Ono-Nita SK, Feng Z, Shiina S, Omata M. Poor association of TT virus viremia with hepatocellular carcinoma. *Liver* 2000;20:247-252
- 3 牟劲松, 刘妍, 成军. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 及其对信号转导途径的影响. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:342-345
- 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, 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
- 6 Libikova H, Pogady J, Wiedermann V, Breier S. Search for herpetic antibodies in the cerebrospinal fluid in senile dementia and mental retardation. *Acta Virol* 1975;19:493-495
- 7 Deng HB, Parekh HK, Chow KC, Simpkins H. Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277:15035-15043
- 8 Russo GL, van den Bos C, Sutton A, Coccetti P, Baroni MD, Alberghina L, Marshak DR. Phosphorylation of Cdc28 and regulation of cell size by the protein kinase CKII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 2000;351:143-150
- 9 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节. 世界华人消化杂志 2003;11:1255-1258
- 10 Michael WM, Newport J. Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science* 1998;282:1886-1889
- 11 Kawasaki H, Komai K, Ouyang Z, Murata M, Hikasa M, Ohgiri M, Shiozawa S. c-Fos/activator protein-1 transactivates wee1 kinase at G(1)/S to inhibit premature mitosis in antigen-specific Th1 cells. *EMBO J* 2001;20:4618-4627
- 12 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
- 13 纪冬, 成军. 乙型肝炎和丙型肝炎病毒对 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
- 14 Wu MX, Ao Z, Prasad KV, Wu R, Schlossman SF. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science* 1998;281:998-1001
- 15 Kondratyev AD, Chung KN, Jung MO. Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene. *Cancer Research* 1996;56:1498-1502

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

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

党晓燕, 成军, 邓红, 王建军, 杨倩, 刘妍, 纪冬, 王春花

党晓燕, 邓红, 陕西西安交通大学第二医院感染科 陕西省西安市 710004
成军, 王建军, 杨倩, 刘妍, 纪冬, 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
党晓燕, 女, 陕西省人, 医师, 陕西西安交通大学2001年内科传染病学硕士学位研究生, 主要从事内科传染病的临床工作和病毒性肝炎的实验研究。
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”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and cloning of the target genes transactivated by human gene 2 transactivated by hepatitis C virus NS3 protein using suppression subtractive hybridization

Xiao-Yan Dang, Jun Cheng, Hong Deng, Jian-Jun Wang, Qian Yang, Yan Liu, Dong Ji, Chun-Hua Wang

Xiao-Yan Dang, Hong Deng, The Second Hospital, Xi'an Jiaotong University Shanxi Xi'an, 710004 China
Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Qian Yang, Yan Liu, Dong Ji, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To clone and identify human genes transactivated by NS3TP2 by constructing a cDNA subtractive library with suppression subtractive hybridization technique.

METHODS: Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatics were used for screening and cloning of the target genes transactivated by NS3TP2 protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)-NS3TP2 and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. After restriction enzyme Rsa I digestion, small sizes cDNAs were

obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. The 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 the 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 subtractive library of genes transactivated by NS3TP2 was constructed successfully. The amplified library contained 61 positive clones. Colony PCR showed that these clones contained 200-1000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 30 clones, and the full length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 21 coding sequences were identified.

CONCLUSION: The obtained sequences may be target genes transactivated by NS3TP2, among which some genes coding proteins involve cell cycle regulation, metabolism, immunity and cell apoptosis. Advanced experiments need to be done to prove this finding.

Dang XY, Cheng J, Deng H, Wang JJ, Yang Q, Liu Y, Ji D, Wang CH. Screening and cloning of the target genes transactivated by human gene 2 transactivated by hepatitis C virus NS3 protein using suppression subtractive hybridization. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):847-850

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术构建丙型肝炎病毒(HCV)NS3蛋白反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库, 克隆HCV NS3蛋白反式激活相关基因。

方法: 以HCV NS3表达质粒pcDNA3.1(-)-NS3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, 从中提取mRNA并合成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后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建人HCV NS3蛋白反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到61个白色克隆, 进行菌落PCR分析, 均得到100-1 000 bp插入片段。挑取30个插入片段测序分析, 得到30个已知功能基因序列。

结论: 筛选到的cDNA全长序列, 包括一些与细胞生长调节、物质代谢、免疫及细胞凋亡密切相关的蛋白编码基

因, 推测了 NS3TP2 可能存在的调控机制的线索.

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(4):847-850

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/847.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白(non-structural region) NS3 是 HCV 基因组编码蛋白中具有重要作用的蛋白之一, 他由 631 个氨基酸残基(aa)组成. NS3 区编码的蛋白包括解旋酶、三磷酸核苷酶 (NTPase) 和丝氨酸蛋白酶. 其中解旋酶与 RNA 的解旋复制有关, 丝氨酸蛋白酶具有催化 HCV 病毒多蛋白的活性, 其在裂解加工过程中具有重要的作用^[1]. Errington et al^[9]研究还发现 NS3 可通过与核内蛋白质间相互作用, 进一步在转录水平上调节基因表达, 在 HCV 持续感染及肝细胞损害中发挥重要作用^[2]. 因此 HCV NS3 对肝细胞的生长、代谢、细胞信号转导途径甚至是恶性转化产生重要影响. 本室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达 HCV NS3 载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 并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, 其中之一命名为 HCV NS3 蛋白反式激活基因 2(NS3TP2). 并继续应用抑制性消减杂交技术筛选与克隆 NS3TP2 反式激活的基因, 推测其在体内可能存在功能的线索, 为研究 HCV 的致病机制提供新的方向.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞、感受态大肠杆菌 DH5 α (我室保存), 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 消减杂交文库的建立及克隆分析 分别将 pcDNA3.1 (-)-NS3 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 按 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒扩增差异表达的 cDNA. 对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 进行电子拼接, 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, 确定新型基因序列. 从 HepG2 细胞提取总 RNA, 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序列, 并测序证实, 命名为 HCV NS3 反式激活基因 2(NS3TP2), 在 GenBank 中注册, 注册号

为 AY116970. NS3TP2 基因的编码序列全长为 1299 个核苷酸(nt), 编码产物由 432 个氨基酸残基组成.

1.2.2 真核表达载体及细胞转染 HCV NS3 蛋白反式激活基因 2(NS3TP2)真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS3TP2 由本室构建. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1 (-)-NS3TP2 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.3 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 NS3 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.4 双链 cDNA(dscDNA)合成 用 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 中的试剂, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA.

1.2.5 消减杂交文库的建立 采用 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction et al, 常规 SSH 方法按说明书进行^[3]: 转染了 NS3 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 cDNA 分别标记为 Tester 和 Driver, 经 Rsa I(一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将 Tester 的 cDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.6 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(100-1 000 bp), 测序(上海申友公司). 应用生物信息学将测得序列 GenBank 数据库进行同源性分析.

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-TAHCCP2 的表达载体构建 NS3TP2 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS3TP2 经测序及酶切鉴定均正确.

2.2 mRNA 的定性定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了 NS3 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 3.00 μ g 和 5.92 μ g, A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.87. 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, 证实 mRNA 质量足.

2.3 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用两个基因特异性引物(G3PDH 3' - 和 5' -)与一个基因特异性引物(G3PDH 3')和一个 PCR 引物 1 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。

2.4 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别取 1 μL 抑制性及非抑制性 PCR 产物为模板, 用看家基因 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: 与非抑制性 PCR 产物相比, 抑制性 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)。

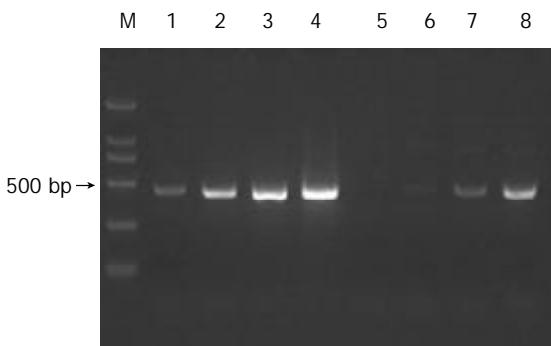


图 1 消减效率分析结果。1-4: 未消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33。

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(%)
核糖体蛋白	10	99-100
锰超氧化物歧化酶	1	100
酪氨酸 3 单氧化酶激活蛋白	1	100
苯丙氨酸羟化酶	1	100
胰岛素样生长因子 II mRNA	1	93
结合蛋白 2 (IMP-2)	1	99
肝细胞癌相关抗原 64	1	100
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His)	1	100
框多肽 15 (DDX15)		
肌动蛋白	1	100
载脂蛋白 A-II	1	100
纤连蛋白 1(FN1)	1	100
翻译控制的肿瘤蛋白 1	1	99
白蛋白	1	100
溶酶体相关的跨膜蛋白 4 β	1	100
真核翻译延长因子 1 α	1	100
细胞色素 C 氧化酶亚单位 IV 同工型 1	1	100
含硒蛋白 P	1	100
电压依赖的阴离子通道 1	1	96
α -2 巨球蛋白	1	100
肿瘤排斥抗原 1	1	97
MLN51 蛋白	1	100
酸性(亮氨酸富集)核磷蛋白 32B	1	100
克隆总计	30	

2.5 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 61 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)。

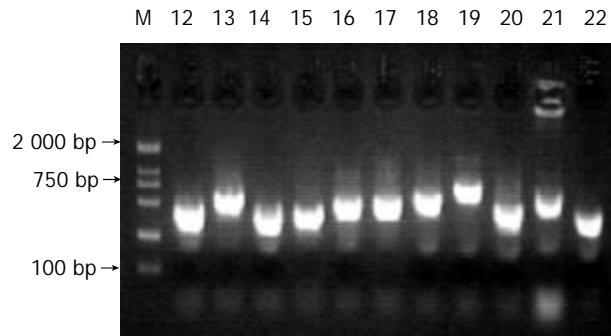


图 2 部分克隆(NS312-22)菌落 PCR 鉴定电泳图。

2.6 cDNA 测序与同源性分析初步结果 挑选其中 30 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较。有 30 个与已知基因的部分序列高度同源(93-100%), 详细结果见表 1。

3 讨论

众所周知, HCV NS3 具有多种生物功能, 其中的反式激活作用在 HCV 致病中发挥重要的作用。为了进一步了解 HCV NS3 在丙型肝炎的发生及发展中的作用, 本中心首先利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)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, 其中之一命名为 HCV NS3 蛋白反式激活基因 2(NS3TP2), 我们应用的抑制性消减杂交方法具有实验周期短、可靠性高、假阳性率低、易操作等优点, 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研究结果^[3]。我们将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS3TP2 转染至肝母细胞瘤细胞系 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 NS3TP2 反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 挑选 30 个克隆测序分析, 获得 30 个已知功能的基因序列。

在已知功能的基因序列中其中包括筛选到的纤连蛋白(FN), 他是一种多功能的广泛存在于胞质和细胞外基质中的糖蛋白。FN 在促进细胞附着、迁移、分化、伤口愈合和肿瘤转移中发挥重要作用。而且他是炎症修复时细胞外的主要成分。慢性肝炎, 早期肝硬化的血浆 FN 往往升高, 反映纤维组织增生和结缔组织代谢增加。纤维连接素的增加, 在肝损害时基质组成的改变中出现最早, 为 I 型胶原(CI)的沉积提供支架。肝纤维化损伤时, 且 FN 最先增多, 通过纤维母细胞表面黏附受体将信息传入细胞内, 在肝纤维化中起“起搏点”样启动作用。

用。FN 还可增加丝分裂素激活蛋白激酶(MAPK)活动，刺激激活蛋白 -1(AP-1)活动，即激活原癌基因 c-fos 和 c-Jun 的活动，从而使 FN 的表达与肝细胞癌(HCC)的分化、侵入和转移呈高度相关本实验中 HCV NS3 上调 FN 的表达，因此可以推测或许 NS3 与肝纤维化、肝癌的发生发展有关。

本实验的结果还表明 HCV NS3 可上调翻译控制的肿瘤蛋白(TCTP)的表达，TCTP 也即人组胺释放因子(HRF)，其被在种系发生中高度保守的 Tpt1 基因所编码。TCTP 在大量的真核生物中广泛表达^[4-7]，它涉及细胞生长、急性变应反应且被证实为抗凋亡蛋白^[8]。另有报道 TPT1 可上调肿瘤蛋白的表达^[9-11]，因此，HCV NS3 在 HCV 导致的高癌变率中或许发挥正向作用。

另外筛选到载脂蛋白 A II (apoA II) 是重要的脂类代谢物质，已知 HCV 的病毒颗粒可被 apoA II 包围，这样 HCV 病毒颗粒即可通过肝细胞膜上的相应受体进入肝细胞中，从而实现 HCV 的感染过程。因此 NS3 或许有促进 HCV 感染的作用。

在已知功能的序列中，还包括细胞内结构、细胞生长相关蛋白和参与细胞内代谢的蛋白基因，如核糖体蛋白、真核翻译延长因子 1α、白蛋白、肌动蛋白、α-2 巨球蛋白、含硒蛋白 P、锰超氧化物歧化酶、苯丙氨酸羟化酶及 DEAD 框多肽 15 等物质，他们在细胞的生长、分化及各种物质代谢中发挥重要作用。其中 DEAD 框蛋白质是具有保守性天冬 - 谷 - 丙 - 天冬氨酸基序的一类蛋白质，它参与多种细胞生物学过程，包括改变 RNA 的二级结构、调节翻译起始作用、细胞核和线粒体剪接、核糖体和剪接小体的装配等过程。苯丙氨酸羟化酶可使苯丙氨酸转化为酪氨酸，调控苯丙氨酸在体内的分解代谢。

通过应用抑制性消减杂交技术克隆 HCV NS3 蛋白反式激活基因 2，我们发现它与体内数种物质代谢、凋

亡、信号转导等活动高度相关。特别是它可上调与肝纤维化、癌变等高度相关因子，为我们进一步阐明 HCV 感染及其引起的各种病变机制提供新的方向。

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997: 37-42
- 2 Errington W, Wardell AD, McDonald S, Goldin RD, McGarvey MJ. Subcellular localization of NS3 in HCV-infected hepatocytes. *J Med Virol* 1999;59:456-462
- 3 Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV, Weigel RJ. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res* 1998;26: 1116-1123
- 4 Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G. Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol* 1983;3:1197-1203
- 5 Bohm H, Benndorf R, Gaestel M, Gross B, Nurnberg P, Kraft R, Otto A, Bielka H. The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Biochem Int* 1989;19:277-286
- 6 MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 1995;269:688-690
- 7 Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Walther JP, Craven CJ. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol* 2001; 8:701-704
- 8 Li F, Zhang D, Fujise K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 2001;276:47542-47549
- 9 Martinez-Chantar ML, Garcia-Trevijano ER, Latasa MU, Martin-Duce A, Fortes P, Caballeria J, Avila MA, Mato JM. Methionine adenosyltransferase II beta subunit gene expression provides a proliferative advantage in human hepatoma. *Gastroenterology* 2003;124:940-948
- 10 LeGros HL Jr, Halim AB, Geller AM, Kotb M. Cloning, expression, and functional characterization of the beta regulatory subunit of human methionine adenosyltransferase (MAT II). *J Biol Chem* 2000;275:2359-2366
- 11 Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, Telerman A. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14976-14981

应用抑制性消减杂交技术筛选双环醇调节靶基因

王建军, 纪冬, 成军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花

王建军, 纪冬, 成军, 刘妍, 杨倩, 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
王建军, 男, 吉林省人, 汉族, 1975-6-17生, 医师, 1999年毕业于第一军医大学, 获得医学学士学位, 现为军医进修学院内科传染病专业2001级硕士学位研究生, 主要从事传染病临床与病毒性肝炎的发病机理研究。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and cloning of genes differential expressed in HepG2 cells treated with bicyclol by suppression subtractive hybridization

Jian-Jun Wang, Dong Ji, Jun Cheng, Yan Liu, Qian Yang, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang

Jian-Jun Wang, Dong Ji, Jun Cheng, Yan Liu, Qian Yang, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070690; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To construct a subtractive cDNA library of genes differential expressed in human hepatocarcinoma cell line HepG2 cells treated with bicyclol using suppression subtractive hybridization (SSH) technique and to clone genes associated with its regulation effects.

METHODS: The mRNA was isolated from HepG2 cells treated with bicyclol and dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively, and then cDNA was synthesized. After restriction enzyme RsaI digestion, small sizes cDNA were obtained. Tester cDNA was subdivided into two portions and each was ligated with different cDNA adaptor. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent nested polymerase chain reaction (PCR) twice, the DNA fragment was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive cDNA 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

colony PCR.

RESULTS: The subtractive cDNA library of genes differentially expressed in HepG2 cells treated with bicyclol was constructed successfully. The amplified library contained 46 positive clones. Colony PCR showed that these clones contained 200-1 000 bp inserts. Thirty clones were analyzed by sequencing and bioinformatics. fourteen known genes were obtained.

CONCLUSION: A subtractive cDNA library of genes differential expressed in HepG2 cells treated with bicyclol using SSH technique is constructed successfully, which brings some new clues for studying the regulation mechanism of bicyclol in vivo.

Wang JJ, Ji D, Cheng J, Liu Y, Yang Q, Dang XY, Wang CH. Screening and cloning of genes differential expressed in HepG2 cells treated with bicyclol by suppression subtractive hybridization. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):851-854

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术构建双环醇处理的人肝癌细胞系 HepG2 差异表达基因的cDNA消减文库,筛选并克隆双环醇调节相关基因,阐明双环醇对肝细胞调节作用的分子生物学机制。

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 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多聚酶链反应(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: 成功构建双环醇处理 HepG2 细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。文库扩增后得到46个白色克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200-1 000 bp 插入片段。挑取含有插入片段的30个克隆进行测序, 并通过生物信息学分析获得14种已知基因序列。

结论: 应用 SSH 技术成功构建了双环醇处理 HepG2 细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。该文库的建立为进一步阐明双环醇在体内的调节机制提供依据。

王建军, 纪冬, 成军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花。应用抑制性消减杂交技术筛选双环醇调节靶基因。世界华人消化杂志 2004;12(4):851 - 854
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/851.asp>

0 引言

双环醇(商品名:百赛诺)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。该药是我国第一个有国际独立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。对于慢性肝炎,双环醇对丙氨酸转氨酶(ALT)升高的患者疗效显著,而且安全性好,近年来广泛应用于病毒性肝炎的治疗中。虽然在临上取得了一定的疗效,但是起作用的分子生物学机制没有进行系统的研究。为了阐明双环醇作用的分子生物学机制,我们拟对双环醇作用的靶基因进行筛选。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。本项研究应用SSH技术,构建双环醇作用于人肝癌细胞HepG2后差异表达基因的cDNA消减文库,筛选并克隆双环醇的免疫调节基因,并应用生物信息学(bioinformatics)技术初步获得其基因全长序列。为深入了解双环醇病毒性肝炎的治疗过程中的作用机制提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及载体 人肝癌细胞系 HepG2 细胞及大肠杆菌 JM109(本室保存), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech), 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-T 载体(Promega)。DNA 序列测定由上海博亚公司完成。

1.2 药物处理及 mRNA 提取 双环醇为二甲基硫氧化物(DMSO)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} M/L, 24 h 后收获细胞。使用 mRNA Purification 试剂盒,直接提取双环醇及 DMSO 处理的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计分别进行定性、定量分析。

1.3 消减杂交文库的建立 采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行:以双环醇及 DMSO 处理的 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 Rsa I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化,产生相对较短的平端片段,纯化酶切产物。将 Tester 的 dscDNA 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 dscDNA 进行杂交;合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交;然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增,使 Tester dscDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

1.4 消减文库扩增及克隆分析 扩增产物与 pGEM-T 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-T 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(200-1 000 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。

2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示,双环醇及 DMSO 处理的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.28 μg 和 4.35 μg, A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.89。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,证实 mRNA 质优量足。

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤。将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增,产物用 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,见图 1。

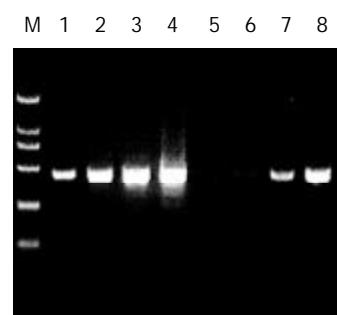


图 1 消减效率分析结果。1-4: 未消减组, 引物为 G3PDH 3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组, 引物为 G3PDH 3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33。

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 85 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,见图 2。

2.5 cDNA 测序与同源性分析结果 随机挑选 30 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,其余 22 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(98-100%),共编码 14 种基因。8 个克隆为人染色体上的序列,不与任何已知功能的基因同源,

关于他们的具体基因归属仍需进一步研究分析. 详细结果见下表 1.

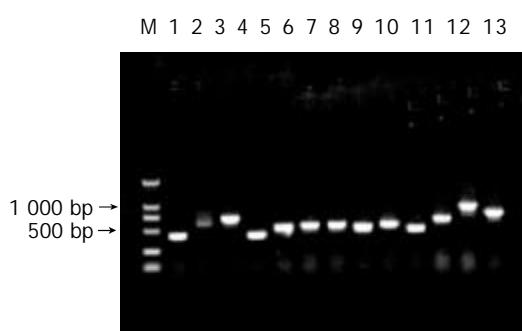


图 2 部分克隆(1-13)菌落 PCR 鉴定电泳图.

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白基因	相同克隆数	同源性
组蛋白 H2A	2	100%
v-fos 转换效应蛋白 (Fte-1)	1	100%
翻译起始因子	1	100%
胰岛素样生长因子结合蛋白 1(IGFBP1)	1	100%
羧肽酶 N	1	99%
真核翻译延长因子 1	2	100%
铁蛋白重链多肽	1	98%
伴侣蛋白 10 相关蛋白 (EPFP1)	1	99%
根蛋白 (RDX)	1	100%
开心蛋白(yippee protein)	1	99%
惟一锌指(OZF)基因	1	99%
腺苷酸环化酶相关蛋白(CAP)	1	98%
线粒体蛋白	3	98-100%
核糖体蛋白	5	98-100%
人类染色体克隆	8	98-100%

3 讨论

百赛诺(双环醇片)是我国第一个有国际独立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. 近年的研究发现: 双环醇可保护扑热息痛导致的急性肝损伤, 使肝脏能量代谢和磷脂代谢趋于正常, 并对损伤的线粒体功能有显著的保护作用^[1]. 双环醇对刀豆蛋白 A(Con A)引起的小鼠肝细胞核 DNA 损伤具有明显的保护作用^[2]. Lu et al ^[3]通过对小鼠的研究发现, 双环醇可以通过提高肝细胞对黄曲酶毒素 B 1 (AFB1)的解毒能力来对抗 AFB1 对肝细胞的毒性作用. 基于双环醇对肝细胞的保护作用, 目前双环醇广泛的应用于病毒性肝炎的治疗中. 国内研究提示: 双环醇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, 患者的耐受性好^[4]. 此外, 双环醇还可剂量依赖性保护缺血 - 再灌注引起的血清丙二醛(MDA)及尿素氮(BUN)升高、肾还原型谷胱甘肽(GSH)含量降低, 同时可诱导谷胱甘肽巯基转移酶

(GST)的活性, 缓解由于缺血 - 再灌注损伤引起的线粒体膜流动性降低, 对肾缺血 - 再灌注损伤有保护作用^[5].

抑制性消减杂交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. 我们将双环醇刺激肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以双环醇溶剂 DMSO 刺激的相同细胞系作为对照, 以 2 种细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了双环醇激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 随机挑选 30 个克隆测序分析, 有 22 个克隆与已知功能的基因高度同源(98-100%), 共编码 14 种基因. 8 个克隆为人染色体上的序列, 不与任何已知功能的基因同源, 关于他们的具体基因归属仍需进一步研究分析.

14 种已知功能的基因可分为 3 类: (1)与细胞结构、生长、增生相关的基因. 如线粒体蛋白、核糖体蛋白为细胞内结构的蛋白. 腺苷酸环化酶相关蛋白(CAP)为广泛存在, 高度保守, 具有双重功能的蛋白质, 其氨基末端是细胞响应上游的 RAS 调节信号系统, 结合腺苷酸环化酶; 而羧基末端结合球形肌动蛋白, 改变微丝系统动态的重组, 是保持正常细胞形态和生长所需要的^[6]. 根蛋白可将肌动蛋白丝连接到细胞质膜, 对细胞的运动、黏附、增生和保持细胞膜的完整性起到重要作用^[7]. 根蛋白在肝脏中主要集中于胆管细胞膜上. 由于其支持多药耐药蛋白 2(Mrp2)定位到胆管膜(BCM)上, 根蛋白对结合胆红素的分泌非常重要^[8]. 也有研究提示他可能是人类自然杀伤(NK)细胞的一种特殊的生物学标记, 并且对 NK 细胞的功能可能起到特殊的作用^[9]. v-fos 转换效应蛋白 (Fte-1): 编码参与蛋白输入线粒体功能的哺乳动物同源基因, 参与细胞周期循环^[10]. (2)维持细胞稳定, 促进损伤细胞再生、修复的基因. 组蛋白 H2A 参与细胞转录激活、DNA 修复、减数分裂和细胞凋亡等生物学作用. H2A 羧基末端结构的改变可导致染色质稳定性和 DNA 折叠功能的改变^[11]. 在细胞核内可保护常染色质免于异染色质的异位伸展的损害^[12]. Fernandes et al ^[13]研究发现, 组蛋白 H2A 有较强的抗细菌感染作用. 铁蛋白重链多肽: 铁蛋白是体内主要储存铁的蛋白质, 与体内铁的代谢密切相关. 有研究发现肝脏中其水平的升高为抵抗氧化应激损伤的机制之一^[14], 近来还有研究认为铁蛋白重链基因有抗凋亡作用, 可以使肝脏免受缺血性损伤^[15]. 胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (IGFBP-1) 在肝脏和子宫内膜大量表达, 调节胰岛素样生长因子(IGF)的生物利用度, 还可能通过对 MAPK/ERK 和 C/EBP β 信号系统的影响来支持肝细胞的再生^[16]. 在肝脏中, IGFBP-1 的转录被胰岛素抑制, 因此可以作为肝脏内胰岛素敏感度的指标. IGFBP-1 的过表达可通过降低 IGF-I 和 / 或 IGF-II 的促有丝分裂活性, 抑制肝脏肿瘤的形成^[17]. 还有报道 IGFBP-1 抑制乳腺肿瘤细胞的活

动^[18]。在II型糖尿病患者，通过降低IGF对血管内皮细胞的潜在的促分裂作用，血液循环中高水平的磷酸化的IGFBP-1可降低高血压病和心血管疾病的进展^[19]。(3)锌指蛋白相关基因。惟一锌指(OZF)基因：编码10种锌指蛋白的基因，在乳腺和胰腺肿瘤细胞中较正常细胞中要多^[20-21]。开心蛋白(yippee protein)是Roxstrom-Lindquist et al^[22]克隆出的一种果蝇属蛋白，在真核生物中高度保守，广泛存在于各种动物的细胞内，具有与锌结合的特性。羧肽酶N(CPN)是由两个50 kD小亚单位和两个83 kD大亚单位组成的锌指样金属蛋白酶^[23]，由肝脏产生^[24]，也有人认为在胃、肺、肠、脾、肾也有表达^[25]。CPN可以分离进入血流的激肽、血管舒张素、血小板因子这些有生物活性的多肽的羧基末端的精氨酸和赖氨酸残基^[26-27]。CPN也可分离补体C3a和C5a羧基末端的精氨酸^[28]，极大地减少C3a和C5a的诱导平滑肌舒张、血管舒张和白细胞趋化，以及肥大细胞释放组胺的生物学活性。

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，一些与细胞生长、增生、维持细胞稳定及促进损伤细胞再生、修复的基因表达增高。这些基因的作用也与体内的信号转导系统、抗肿瘤形成机制有一定的作用，提示双环醇在维持细胞稳定、促进损伤细胞修复及抗肿瘤形成方面可能有一定作用。

4 参考文献

- 1 李烨, 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. 药学学报 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. 药学学报 2002;37:412-414
- 6 Ksiazek D, Brandstetter H, Israel L, Bourenkov GP, Katchalova G, Janssen KP, Bartunik HD, Noegel AA, Schleicher M, Holak TA. Structure of the n-terminal domain of the adenylyl cyclase-associated protein (cap) from dictyostelium discoideum. *Structure (Camb)* 2003;11:1171-1178
- 7 Hoeflich KP, Tsukita S, Hicks L, Kay CM, Tsukita S, Ikura M. Insights into a single rod-like helix in activated radixin required for membrane-cytoskeletal cross-linking. *Biochemistry* 2003;42:11634-11641
- 8 Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S, Tsukita S. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *J Hepatol* 2003;38:551-553
- 9 Ramoni C, Luciani F, Spadaro F, Lugini L, Lozupone F, Fais S. Differential expression and distribution of ezrin, radixin and moesin in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 2002;32:3059-3065
- 10 Lecomte F, Szpirer J, Szpirer C. The S3a ribosomal protein gene is identical to the Fte-1 (v-fos transformation effector) gene and the TNF-alpha-induced TU-11 gene, and its transcript level is altered in transformed and tumor cells. *Gene* 1997;186:271-277
- 11 Ausio J, Abbott DW. The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* 2002;41:5945-5949
- 12 Meneghini MD, Wu M, Madhani HD. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 2003;112:725-736
- 13 Fernandes JM, Kemp GD, Molle MG, Smith VJ. Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem J* 2002;368:611-620
- 14 Erario MA, Gonzales S, Noriega GO, Tomaro ML. Bilirubin and ferritin as protectors against hemin-induced oxidative stress in rat liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002;48:877-884
- 15 Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, Shen X, Busuttil RW, Yamashita K, Csizmadia E, Tyagi S, Otterbein LE, Brouard S, Tobiasch E, Bach FH, Kupiec-Weglinski JW, Soares MP. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2003;17:1724-1726
- 16 Leu JI, Crissey MA, Craig LE, Taub R. Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP beta and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:1251-1259
- 17 Lu S, Archer MC. Insulin-like growth factor binding protein-1 over-expression in transgenic mice inhibits hepatic preneoplasia. *Mol Carcinog* 2003;36:142-146
- 18 Zhang X, Yee D. Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits breast cancer cell motility. *Cancer Res* 2002;62:4369-4375
- 19 Heald AH, Siddals KW, Fraser W, Taylor W, Kaushal K, Morris J, Young RJ, White A, Gibson JM. Low circulating levels of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) are closely associated with the presence of macrovascular disease and hypertension in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:2629-2936
- 20 Blottiere L, Apieu F, Ferbus D, Guenzi C, Dutrillaux B, Prosperi MT, Goubin G. Cloning, characterization, and chromosome assignment of Zfp146 the mouse ortholog of human ZNF146, a gene amplified and overexpressed in pancreatic cancer, and Zfp260 a closely related gene. *Cytogenet Cell Genet* 1999;85:297-300
- 21 Puissant C, Lennaouar M, Le Chalony C, Goubin G, Houdebine LM. OZF gene expression in growing mouse and rabbit mammary gland and in rabbit mammary cells and Nb2 cells under prolactin action. *Biochem Mol Biol Int* 1996;38:543-552
- 22 Roxstrom-Lindquist K, Faye I. The Drosophila gene Yippee reveals a novel family of putative zinc binding proteins highly conserved among eukaryotes. *Insect Mol Biol* 2001;10:77-86
- 23 Levin Y, Skidgel RA, Erdos EG. Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I). *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4618-4622
- 24 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
- 25 Sato T, Miwa T, Akatsu H, Matsukawa N, Obata K, Okada N, Campbell W, Okada H. Pro-carboxypeptidase R is an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not. *J Immunol* 2000;165:1053-1058
- 26 Erdos EG, Sloane EM. An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem Pharmacol* 1962;11:585-591
- 27 Belew M, Lindeberg GB, Porath J, Saldeen T, Wallin R. Structure-activity relationships of vasoactive peptides derived from fibrin or fibrinogen degraded by plasmin. *Biochim Biophys Acta* 1980;621:169-178
- 28 Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest* 1970;49:2427-2436

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

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

王建军, 李宝伟, 成军, 刘妍, 徐志强, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花

王建军, 成军, 刘妍, 徐志强, 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

李宝伟, 中国人民解放军总医院麻醉科 北京市 100853

王建军, 男, 吉林省人, 汉族, 1975-06-17生, 医师, 1999年毕业于第一军医大学, 获得医学学士学位, 军医进修学院内科传染病专业2001级硕士学位研究生, 主要从事传染病临床与病毒性肝炎的发病机理研究。

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

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

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

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Up-regulating effects of glycyrrhizin on interleukin-18 gene expression by cDNA microarray

Jian-Jun Wang, Bao-Wei Li, Jun Cheng, Yan Liu, Zhi-Qiang Xu, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang

Jian-Jun Wang, Bao-Wei Li, Jun Cheng, Yan Liu, Zhi-Qiang Xu, Qian Yang, Dong Ji, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China

Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135

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

Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the relationship of glycyrrhizin and interleukin 18 (IL-18) gene expression and to explore the molecular biological mechanisms of glycyrrhizin in antivirus functions.

METHODS: cDNA microarray was used for the study of up-regulated gene by glycyrrhizin. Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify the sequence of IL-18 promoter by using HepG2 cell genomic DNA as the template, named IL-18P, and the PCR product was cloned into pGEM-T vector. The IL-18P gene was cut from T-IL-18 P by KpnI and Bgl II, and then cloned into pCAT3 basic, named pCAT3- IL-18P. pCAT3-IL-18P was transfected into the HepG2 cell line and cotransfected HepG2 cells with glycyrrhizin by FuGENE 6 transfection reagents. The HepG2

cells transfected with pCAT3-basic was used as negative control. The activity of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) in HepG2 cells transfected was detected by an enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit after 48 h, which reflected the transactivating function of glycyrrhizin to IL-18 gene promoter.

RESULTS: The expressive vector pCAT3-IL-18P was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The expression of CAT in HepG2 cells transfected with pCAT3-IL-18P and stimulated with HepG2 was 7.7 times as higher as that of pCAT3-basic, and 1.5 times as higher as that of pCAT3-IL-18P.

CONCLUSION: HepG2 can up-regulate IL-18 gene promoter. These results provide a new evidence to explain the molecular biological mechanisms of HepG2 in immuno-regulation and antivirus.

Wang JJ, Li BW, Cheng J, Liu Y, Xu ZQ, Yang Q, Ji D, Dang XY, Wang CH. Up-regulating effects of glycyrrhizin on interleukin-18 gene expression by cDNA microarray. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):855-858

摘要

目的: 了解甘草甜素调节白介素-18(IL-18)基因启动子的活性, 为甘草甜素的作用机制提供理论依据。

方法: 应用基因表达谱芯片技术对于甘草甜素刺激HepG2细胞之后的基因表达谱进行研究。聚合酶链反应(PCR)扩增IL-18基因启动子, 命名为IL-18P。以T-A克隆法, 将IL-18P基因片段连入载体pGEM-T。将获得的质粒pT-IL-18P, 与报告质粒pCAT3-basic分别用KpnI和Bgl II双酶切后构建IL-18启动子报告基因表达载体pCAT3-IL-18P, 以重组表达质粒pCAT3-IL-18P瞬时转染HepG2细胞, 以转染pCAT3 basic的HepG2细胞为阴性对照, 甘草甜素刺激后24 h后收获细胞。用酶联免疫黏附法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性。

结果: 表达谱基因芯片研究结果表明, 甘草甜素可上调IL-18基因表达水平达2.815倍。构建的报告载体pCAT3-IL-18P经过序列分析和酶切鉴定正确。pCAT3-IL-18P和甘草甜素瞬时转染的HepG2细胞的CAT表达活性是CAT3空载体的7.7倍, pCAT3-IL-18P的1.5倍。

结论: 甘草甜素可以上调IL-18启动子的活性, 进而上调IL-18基因的表达。为深入了解甘草甜素的免疫调节作用及其在病毒的清除过程中的作用机制提供新的理论依据。

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(4):855-858
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/855.asp>

0 引言

甘草甜素(glycyrrhizin, GL), 是从甘草的根茎提取的一种有效药理成分, 由2分子的葡萄糖醛酸与甘草酸组成的复合物, 具有抗炎症及抗过敏作用. 研究表明, 甘草甜素在乙型肝炎和丙型肝炎抗病毒治疗、保护肝细胞、避免肝损害中具有重要应用前景, 并且具有潜在的抑制肝细胞肿瘤增生的作用^[1]. 甘草甜素能诱导小鼠血清中细胞因子干扰素 γ (IFN γ)的产生, 对巨噬细胞及自然杀伤(NK)细胞活性有显著增强作用^[2], 并且选择性刺激小鼠肝内T细胞的增生^[3]. 这些结果提示甘草甜素可能具有免疫调节作用. 但是这些药理学作用的分子生物学机制还不十分清楚. 本研究利用基因芯片技术筛选GL上调和下调的靶基因, 首先证实GL可以上调HepG2细胞系中的白介素-18 (IL-18)基因的表达. 采用基因重组技术构建pCAT3-IL-18P报告基因载体, 与甘草甜素共转染人肿瘤细胞系HepG2细胞, 应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统, 测得下游CAT基因的表达增强. 证明GL可上调IL-18启动子活性, 进而上调IL-18基因的表达. IL-18又名IFN γ 诱导因子(IGIF, IFN γ -inducing factor), 说明人和动物应用GL后, 首先刺激表达IL-18, 然后诱导IFN γ 的产生, 从而达到其免疫调节的治疗作用. 这些结果为深入了解GL的免疫调节作用及其在病毒的清除过程中的作用机制提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 实验材料及主要试剂 (1)菌种及细胞株: 人肝癌细胞系HepG2细胞及大肠杆菌JM109菌株为本室保存. (2)工具酶: Tag DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制性内切酶均购自Takara公司. (3)试剂盒: 质粒DNA提取试剂盒, 中间载体pGEM-T及报告质粒pCAT3-basic均购自Promega公司; CAT-ELISA检测试剂盒及质粒DNA转染试剂盒购自Roche公司. GL由深圳健安医药公司提供. 其他生化试剂购自Sigma公司.

1.2 目的基因的扩增与纯化 由GenBank分析的IL-18基因的转录起始位点上游选取978 bp及向下游截取186 bp设计引物. 在上下游引物的5' - 端分别引入KpnI和BglII单一酶切位点, 上游引物P1: 5'-GGT ACC ACT CTG TAC TGG CAA AAC ACA-3'. 下游引物P2: 5'-AGA TCT GTT CCT TTC CTC TTC CCG AAG-3', 以HepG2细胞基因组DNA为模板, PCR扩增包含IL-18P基因启动子全序列的DNA片段, PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 回收纯化.

1.3 真核表达载体的构建、纯化和DNA测序 以T-A

克隆法, 用T4 DNA连接酶将IL-18P基因片段连入载体pGEM-T. 将获得的质粒pTA-IL-18P和报告质粒pCAT3-basic分别用KpnI和NheI双酶切后用T4 DNA连接酶进行定向连接, 产物转化JM109宿主菌, 筛选抗氨基青霉素阳性菌落; 提取质粒, 再次双酶切及PCR鉴定正向插入克隆, 命名为pCAT3-IL-18P. DNA测序由上海博亚公司完成.

1.4 探针标记 参照Schena等方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA (5 μ g), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA (5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在20 μ L 5 \times SSC+0.2% SDS杂交液中.

1.5 芯片制备 芯片包含的1152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 μ g/ μ L溶解于3 \times 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0.2% SDS、水及0.2%的硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用.

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

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

1.8 细胞转染及IL-18P活性检测 磁珠法提取质粒pCAT3-IL-18P以备转染, 以标准方案培养HepG2细胞. 具体转染方法参照转染说明书进行. 转染48 h后收集细胞, 收集细胞裂解液, 用于CAT活性检测.

1.9 甘草甜素与pCAT3-IL-18P共转染实验 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甘草甜素+pCAT3-IL-18PP及pCAT3-IL-18P加入细胞培养液中, 甘草甜素终浓度为200 μ g/mL, 同时以转染pCAT3-Basic的HepG2细胞作阴性对照. 转染24 h后, 收集细胞裂解液, 用于CAT活性检测. 所有实验严格平行操作.

1.10 CAT表达水平检测 按照试剂盒说明书进行. 取1.0 ng/mL的CAT标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液200 μ L加入已包被抗体的96孔板中, 37 $^{\circ}$ C温育2 h, 再依次加入第1抗体(地高辛标记的抗-CAT)、第2抗体(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体anti-DIG-POD)200 μ L 37 $^{\circ}$ C温育1 h后, 加入过氧化物酶的底物室温显色10-30 min. 用酶标仪检测标本在415 nm波长的吸光度, 其数值反

映细胞提取物中的CAT表达水平。以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照。

2 结果

2.1 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1 152个cDNA。为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因, 共8个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性。由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异。按阳性标准, 从1 152个基因中筛选出差异表达基因共94条, 占8.15%, 其中38条基因表达增强, 56条基因表达降低。并均在GenBank登录。其中HepG2细胞受到甘草甜素的刺激之后, IL-18基因转录活性水平提高到2.815倍。

2.2 重组质粒的酶切鉴定 pCAT3-IL-18P鉴定电泳图谱如图1所示, 重组质粒pCAT3-IL-18P分别以KpnI/Bgl II双酶切及PCR鉴定均显示1 169 bp正向插入条带, 说明重组质粒pCAT3-IL-18P构建正确。

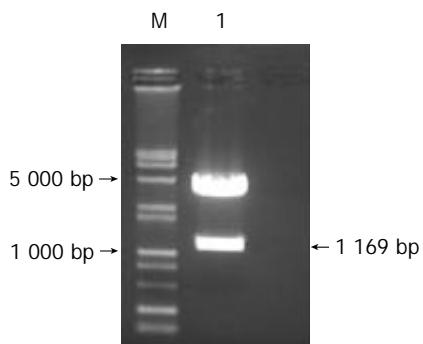


图1 pCAT3-IL-18P鉴定电泳图谱。1: pCAT3-IL-18PKpnI/Bgl II双酶切, 可见1 169 bp的IL-18P DNA条带; M: DNA Marker (15 000 bp+2 000 bp)。

2.3 克隆的包含IL-18基因启动子核苷酸序列 如图2所示。所克隆的区域包括一部分IL-18基因序列, 其中+1-40核苷酸序列是由GenBank分析的IL-18基因的转录起始位点。

```

-978 ACTCTGTACTGGCAAAACACAAAAACAAAAA TGCCACCTTG CTAATTCCCT
-928 TCCTAGCAAAGTAATACAGTTAGCACATG TTCAAGAAAAAAATGGCTAA
-878 GAAATTTGTTTCACTAATTATTTCAAGACTGTGATATTACACTCTG
-828 CTCTTCAAAC GTTACATTATAAGACTATT TTTTAACAT GTTGAACATA
-778 AGCCCTAAATATATGTATCC TAAATTGTA TTCAAAATATT TAGGTCAAG
-728 TCTTGCTATCATTCCAGGAATAGAAAGTTAACACTGG AAACGTCAAG
-678 TAAATTTGCCCTTACCTGAAATTGGTATCCCTCTCCCCAGCTTA
-628 CTTCTGTTG CAGAAAGTGTAAAATTAAATAAATCTAATGATGG
-578 TATCCGTGTG GCTTCATCTGATACAGCAG ATAAAGAAGTTTATGAAAA
-528 TGGACTCCTG TTCCACTGAA AAGTAAATCT TAATGGCTGTATCAACTAT
-478 CCTTGACACCATTGAGCTGGGAGGAAGGGAAAGTCCTGAATGAGGT
-428 TATAAAGTAA AAGAAAATATTGCAAAATG TTCCCTTTTAAATGTTA

```

```

-378 CATTAGAAATATTTAAGTGTGAACTTGTAGAATTACCCCAATA
-328 GGACTGATTATCCGCATTGAAAATAAGAAAAGTTTGCTGAAGTG
-278 TGACCAAGGAGCTGAAAGAGAGACAGATGACAAAAGAAGATGCT
-228 TCTAATGGACTAAGGAGGTGCTTCTAAAGTCAGAAAGAGATACTCAGA
-178 AAGAGGTACAGGTTGGAAAGGCACAGAGCCCAACTTTACGGAAGAAA
-128 AGATTCATGAAAATAGTGTATTACATTAAGAAGTACTCGTATCCTC
-78 TGCCACTTTATTCGACTTCATTGCCCTAGAAAGAGCCTGTTGAAGG
-28 CGGGCCCAAGGAGTGCCGACAGCAGTCTCCCTCCACC TTCTCCCTCA
+23 TTCTCTCCCCAGCTTGCTGA GCCCTTGCT CCCCTGGCGA CTGCCTGGAC
+73 AGTCAGCAAGGAATTGCTC CCAGTGCATT TTGCCCTCCTGGCTGCAAC
+123 TCTGGCTGCTAAAGCGGCTGCCACCTGCTGCAGTCTACACAGCTCGGGA
+173 AGAGGAAAGGAAC

```

图2 克隆的包含IL-18基因启动子的核苷酸序列图。

2.4 重组质粒pCAT3-IL-18P与甘草甜素共转染 实验结果: 空载体对照组pCAT3 basic的CAT的吸光度值为0.074, pCAT3-IL-18P的CAT的吸光度值为0.385, 共转染pCAT3-IL-18P/甘草甜素的HepG2细胞CAT的吸光度值为0.575, 共转染pCAT3-IL-18P/甘草甜素的CAT的表达明显增强, 是CAT3空载体的7.7倍, 是pCAT3-IL-18P的1.5倍, 说明甘草甜素对IL-18基因启动子有反式激活作用, 转录激活IL-18基因启动子的活性, 使其下游CAT基因的表达增强(图3)。

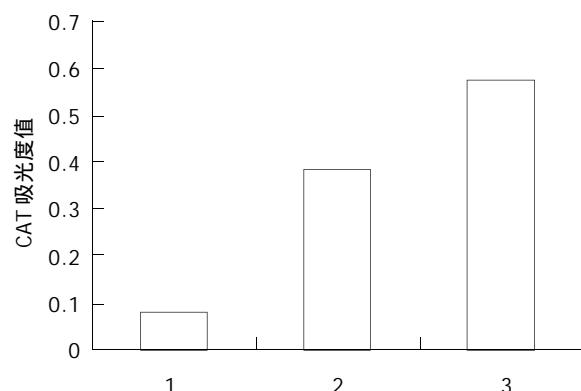


图3 CAT酶表达结果。1: pCAT3 basic; 2: pCAT3-IL-18P; 3: 甘草甜素+pCAT3-IL-18P。

3 讨论

日本米诺发医药公司(Minophagen)生产的甘草甜素注射液, 具有广泛的药理作用, 在抗炎、抗溃疡、抗过敏反应、皮肤病治疗等方面具有很好疗效。研究表明, 甘草甜素在治疗慢性乙型、丙型肝炎病毒感染, 预防肝硬化、肝细胞癌方面同样具有明显疗效^[4-7]。甘草甜素对四氯化碳、甲基偶氮苯、扑热息痛所致肝损伤有明显保护作用, 能抑制磷脂酶A2的活性; 能诱导产生IFN γ 和增强NK细胞活性, 保护肝细胞和激活网状内皮系统^[8-11]。甘草甜素在肝脏分解为甘草次酸和葡萄糖醛酸, 可与毒性物质结合而起解毒作用^[12]。甘草甜素具有诱导产生IFN γ 的作用, 对单纯疱疹病毒具有特异的灭活效果; 对水痘、带状疱疹病毒复制有抑制作用^[12-13]。甘草甜素

对皮质类固醇在肝内代谢失活起竞争性抑制作用，间接提高皮质类固醇的血中浓度而产生皮质样作用^[13]。甘草甜素可抑制纤溶酶系统的活化，阻止血清对毛细血管渗透性的促进，抑制膜通透性的亢进，并且有抑制肉芽肿形成的作用，对延迟过敏反应症也有抑制作用。关于甘草甜素免疫调节机制的研究，对于深入阐明甘草甜素的药理作用机制，提高甘草甜素在慢性病毒性肝炎中的疗效，都具有十分重要的意义。

白介素18(IL-18)最初命名为γ干扰素诱导因子。他可诱发γ干扰素(IFN γ)，加强FasL介导的细胞毒效应，增强IL-2、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的活性，促进肿瘤坏死因子α(TNF α)、IL-1、胞间黏附分子1(IC-MA-1)、IL-8的表达，诱发IL-4^[14-15]，与IL-12的生物学功能有相近之处，对T细胞有多种调节功能，可以显著刺激Th1细胞产生IFN γ ^[16]，促进Th1增生及Fas介导的Th1细胞的细胞毒作用^[17]。IL-18能刺激NK细胞增生、活化，但需要与其他细胞因子组成才能发挥较强的促增生作用。Tomura et al^[18]发现IL-18单独对小鼠脾脏NK细胞的促增生作用并不强，但与IL-2或IL-12组合可以刺激NK细胞向淋巴母细胞转化，并较强地促进NK细胞增生、活化。Takeda et al^[19]的实验显示敲除IL-18基因的小鼠体内的NK细胞失去了体外活化的能力，说明IL-18是NK的发育成熟和活化的必须细胞因子。NK细胞在肿瘤免疫中占有重要地位，是机体抗肿瘤的第一道防线。IL-18对NK细胞抗肿瘤作用的调节，显示了IL-18在肿瘤治疗方面较好的应用前景^[20]。Seki et al^[21]认为肝细胞在细菌感染时产生急性期蛋白、补体等，枯否细胞在各种细菌刺激剂(包括脂多糖、细菌超抗原)作用下产生IL-12、IL-18，进一步激活肝脏自然杀伤(NK)细胞、T细胞产生IFN γ ，对肿瘤细胞、微生物感染细胞产生细胞毒性，在防御微生物感染和血源性肿瘤转移中起重要作用。

本研究采用基因重组技术，自IL-18基因上游自碱基ATG上推976 bp，以HepG2细胞基因组DNA为模板，设计引物，PCR扩增包含IL-18基因启动子全序列的DNA片段，构建pCAT3-IL-18P报告基因载体，应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统，与甘草甜素共转染HepG2细胞，测得共转染甘草甜素/pCAT3-IL-18P的CAT的表达明显增强，是CAT3空载体的7.7倍，是pCAT3-IL-18P的1.5倍，说明甘草甜素对IL-18基因启动子有反式激活作用，转录激活IL-18基因的活性。证明甘草甜素可上调IL-18启动子活性，进而上调IL-18基因的表达，为深入了解甘草甜素的免疫调节作用及其在病毒的清除过程中的作用机制提供新的理论依据。

4 参考文献

- 1 Khaksa G, Zolfaghari ME, Dehpour AR, Samadian T. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of disodium glycyrrhetic acid hemiphthalate. *Planta Med* 1996;62:326-328
- 2 Kimura M, Watanabe H, Abo T. Selective activation of extrathymic T cells in the liver by glycyrrhizin. *Biotherapy* 1992;5:167-176
- 3 Homma M, Oka K, Ikeshma K, Takahashi N, Niitsuma T, Fukuda T, Itoh H. Different effects of traditional Chinese medicines containing similar herbalconstituents on prednisolone pharmacokinetics. *J Pharm Pharmacol* 1995;47:687-692
- 4 Zhang YH, Isobe K, Nagase F, Lwin T, Kato M, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Glycyrrhizin as a promoter of the late signal transduction for interleukin-2 production by splenic lymphocytes. *Immunology* 1993;79:528-534
- 5 Zhang YH, Kato M, Isobe K, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes. *Cell Immunol* 1995;162:97-104
- 6 Jeong HG, You HJ, Park SJ, Moon AR, Chung YC, Kang SK, Chun HK. Hepatoprotective effects of 18beta-glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacol Res* 2002;46:221-227
- 7 Tanahashi T, Mune T, Morita H, Tanahashi H, Isomura Y, Suwa T, Daido H, Gomez-Sanchez CE, Yasuda K. Glycyrrhetic acid suppresses type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:441-447
- 8 王吉耀, 郭津生, 刘淑玲, Zern MA. 甘草甜素对肝硬化动物模型肝脏内NF-κB结合活性的抑制作用. 中华肝脏病杂志 1999;7:42-43
- 9 Zheng QZ, Lou YJ. Pathologic characteristics of immunologic injury in primary cultured rat hepatocytes and protective effect of glycyrrhizin in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:771-777
- 10 Shimoyama Y, Sakamoto R, Akaboshi T, Tanaka M, Ohtsuki K. Characterization of secretory type IIA phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as a glycyrrhizin (GL)-binding protein and the GL-induced inhibition of the CK-II-mediated stimulation of sPLA2-IIA activity in vitro. *Biol Pharm Bull* 2001;24:1004-1008
- 11 Miyaji C, Miyakawa R, Watanabe H, Kawamura H, Abo T. Mechanisms underlying the activation of cytotoxic function mediated by hepatic lymphocytes following the administration of glycyrrhizin. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1079-1086
- 12 Kawakami F, Shimoyama Y, Ohtsuki K. Characterization of Complement C3 as a Glycyrrhizin (GL)-Binding Protein and the Phosphorylation of C3alpha by CK-2, Which Is Potently Inhibited by GL and Glycyrrhetic Acid In Vitro. *J Biochem (Tokyo)* 2003;133:231-237
- 13 Sekizawa T, Yanagi K, Itoyama Y. Glycyrrhizin increases survival of mice with herpes simplex encephalitis. *Acta Virol* 2001;45:51-54
- 14 van Rossum TG, de Jong FH, Hop WC, Boomsma F, Schalm SW. Pseudo-aldosteronism' induced by intravenous glycyrrhizin treatment of chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:789-795
- 15 Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE, Nakanishi K. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13962-13966
- 16 Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378:88-91
- 17 Dao T, Ohashi K, Kayano T, Kurimoto M, Okamura H. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell Immunol* 1996;173:230-235
- 18 Tomura M, Zhou XY, Maruo S, Ahn HJ, Hamaoka T, Okamura H, Nakanishi K, Tanimoto T, Kurimoto M, Fujiwara H. A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells. *J Immunol* 1998;160:4738-4746
- 19 Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 1998;8:383-390
- 20 Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999;19:121-132
- 21 Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T, Hiraide H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 2000;174:35-46

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

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

王永华, 成军, 洪源, 王琳, 刘妍, 张健, 李克

王永华, 中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853
成军, 洪源, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 北京市 100039
王永华, 男, 1963-02-16生, 浙江东阳人, 汉族, 1994年军医进修学院内科消化专业硕士学位, 副主任医师, 主要从事内科消化疾病临床及肝脏疾病的基礎研究。
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: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Therapeutic effects of recombinant human augmenter of liver regeneration on murine liver damage caused by carbon tetrachloride

Yong-Hua Wang, Jun Cheng, Yuan Hong, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li

Yong-Hua Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China
Jun Cheng, Yuan Hong, Lin Wang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, Chinese PLA 302 Hospital, Beijing 100039, China
Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xishuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To explore the therapeutic effects of recombinant human augmenter of liver regeneration (ALR) on CCl₄ liver damage of mice.

METHODS: The recombinant human ALR was prepared by standard procedure of fermentation and chromatography techniques. Chemical liver damage model of mice was established by CCl₄. The mice were divided into two groups: group one was treated by recombinant ALR, 2 mg/kg or 20 µg, 1/12 h, 4 times, and group two was treated by normal saline as control. After treatment, the mice were

sacrificed for collecting the blood sample. For evaluation of chemical liver damage, the serum ALT and AST levels were determined by an autobiochemical processor.

RESULTS: The CCl₄ liver damage model was established. After the treatment with recombinant human ALR, the ALT and AST levels in treated groups were significantly decreased as compared with the group treated with normal saline (ALT: 991 U/L vs 2134 U/L, P < 0.01; AST: 938 U/L vs 1873 U/L, P < 0.01), indicating the potent therapeutic effects of recombinant human ALR on mice model of chemical damage caused by CCl₄.

CONCLUSION: Recombinant human ALR is successfully prepared and effective in the treatment of murine CCl₄ liver damage.

Wang YH, Cheng J, Hong Y, Wang L, Liu Y, Zhang J, Li K. Therapeutic effects of recombinant human augmenter of liver regeneration on murine liver damage caused by carbon tetrachloride. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):859-861

摘要

目的: 利用大肠杆菌的基因工程技术, 制备重组的人肝再生增强因子(ALR)药物, 对于CCl₄肝损伤的小鼠模型进行治疗, 评价重组的人肝再生增强因子在肝损伤治疗中的效果和价值。

方法: 应用大肠杆菌系统, 表达、纯化重组人肝再生增强因子蛋白。利用四氯化碳法制备肝细胞损伤的动物模型, 以重组的人肝再生增强因子药物进行治疗, 以生理盐水治疗作为对照, 比较治疗后血清ALT, AST水平的变化, 评价重组的人肝再生增强因子对于肝损伤的治疗作用。

结果: 成功制备了重组的人肝再生增强因子药物, 纯度在98%以上。成功制备了四氯化碳的小鼠肝损伤模型, 经过重组的人肝再生增强因子药物治疗后, 血清中ALT, AST水平都有显著的下降(ALT: 991 U/L 对 2 134 U/L, P < 0.01; AST: 938 U/L 对 1873 U/L, P < 0.01)。

结论: 重组的人肝再生增强因子药物, 有希望成为各种原因引起的肝细胞损伤的治疗药物。

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(4):859-861

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/859.asp>

0 引言

肝脏疾病在我国常见^[1-10], 如各类病毒性肝炎^[8-12]、肝

硬化^[13-14]。而肝病的一个普遍的现象就是肝细胞的损害，因此，各种肝脏疾病的治疗，除了病因治疗之外，促进肝细胞的再生和修复是一项重要的课题和治疗目标。我们利用大肠杆菌表达重组人肝再生增强因子药物蛋白，探索促进肝细胞再生和修复的新型药物和新型治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增人ALR的cDNA基因片段，克隆到E.coli表达载体pBV220中，转化E.coli JM109，制备工程菌。发酵后，分离纯化包涵体，经过包涵体的变性和复性，然后利用阴离子交换层析、阳离子交换层析和分子筛等技术，纯化重组人肝再生增强因子，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测显示，制备的重组人肝再生增强因子纯度在98%以上。具有促进肝细胞再生的生物学活性。

1.2 方法 取质量大约25 g的Baclb/c小鼠25只。5只小鼠ip生理盐水作为对照组。小鼠模型20只，100 mL/L%的CCl₄，10 mL/kg，ip制备模型。造模4 h后随即分成4组开始治疗试验。生理盐水组应用生理盐水治疗；促肝细胞生长素组应用促肝细胞生长素200 mg/kg ip，1次/12 h，共4次；治疗组Ⅰ应用重组人肝再生增强因子蛋白2 mg/kg，ip，1次/12 h，共4次；治疗组Ⅱ应用重组人肝再生增强因子蛋白20 μg/kg，ip，1次/12 h，共4次。完成治疗后24 h处死动物取血。治疗完成后，处死动物，留取血清标本，统一用全自动生化仪对于血清中的ALT，AST水平进行检测。

2 结果

通过发酵、细菌包涵体的变性和复性、蛋白质纯化步骤，获得了重组人肝再生增强因子药物，PAGE检测结果表明，制备的重组人肝再生增强因子蛋白纯度在98%以上。应用CCl₄后小鼠出现明显的肝脏损伤，表现在血清转氨酶ALT，AST水平都显著上升。正常对照组(n=5)血清中的ALT和AST水平分别为26 U/L和78 U/L。但中毒后72 h分别上升为2 134和1 873 U/L。造模前，ALT和AST水平分别为26 U/L和78 U/L。造模4 h之后，应用生理盐水治疗组ALT和AST水平分别为2 134 U/L和1 873 U/L，应用促肝细胞生长素(200 mg/kg)治疗组ALT和AST水平分别为1 172 U/L和1 098 U/L，重组人肝再生增强因子治疗组Ⅰ(2 mg/kg)ALT和AST水平分别为1 243 U/L和1 342 U/L，重组人肝再生增强因子治疗组Ⅱ(20 μg/kg)ALT和AST水平分别为991 U/L和938 U/L(P<0.01，P<0.01)，说明2种剂量的重组人肝再生增强因子对于小鼠化学肝损伤都有显著的治疗作用。

3 讨论

肝脏具有强大的再生能力，关于ALR作用的机制研

究，关键环节就是ALR结合的特异性的受体。ALR受体蛋白75 M_r。ALR受体不仅仅分布在细胞膜上，而且在细胞器的膜结构上也有。

肝再生增强因子促进肝再生的机制研究也取得了显著的进展。目前认为，肝再生增强因子促进肝再生的作用机制可能与干扰素γ的调节有关。外源性ALR可以通过诱导转录因子和翻译相关因子的表达调节线粒体的功能，或者通过抑制NK细胞的细胞毒性。Polimeno et al^[17]的研究结果表明，ALR对于干扰素γ(IFNγ)基因表达的影响。IFNγ由激活的NK细胞所产生，对于线粒体转录因子A的表达具有显著的调控作用。外源性ALR对于NK细胞IFNγ的表达具有显著的下调作用，70%肝切除动物模型如果施以外源性IFNγ，则可以抑制线粒体转录因子A的表达活性，同时抑制肝再生的过程。这一结果表明ALR是通过生长因子和免疫因子调节的双重调节机制，影响肝再生的过程。研究结果表明，肝脏中的NK细胞对再生的肝细胞的细胞毒作用可能是爆发性肝炎不能进行有效的肝再生的重要机制。ALR就是通过抑制肝脏内NK细胞的细胞毒活性，来实现促进肝再生的。对于各种类型的急性肝脏疾病肝脏的ALR mRNA、血清中ALR蛋白以及外周血NK细胞毒活性进行检测，以阐明肝再生不力与肝内NK细胞活性之间的关系。结果表明，肝脏内ALR mRNA的表达水平显著提高，血清中ALR水平与肝内ALR mRNA表达水平呈正相关。在急性肝损伤期，血清中ALR水平与NK细胞活性呈显著负相关的关系。ALR由肝脏产生，在肝脏损伤时释放。研究结果表明，肝脏产生的ALR通过抑制肝内NK细胞的细胞毒活性，促进肝再生^[18-24]。

肝脏疾病的病因是多种多样的，发病机制各不相同，因此应该根据病因进行针对性的治疗。这是目前肝脏疾病治疗的根本原则。但是，在目前针对病因学治疗效果欠佳的情况下，针对各种肝脏疾病都有不同程度的肝细胞损伤的实际情况，考虑促进肝细胞损伤的修复和肝细胞的再生也是目前不可或缺的补充治疗手段。相信随着重组人肝再生增强因子的制备成功，对于各种肝脏疾病的治疗有进入到一个崭新的阶段。

4 参考文献

- Zhang CP, Tian ZB, Liu XS, Zhao QX, Wu J, Liang YX. Effects of Zhaoyangwan on chronic hepatitis B and posthepatitis cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:295-298
- Wang RX, Boland GJ, Van Hattum J, De-Gast GC. Long-term persistence of T cell memory to HBsAg after hepatitis B vaccination. *World J Gastroenterol* 2004;10:260-263
- Moreno J, Moraleda G, Barcena R, Mateos M, del Campo S. Response of TT virus to IFN plus ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2004;10:143-146
- Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol* 2004;10:82-85
- Sheen IS, Jeng KS, Shih SC, Wang PC, Chang WH, Wang HY, Shyung LR, Lin SC, Kao CR, Tsai YC, Wu TY. Does surgical resection of hepatocellular carcinoma accelerate cancer

- dissemination? *World J Gastroenterol* 2004;10:31-36
- 6 Festi D, Sandri L, Mazzella G, Roda E, Sacco T, Staniscia T, Capodicasa S, Vestito A, Colecchia A. Safety of interferon beta treatment for chronic HCV hepatitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:12-16
- 7 Wang WS, Leung WK, Chan HL. Icteric flare of chronic hepatitis B in a 95-year old patient. *World J Gastroenterol* 2003;9:2876-2877
- 8 Gunduz H, Karabay O, Tamer A, Ozaras R, Mert A, Tabak OF. N-acetyl cysteine therapy in acute viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2698-2700
- 9 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Chim AM, Tse AM, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:2695-2697
- 10 Mao HX, Lan SY, Hu YW, Xiang L, Yuan ZH. Establishment of a cell-based assay system for hepatitis C virus serine protease and its primary applications. *World J Gastroenterol* 2003;9:2474-2479
- 11 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
- 12 Wang RX, Boland G, Guo Y, Lei SP, Yang CH, Chen J, Tian J, Wen JY, Du KH, van Hattum J, de Gast GC. Is a low dose of hepatitis B vaccine enough for a rapid vaccination scheme? *World J Gastroenterol* 2003;9:2353-2355
- 13 Zhu WF, Yin LM, Li P, Huang J, Zhuang H. Pathogenicity of GB virus C on virus hepatitis and hemodialysis patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:1739-1742
- 14 Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9:1657-1661
- 15 Hou LH, Du GX, Guan RB, Tong YG, Wang HT. In vitro assay for HCV serine proteinase expressed in insect cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1629-1632
- 16 Chu CH, Lin SC, Shih SC, Kao CR, Chou SY. Fatty metamorphosis of the liver in patients with breast cancer: possible associated factors. *World J Gastroenterol* 2003;9:1618-1620
- 17 Polimeno L, Margiotta M, Marangi L, Lisowsky T, Azzarone A, Ierardi E, Frassanito MA, Francavilla R, Francavilla A. A Molecular mechanism of augmenter of liver regeneration as immunoregulator: its effect on interferon-gamma expression in rat liver. *Dig Liver Dis* 2000;32:217-225
- 18 Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I, Starzl TE. Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 1994;20:747-757
- 19 Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, Ihara I, Sakai H, Seki T, Shimonishi M, Porter KA, Starzl TE. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8142-8146
- 20 Stein G, Lisowsky T. Functional comparison of the yeast scERV1 and scERV2 genes. *Yeast* 1998;14:171-180
- 21 Wang G, Yang X, Zhang Y, Wang Q, Chen H, Wei H, Xing G, Xie L, Hu Z, Zhang C, Fang D, Wu C, He F. Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. *J Biol Chem* 1999;274:11469-11472
- 22 Lisowsky T. Dual functions of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* 1992;232:58-64
- 23 Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulphydryl oxidase. *FEBS Lett* 2000; 477:62-66
- 24 Polimeno L, Margiotta M, Marangi L, Lisowsky T, Azzarone A, Ierardi E, Frassanito MA, Francavilla R, Francavilla A. A Molecular mechanism of augmenter of liver regeneration as immunoregulator: its effect on interferon-gamma expression in rat liver. *Dig Liver Dis* 2000;32:217-225

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。

慢性HBV感染者血清病毒动力学的检测及分析

邓国宏, 王宗笠, 王宇明, 王开发, 范 焱

邓国宏, 王宇明, 范焱, 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
王宗笠, 重庆大学理学院 重庆市 400030
王开发, 中国人民解放军第三军医大学数学教研室 重庆市 400038
邓国宏, 男, 1972-12-05 生, 四川省犍为县人, 汉族。1994年第三军医大学本科毕业, 1999年第三军医大学硕士研究生毕业, 讲师。主要从事病毒性肝炎的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30200234, No. 10101029
项目负责人: 邓国宏, 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。ghdengsnp@hotmail.com
电话: 023-66768962 传真: 023-65337618
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-13

Dynamic determination and analysis of serum virus load in patients with chronic HBV infection

Guo-Hong Deng, Zong-Li Wang, Yu-Ming Wang, Kai-Fa Wang,
Yi Fan

Guo-Hong Deng, Yu-Ming Wang, Yi Fan, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Zong-Li Wang, Department of Physics, Chongqing University, Chongqing 400030, China
Kai-Fa Wang, Department of Mathematics, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30200234 and 10101029
Correspondence to: Dr. Guo-Hong Deng, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. ghdengsnp@hotmail.com
Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-11-13

Abstract

AIM: To observe the variation of viral load and characteristics of within-host dynamics in patients with chronic hepatitis B virus infection without receiving antiviral therapy.

METHODS: Serum was collected consecutively from 3 patients with different clinical phenotype, ALT and total bilirubin were determined, and HBV DNA was measured by quantitative TaqMan fluorogenic PCR.

RESULTS: Spontaneous fluctuations of HBV DNA load were observed when measured daily, weekly and monthly in our untreated patients with chronic HBV infection, but there was no determinate correlation between HBV DNA loads and ALT values.

CONCLUSION: The spontaneous fluctuation of viral load in untreated patients with different clinical phenotype displays some characteristic patterns. Here we propose a PID pattern for host feedback to virus using population quantity of HBV as variant, which may be used for the prediction of virus-host ecological evolution in persistent HBV infection.

Deng GH, Wang ZL, Wang YM, Wang KF, Fan Y. Dynamic determination and analysis of serum virus load in patients with chronic HBV infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):862-865

摘要

目的: 观察未抗病毒治疗的慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者体内病毒载量的变化及其动力学特征。

方法: 采用荧光定量 PCR 方法对未进行抗病毒治疗的 3 例不同临床表型的慢性HBV感染者血清HBV载量进行连续监测, 同时测定每一时相点的血清 ALT 和总胆红素。

结果: 不管是间隔 1 d、1 wk 还是 1 mon, 3 例慢性 HBV 感染者体内 HBV DNA 水平均存在自发波动, 且与血清 ALT 和总胆红素变化相关性不确定。

结论: 3 例慢性感染者体内 HBV 载量的自然波动表现出一定的模式特征。我们提出一种宿主对病毒负反馈控制的PID 模式, 以期对持续性病毒感染的体内生态演化作出评价和预测。

邓国宏, 王宗笠, 王宇明, 王开发, 范焱. 慢性HBV感染者血清病毒动力学的检测及分析. 世界华人消化杂志 2004;12(4):862-865
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/862.asp>

0 引言

近年来, 人们逐渐从生态学角度来研究感染性疾病。宿主体内的群体动力学(within-host population dynamics)从多元、综合、定量、演化的角度来研究持续性病毒感染, 着重考虑对决定宿主体内病毒群体丰度(abundance)、多样性(diversity)和分布(distribution)的主要因素以及免疫反应进行定量描述和数学分析, 以揭示宿主体内持续性病毒感染的生态演化特征及机制^[1-4]。虽然人们对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染有不少研究^[5-10], 但对于大量未用药的慢性HBV感染者体内的病毒动力学(within-host viral dynamics)仍然知之甚少, 绝大多数的病毒定量仅限于单一时相点的测定。少量有关HCV的研究显示, 未治疗的慢性HCV感染者体内病毒载量存在自发波动, 变化范围为 2.5-128 倍, 且与 ALT 水平无显著相关^[11]。体内 HBV 的自然波动是否存在尚不清楚。我们采用荧光定量PCR方法对未进行抗病毒治疗的 3 例不同临床表型患者血清 HBV 载量进行了连续监测, 并分析 HBV 载量变化模式与疾病的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 按全国病毒性肝炎防治方案(西安, 2000)诊

表1 3例HBV感染者病史情况

编号	性别	年龄	诊断	HBV血清学标志									
				HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb	HBcAbIgM	HAV	HCV	HDV	HEV
A	男	56	肝炎肝硬化	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B	男	36	慢性肝炎(重度)	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
C	女	38	无症状携带者	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-

1.2 方法 3例患者在监测期及监测前1 a内均未抗病毒治疗。对每例患者均连续采集不同时相点的血样3 mL, 分离血清后检测ALT和总胆红素, 剩余样本-70℃冻存。病毒标志采用商用ELISA试剂盒(上海科华公司产品)检测。血清ALT和总胆红素检测采用7250型全自动生化分析仪(Hitachi, Japan)进行。HBV DNA定量采用LightCycler荧光定量PCR仪(Roche公司)和商用HBV荧光PCR试剂盒(深圳匹基生物)按说明书操作进行。所有标本的病毒定量检测在同一批次进行, 确保各时相点结果之间的可比性。

统计学处理 为了分析两个变量间线性相关密切程度和相关方向, 选用SPSS 9.0统计软件中的Pearson相关分析方法^[12]。计算公式如下:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

其中 \bar{x}, \bar{y} 分别是变量 x, y 的均值; x_i, y_i 分别是变量 x, y 的第 i 个观测值。

2 结果

慢性HBV感染者A血清HBV DNA在观察期间呈波动变化, 开始比较平缓, 逐渐加强, 变化幅度为16倍(最大值/最小值)。患者C血清HBV DNA也呈波动变化, 开始变化较强, 中间平缓, 再加强, 变化幅度为76倍(最大值/最小值)。患者B血清HBV DNA经小幅度波动后总体呈单调递减变化, 25 d后趋于平稳, 变化幅度为3 490倍(最大值/最小值)(见图1, 2)。患者A、C的血清HBV DNA波动与ALT、总胆红素的波动之间无显著相关性, 而患者B血清HBV DNA波动与ALT、总胆红素的波动显著相关见表2。

表2 3例慢性HBV感染者血清HBV DNA与ALT、总胆红素之间的Pearson相关系数

	HBV DNA		
	患者A	患者B	患者C
ALT	0.712(P=0.073)	0.785(P=0.012)	-0.121(P=0.740)
总胆红素	-0.202(P=0.663)	0.863(P=0.003)	0.090(P=0.804)

断标准, 收集肝硬化和慢性肝炎(重度)住院患者各1例, 均为男性; 无症状携带志愿者1名, 女性(表1)。

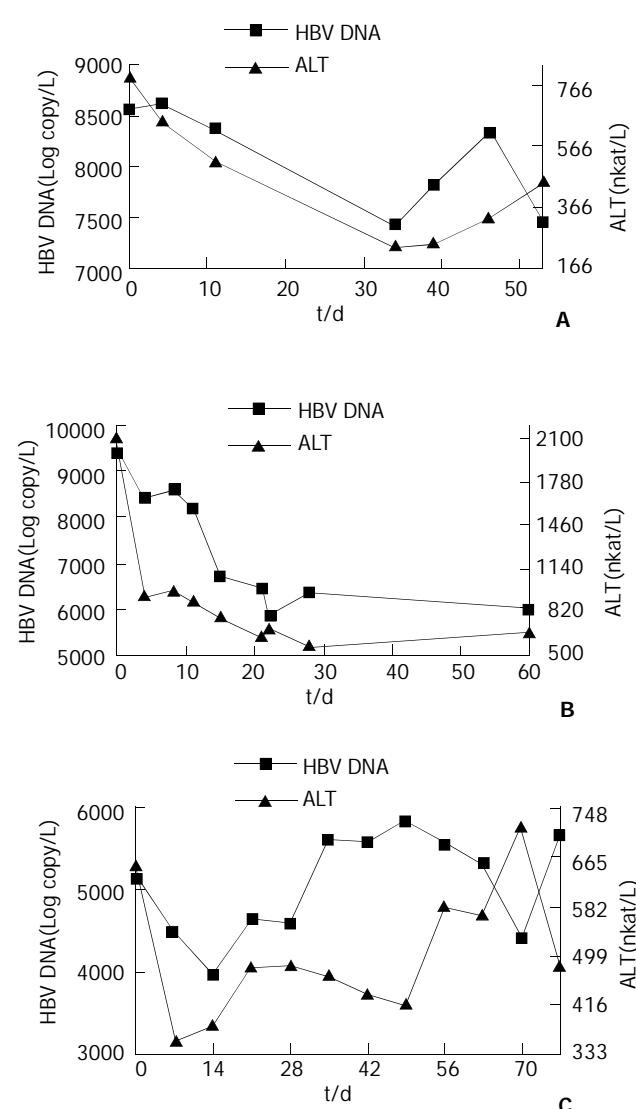
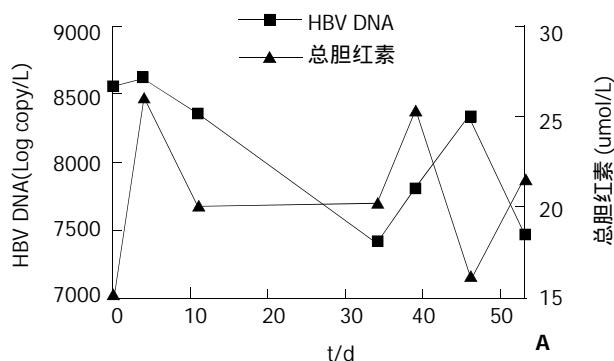


图1 3例慢性HBV感染者血清HBV DNA和ALT。



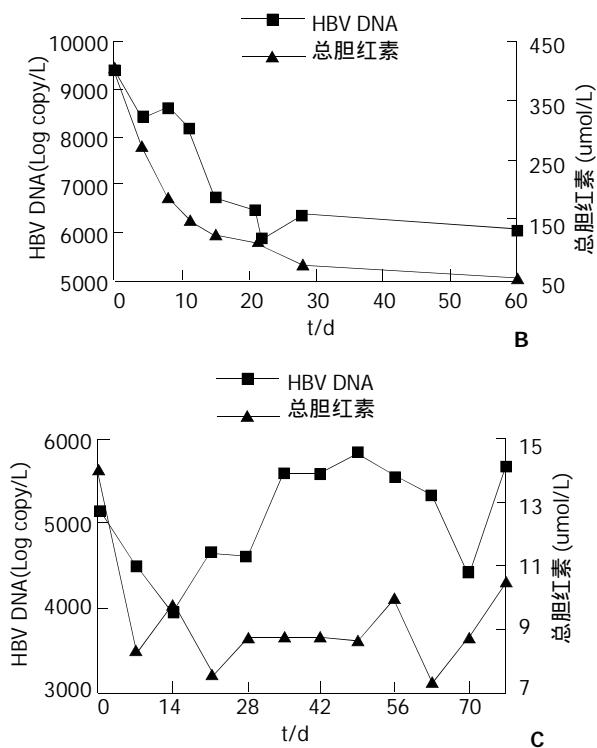


图2 3例慢性HBV感染者血清HBV DNA和总胆红素.

3 讨论

有关自然状态下慢性HCV、HBV感染者体内病毒动力学的研究极少，且采用斑点杂交、bDNA等半定量/定量方法，灵敏度低，稳定性、重复性不好。TaqMan荧光定量PCR方法^[13]是病毒定量中一种特异性强、灵敏度高、准确性好的方法，已开始推广。本实验所有HBV DNA定量均在同一批完成，更避免了定标、操作上的误差，定量数据之间的可比性高。

Chun et al 采用基于PCR的HBV DNA半定量方法对未抗病毒治疗的35例慢性HBV感染者病毒载量进行监测(每2 mo 1次，持续8 mo)，结果表明，慢性HBV感染者血清病毒载量存在大幅度波动，这种自发波动取决于个体，与ALT、前C变异、HBV基因型、血清病毒标志(eAg状态)无关^[14]。我们的结果显示，不管是间隔1 d，1 wk还是1 mo，3例不同临床表型慢性HBV感染者体内HBV DNA水平均存在自发波动。同时，病毒水平的波动表现出一定的模式特征：患者A、C体内病毒水平无明显的单调递增或递减趋势，波动的幅度小，限于100倍以内，与ALT水平变化无相关性，病毒复制和肝功能处于一种相对稳定状态；患者B体内病毒水平呈单调递减，变化幅度大，为3 490倍，与ALT水平变化相关，显示出病毒受抑制、肝功能恢复的过程。限于采样原因，本实验观察到的病毒波动周期尚不够多，以后的研究尚需进一步延长监测时间，并观察更多的不同临床表型的病例数，以找到自然状态下慢性HBV感染者体内病毒动力学不同的特征模式。

实际上，宿主体内感染与免疫的群体动力学是高度非线性的、多元的，精确的数学模型需要考虑很多个变量且往往难以求解。因此，群体动力学研究本身需要新的简便有效的算法，根据体内病毒种群数量的变化来分析感染与免疫非线性相互作用的特征模式。若将健康人体考虑为稳态，则免疫反应类似于一种针对病原的负反馈控制。人体能经受病原体的干扰而恢复到相对稳定状态，表明存在高效的负反馈免疫自控机制。抗病毒药拉米夫定可使血清HBV DNA数量急剧下降，一旦撤除，病毒数量迅速上升至原来的水平并维持平衡，强烈表明机体的负反馈控制具有某种确定性^[15]。同时，HBV感染的病程及发病的严重程度在不同临床类型，甚至不同患者之间又各不相同，表现出极强的个性。PID(比例、积分、微分，partial, integral and differential)算法是自动化控制理论中研究反馈控制的一种优秀的模式，其算法综合考虑变量的当前值、平均值和变化率并给出反馈量，使系统获得长期稳定行为。控制论中的PID算法已成功地应用于神经生物学，在人工神经网络(artificial neural networks, ANNs)、视觉发生、听觉发生等研究中得到充分应用^[16-17]。因此，我们考虑将PID模式用于分析持续性病毒感染中宿主反馈控制的特征。宿主对病毒控制的PID模式可用公式表示如下：

$$X_{i+1} = X_i + \alpha_1 X_i + \alpha_2 \frac{\sum_{j=I-m+1}^i X_j}{m} + \alpha_3 \frac{X_i - \bar{X}_i}{t}$$

(其中 j = I-m+1)

X_i : 病毒的当前量; X_{i+1} : 病毒下一时刻的量; $\frac{\sum_{j=I-m+1}^i X_j}{m}$: 病毒在 X_i 附近的平均值; $\Delta X_i / \Delta t$: 病毒在 i 时刻的前置变化率 $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$: PID 特征参数。

在PID模式下，我们不用知道病毒与宿主相互作用的太多细节，就可以抓住系统反馈控制的关键特征，这些特征可以刻划HBV感染的演化规律。同时，PID模式具有极强的个性，不同的HBV感染临床表型可能具有不同的PID特征。通过特征参数可以预见病毒种群的变化趋势。新近研究表明HBV在体内的清除可能主要依赖于非溶细胞性途径，肝细胞的损伤可能是非特异性CD₈⁺T细胞介导的^[18]。因此，宿主反应的模式是至关重要的，错误的、不考虑病毒种群当前值、平均值和变化率的模式(比如病毒数量已经下降了，宿主却继续损伤肝细胞)会导致严重肝损伤。宿主反应的PID模式可决定HBV是受到控制、持续感染还是暴发肝衰竭。

以HBV种群数量为变量，可确立宿主反应的PID模式特征，从而得到体内HBV动力学参数，包括HBV负载水平、产生率、清除率、感染细胞更新率等。成功的PID模式可同样适用于HCV、HIV等其他持续性病毒感染疾病，对持续性病毒感染的体内生态演化作出评价和预测，为临床防治提供理论依据和行之有效的措施。

4 参考文献

- 1 Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 1999;283:806-809
- 2 Levin BR, Antia R. Why we don't get sick: the within-host population dynamics of bacterial infections. *Science* 2001; 292:1112-1115
- 3 Perelson AS. Modelling viral and immune system dynamics. *Nat Rev Immunol* 2002;2:28-36
- 4 Kelly JK, Williamson S, Orive ME, Smith MS, Holt RD. Linking dynamical and population genetic models of persistent viral infection. *Am Nat* 2003;162:14-28
- 5 Song W, Leung WK, Chan HL. Icteric flare of chronic hepatitis B in a 95-year old patient. *World J Gastroenterol* 2003;9:2876-2877
- 6 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Chim AM, Tse AM, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:2695-2697
- 7 Peng XM, Chen XJ, Li JG, Gu L, Huang YS, Gao ZL. Novel assay of competitively differentiated polymerase chain reaction for screening point mutation of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:1743-1746
- 8 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
- 9 Flinchman D, Kott V, Sookoian S, Campos R. Acute hepatitis C in a chronically HIV-infected patient: Evolution of different viral genomic regions. *World J Gastroenterol* 2003;9:1496-1500
- 10 Baptista M, Kramvis A, Jammeh S, Naicker J, Galpin JS, Kew MC. Follow up of infection of chacma baboons with inoculum containing a and non-a genotypes of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:731-735
- 11 Gordon SC, Khan BA, Dmochowski CF. The spontaneous fluctuation of viremia over time in untreated patients with chronic type C hepatitis. *Hepatology* 1995;22(4 Pt 2):341(A)
- 12 马斌荣. SPSS for Windows 在医学统计中的应用. 北京: 科学出版社, 2001:101-113
- 13 Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 2000;32:626-629
- 14 Chun YK, Kim JY, Woo HJ, Oh SM, Kang I, Ha J, Kim SS. No significant correlation exists between core promoter mutations, viral replication, and liver damage in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2000;32:1154-1162
- 15 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
- 16 Nykamp DQ, Tranchina D. A population density approach that facilitates large-scale modeling of neural networks: analysis and an application to orientation tuning. *J Comput Neurosci* 2000;8:19-50
- 17 Benck S, Slypen I, Meulders JP, Coralciuc V. Experimental partial and total kerma coefficients for aluminium at incident neutron energies from reaction thresholds to 65 MeV. *Phy Med Biol* 2000;45:29-48
- 18 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD₈⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280

World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《World Journal of Gastroenterology, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等。对具有中国特色的研究论文，如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文，将优先发表，使WJG成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁。

乙、丙型肝炎病毒基因联合诊断芯片的研制及应用

陈伟, 李刚, 马会慧, 汤正好, 黄呈辉, 韩晓燕

陈伟, 韩晓燕, 中山大学附属第三医院中心实验室 广东省广州市 510630
李刚, 马会慧, 中山大学附属第三医院传染病科 广东省广州市 510630
汤正好, 上海市第六人民医院传染病科 上海市 200233
黄呈辉, 深圳市宝安区血站 广东省深圳市 518101
陈伟, 男, 1974-10-18生, 湖北省襄樊市人, 汉族。2003年中山大学硕士, 医师。主要从事病毒性肝炎的研究。
广东省科技重点项目资助, No. 2km05302S
项目负责人: 李刚, 510630, 广东省广州市石牌岗顶, 中山大学附属第三医院传染病科, ligangzh@public.guang.gd.cn
电话: 020-87544614 传真: 020-87536401
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2004-02-01

Development and application of a mixed microarray in detection of genes of HBV and HCV

Wei Chen, Gang Li, Hui-Hui Ma, Zheng-Hao Tang, Cheng-Hui Huang, Xiao-Yan Han

Wei Chen, Xiao-Yan Han, Medical Research Center, Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Gang Li, Hui-Hui Ma, Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Zheng-Hao Tang, Department of Infectious Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China
Cheng-Hui Huang, Shenzhen Bao'an Blood Center, Shenzhen 518101, Guangdong Province, China
Supported by the Key Project of the Department of Science and Technology of Guangdong Province, No. 2km05302S
Correspondence to: Gang Li, Medical Research Center, Third Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. ligangzh@public.guang.gd.cn
Received: 2003-10-09 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To develop a DNA microarray to detect hepatitis virus B (HBV) DNA, hepatitis virus C (HCV) RNA, HBV YMDD mutant and HCV genotype simultaneously. At the same time, the chip was compared with other techniques to evaluate its prospect in clinical application.

METHODS: A set of probes was designed to detect HBV DNA, HCV RNA, HBV YMDD mutant and HCV genotype. The probes were synthesized by DNA synthesizer. The microarray was prepared by spotting the probes onto the specially treated glass sliders. Serum samples were collected from inpatients and outpatients at the Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital of Zhongshan University. Among the samples, 20 were confirmed HBV DNA positive by fluorescent quantitation PCR, 20 were HCV RNA positive, 20 were confirmed YMDD mutant by mismatched PCR, 10 were HBV DNA and HCV RNA negative. HBV DNA and HCV RNA were extracted from the serum, then amplified by asymmetric PCR or RT-PCR in the presence of sense fluorescein labeled primers. The products of HBV YMDD and HCV NS-5 were purified and sequenced. Following

the hybridization of amplified products on the microarrays, detection was carried out by the fluorescence scanner. The detection results were obtained by analyzing the intensity and ratio of the fluorescence signals using image analysis software.

RESULTS: For the HBV DNA positive samples and HCV RNA positive samples, an intensive signal was observed at the point of corresponding probes on the microarrays. In detection of YMDD mutant, the coincident rate of the microarray and the mismatched PCR was 75%, the coincident rate of microarray and sequencing was 95%. In detection of HCV genotype, the coincident rate of microarray and sequencing was 75%.

CONCLUSION: The technology of microarray appears to be versatile, with a great sensitivity and specificity in detection of HBV and HCV. Furthermore, it can find co-infection of different virus strains. But it has some false negative rate and false positive rate in HCV genotyping.

Chen W, Li G, Ma HH, Tang ZH, Huang CH, Han XY. Development and application of a mixed microarray in detection of genes of HBV and HCV. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):866-870

摘要

目的: 制备一款肝炎病毒检测芯片, 能同时实现对乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、HBV YMDD 变异株及HCV基因型的检测, 并与其他检测方法进行比较, 以探讨基因芯片技术临床应用的可行性。

方法: 根据HBV、HCV的序列设计出探针, 采用点样法制备芯片。收集HBV DNA阳性及HCV RNA阳性血清各20份, YMDD变异株阳性血清20份, HBV DNA阴性和HCV RNA阴性血清各10份, 用基因诊断芯片检测, 并与荧光定量法、错配PCR及测序法比较。

结果: HBV DNA阳性标本和HCV RNA阳性标本用芯片检测均为阳性; 芯片法检测HBV YMDD变异株和错配PCR法的符合率为75%, 和测序法的符合率为95%; 芯片法检测HCV基因型和测序法的符合率为75%。

结论: 基因诊断芯片的敏感性和特异性较高, 且能检测出不同病毒株的共生状态, 但在检测HCV基因型方面存在一定的假阴性和假阳性。

陈伟, 李刚, 马会慧, 汤正好, 黄呈辉, 韩晓燕. 乙、丙型肝炎病毒基因联合诊断芯片的研制及应用. 世界华人消化杂志 2004;12(4):866-870
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/866.asp>

0 引言

基因芯片是指将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针, 有规律地排列固定于支持物上, 然后与待测的标记样品的基因按碱基配对原理进行杂交, 再通过激光共聚焦荧光检测系统对芯片进行扫描, 并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号作出分析比较, 从而迅速得出所要的信息^[1]。通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种不同的应用价值, 如基因表达谱分析、突变检测、单碱基多态性分析、杂交测序(SBH)、药物筛选及病原体检测^[2-14]等。我们将基因芯片技术应用于常见传染病 - 病毒性肝炎的诊断, 并与其他检测方法比较, 探讨基因芯片在临床诊断方面的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 血清标本来自中山大学附属第三医院传染病科2002/2003年住院和门诊患者, 其中HBV DNA阳性血清20份, HCV RNA阳性血清20份, YMDD变异株阳性血清20份及HBV DNA, HCV RNA阴性血清各10份。

1.2 方法 从GeneBank下载HBV, HCV的相关序列资料, 设计出一套分别用于检测HBV DNA, HCV RNA, HBV YMDD变异株及HCV基因型的探针。采用点样法将合成好的寡核苷酸探针用点样仪按一定的矩阵点在表面经过醛基化处理的玻片上, 同时点上用于系统监控的阴性参照、阳性参照和空白对照(表1)。设计引物根据HBV、HCV的基因组序列, 设计6对引物。有关的HCV靶基因设计了内、外引物各一对以进行巢式PCR。其中引物PBS, P4, S2和YS的5'端用荧光素Cy3标记。取血清100 μL, 加入0.5 mL无菌离心管中, 98 °C 15 min, 12 000 r/min, 离心5 min, 取上清为模板; 将引物PBA稀释10倍, 使PBS与PBA浓度之比为10:1, 进行不对称PCR。循环参数为94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 45个循环, 72 °C 10 min; 将引物YA稀释10倍, 使YS与YA浓度之比为10:1, 进行不对称PCR。循环参数为94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 45个循环, 72 °C 10 min; HCV RNA阳性血清100 μL加入1 mL TRIZOL溶液, 充分混合, 室温放置15 min, 加入0.2 mL氯仿, 振荡摇匀, 室温放置10 min, 4 °C 12 000 rpm离心10 min, 吸取上层水相置于另一无菌离心管中, 加入等体积异丙醇, 室温沉淀10 min, 4 °C 12 000 r/m离心10 min, 弃上清, 75%乙醇洗两遍, 沉淀的RNA于室温下自然干燥, 用10 μL DEPC水重悬沉淀RNA, 置于冰浴立即用于合成cDNA; 采用逆转录试剂盒(MBI), 按说明书操作; 第1次扩增用外引物P1, P3(表2)进行对称PCR, 循环参数为94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 40 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环, 72 °C 10 min。取第1次扩增产物5 μL, 稀释10倍后取5 μL作为模板, 加入内引物, 并将引物P2稀释10倍, 进行不对称PCR, 反应体系和循环参

数同第1次扩增; 第1次扩增用外引物S1, A2(表2)进行对称PCR, 循环参数为94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环, 72 °C 10 min。取第1次扩增产物5 μL, 稀释10倍后取5 μL作为模板, 加入内引物, 并将引物A1稀释10倍, 进行不对称PCR, 反应体系和循环参数同第1次扩增。取四种PCR产物各2 μL, 与24 μL杂交液混匀, 取10 μL杂交混合物加于芯片反应区中, 于45 °C水浴中杂交1 h。杂交反应结束后将芯片依次用洗液A, B, C各清洗1 min, 室温晾干。扫描仪为GenePix4000B; 激光强度和PMT设置为650和33; 激发波长为532 nm; 根据配套软件分析结果.HBV P区包含有YMDD区域的片段及HCV NS-5区片段的序列测定和分析。取PCR产物50 μL电泳, 切取目的条带, 凝胶回收纯化DNA按QIA quick Gel Extraction kit试剂盒说明书进行。PCR产物纯化后, 采用双脱氧链终止法, 在ABI377全自动测序仪上进行双向测序, 测序工作由上海博亚公司和上海生工生物工程服务公司完成。

表1 用于不同检测目的的探针序列

No	Sequence(5' - 3')	Length	Tm	GC%	Target
1	ATA AAG CCT CTC GGT GA	17	47.4	47	1 a
2	CAC CGG CGA TAA CC	14	46.2	64	1 b
3	GCA CCG GCG GTA GC	14	46.8	79	1 b
4	GAT GTA GCA GGT GAG AGT G	19	47	53	1 c
5	GAG AGT GTT ACC GCA GC	17	47.9	59	1 c
6	CAG CGA GTG TAT GGC A	16	47.8	56	2 a
7	TGT AAC CGC AGG ATT G	16	46.8	50	2 b
8	TGC CCT TTG CTG TTT	15	46.2	47	2 c
9	CGC AGT AAA GCC GC	14	47.6	64	3 a
10	GTC TTT GAG ACC CGC G	16	48.1	63.5	3 b
11	GGG CAG TAA TAA CCT T	16	47.7	43.75	4 a
12	GCG TTG GGT GAG TGA C	16	48.1	64	5 a
13	CAG TCC TTG ATG TTG GC	17	48.1	53	6 a
14	CGA TAG CCG CAG TTT TG	17	47.6	53	1 b
15	CGA TAG CCG CAG TTC TG	17	48.3	62.5	1 b
16	AGG TGA AGC GAA GTG C	16	47.9	56	HBV
17	GTT CCG CAG ACC ACT AT	17	47.1	53	HCV
18	AT CAT CCA <u>C</u> AT AAC TGA	17	43.2	35	YVDD
19	ACA TCA TCA ATA TAA CT	17	38.3	24	YIDD
20	CAT CAT CCA TAT AAC TGA	18	45.5	33	YMDD

2 结果

2.1 基因芯片检测HBV DNA和HCV RNA 用HBV DNA荧光定量检测证实为HBV DNA(+)的血清标本20份和HCV RNA荧光定量检测证实为HCV RNA(+)的血清标本20份, 与芯片杂交后, 在相应探针位置均出现很强的杂交信号, 阴性血清无杂交信号(表3, 4)。

表2 HBV, HCV基因相关引物

Name	Polarity	Position	Sequence(5' - 3')
PBS	+	1526	CGCACCTCTCTTACGCC
PBA	-	1795	ATTTATGCCTACAGCCTCC
P1	-	320	ATACTCGAGGTGCACGGTCTACGAGACC
P2	-	310	CACTCTCGAGCACCCATTACAGGCAGT
P3	+	33	CTGTGAGGA ACTACTGTCTT
P4	+	60	TTCACGCAGAAAGCGTCTAG
S1	+	8199	GTSAAAYRCCTGG AAA TCAAAGAA
S2	+	8229	ATGGGSTTYKCRTATGACACC
A1	-	8557	CAGATAACGACAAGGTCGTCTC
A2	-	8624	GTACCT AGTCATAGCCTCCGTG
YS	+	673	AGT GCM ATTTGTTCACTG
YA	-	1105	CCTTGTAAGTTGGCGA

Y = C, T; K = T, G; R = A, G; S = C, G; M = A, C.

表3 基因芯片和荧光定量检测HBV DNA的比较

芯片法	定量法		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	0	20
阴性	0	10	10
合计	20	10	30

表4 基因芯片和荧光定量检测HCV RNA的比较

芯片法	定量法		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	0	20
阴性	0	10	10
合计	20	10	30

表5 芯片法和测序法检测HBV YMDD变异株的结果比较

芯片法	测序法						合计
	YMDD	YVDD	YIDD	V+I	M+V+I	其他	
YMDD	3	0	0	0	0	0	3
YVDD	0	10	0	0	0	0	10
YIDD	0	0	2	0	0	0	2
V+I	0	2	1	0	0	0	3
M+V+I	1	0	0	0	0	0	1
未检出	0	0	0	0	1	1	1
合计	4	12	3	0	0	1	20

2.2 基因芯片检测HBV YMDD变异株 用错配PCR法检测为YMDD变异的血清标本20份, 扩增产物回收纯化后进行DNA序列测定, 结果为YMDD野生株4例, YVDD变异株12例, YIDD变异株3例, 还有1例的

蛋氨酸(M)三联体密码的第3个碱基由G变为A。芯片检测结果为YMDD野生株3例, YVDD变异株10例, YIDD变异株2例, YVDD+YIDD3例, YMDD+YVDD+YVDD1例, 有1例未能检出(表5)。

2.3 基因芯片检测HCV基因型 HCV NS-5区扩增产物20份回收纯化后进行DNA序列测定, 4份测序不成功。16份测序结果用GeneBank的Blast软件进行在线比对, 并用DNAStar和GeneBank中的HCV标准株序列进行同源性分析, 结果表明16份测序样品均为HCV 1b型; 芯片检测结果为HCV 1b型11例, 1c型2例, 1b型+3b型1例, 有2例用芯片未能分型(表6)。

表6 芯片法和测序法检测HCV基因型的结果比较

芯片法	测序法				
	1 b	1 b + 3 b	1 c	未检出	合计
1 b	11	0	0	0	11
1 b + 3 b	1	0	0	0	1
1 c	2	0	0	0	2
未检出	2	0	0	0	2
合计	16	0	0	0	16

3 讨论

在我国, 病毒性肝炎的发病率很高^[15-17], 其中以引起慢性肝炎的乙型、丙型肝炎病毒对患者危害最大^[18-24], 是发展为肝硬化, 肝功能衰竭和原发性肝癌的主要危险因素之一^[25-27], 临幊上很多情况下对HBV、HCV的基因都要进行检测。此外, 随着HBV治疗药物拉米夫定的广泛使用, HBV耐药现象的出现已成为临床应用的一个棘手问题^[28-32], 有效检测HBV耐药相关DNA突变成为指导临床用药, 提高治疗效率, 降低患者负担的重要手段。目前, 最常用的HBV耐药基因诊断方法是DNA测序法。该方法准确但成本较高, 临幊应用有一定局限性; 另一缺点是对感染病毒中优势株的检测效果较好, 但较难发现非优势株, 不能检测多种病毒株并存的情况。由于HCV RNA变异大, 除存在不同型外, 还有很多亚型, 而HCV的基因型在分子流行病学、干扰素疗效评估及疫苗研制等方面具有重要意义^[33-38]。目前国内尚无普遍推广使用的HCV分型标准试剂盒, 应用较多的是LiPA方法^[39], 此法成本较高, 操作较复杂。基因芯片技术由于同时将大量探针固定于支持物上, 所以可以一次性对样品中大量序列进行检测和分析, 基因芯片在病毒性肝炎诊断上的价值在于, 有可能对多种病毒以及病毒的耐药性、变异型等情况, 通过一张芯片同时诊断出来。

实验结果表明, 芯片对HBV DNA和HCV RNA的检出率达到100%, 这和本实验所用的标本有一定关系。为了成功地获得目的片段, 我们选择了荧光定量检测报告病毒拷贝数较高的血清标本。对于HCV RNA阳性的血清标本, 我们采用巢式PCR扩增。HBV DNA阳性

标本 20 例和 HCV RNA 阳性标本 20 例芯片检测皆为阳性, 扩增产物稀释 16 倍后, 仍可检测到很强的荧光信号, 阴性血清芯片检测全部阴性。说明 HBV DNA、HCV RNA 检测探针设计合理, 芯片质量控制较好, 无假阳性出现, 芯片具有较好的敏感性和特异性。基因芯片检测 HBV YMDD 变异株与测序法比较, 二者完全一致的 15 例(15/20), 部分一致的有 4 例(4/20), 两种方法的符合率为 95%, 此外, 有些测序报告为单一病毒株的样品, 和芯片杂交后, 在不同的探针位置都有阳性荧光信号, 且信号强度有差别, 考虑为不同病毒株共存, 信号强的探针所对应的病毒株即为优势株, 实验中还发现, 芯片检测 HBV YMDD 变异株时有 1 例未检出, 假阴性率为 5%, 假阴性的出现是因为在探针对应的序列附近有碱基发生突变, 由此可见, 基因芯片检测 HBV YMDD 变异株的敏感性和特异性均较高, 还能检测出野生株和变异株共存情况, 这有利于判断病情变化和指导临床用药。用芯片检测 HCV 基因型时假阴性率和假阳性率各为 12.5%, 通过比较测序结果和探针序列, 发现假阴性的出现是由于 2 例标本的核酸序列与探针在相应区域有 1~2 个碱基不同, 而且这些有差异的碱基接近探针的中心位置, 致使杂交时不能结合; 假阳性的出现则是因为有 2 例标本的核酸序列与探针序列很接近, 碱基差异位于探针 5' 端, 二者发生非特异性结合。

基因芯片技术是在 PCR 的基础上用核酸杂交加以确认, 有较高的灵敏度和特异性, 可以直接检测病原体, 尤其针对用常规检测方法灵敏度低、费时、难以判断预后、或不能对具有治疗意义的亚群进行检测的病原体, 则更有价值。但在实际操作中, 直接采用核酸杂交进行检测, 杂交信号难以检测, 导致敏感性低, 所以在目前, 样品扩增, 如通过 PCR 来提高敏感性仍是必不可少的措施, 但亦导致实验步骤的复杂化和扩增环节带来的假阳性和假阴性。因此, 从多个方面进行优化, 包括标记方式的改进, 提高杂交信号检测仪器的灵敏度, 杂交温度的控制等都是基因芯片能否用于临床检测的关键^[40~42]。

4 参考文献

- 1 Gabig M, Wegrzyn G. An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochim Pol* 2001;48:615~622
- 2 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531~537
- 3 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆萌英, 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
- 4 Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SP, Collins FS. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat Genet* 1996;14:441~447
- 5 Cronin MT, Fucini RV, Kim SM, Masino RS, Wespi RM, Miyada CG. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat* 1996;7:244~255
- 6 Lindroos K, Sigurdsson S, Johansson K, Ronnblom L, Syvanen AC. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e70
- 7 Iwasaki H, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Knight J, Daniel S, Shi M, Emi M. Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides. *DNA Res* 2002;9:59~62
- 8 Dubiley S, Kirillov E, Lysov Y, Mirzabekov A. Fractionation, phosphorylation and ligation on oligonucleotide microchips to enhance sequencing by hybridization. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2259~2265
- 9 Drmanac R, Drmanac S, Baier J. DNA sequencing by hybridization with arrays of samples or probes. *Methods Mol Biol* 2001;170:173~179
- 10 Fuhrman S, Cunningham MJ, Wen X, Zweiger G, Seilhamer JJ, Somogyi R. The application of shannon entropy in the identification of putative drug targets. *Biosystems* 2000;55:5~14
- 11 Marton MJ, DeRisi JL, Bennett HA, Iyer VR, Meyer MR, Roberts CJ, Stoughton R, Burchard J, Slade D, Dai H, Bassett DE Jr, Hartwell LH, Brown PO, Friend SH. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med* 1998;4:1293~1301
- 12 Chen YH, Wang WC, Young KC, Chang TT, Chen SH. Plastic microchip electrophoresis for analysis of PCR products of hepatitis C virus. *Clin Chem* 1999;45:1938~1943
- 13 Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2000;38:781~788
- 14 阎小君, 苏成芝. 生物芯片技术在 Hp 诊断和研究中的应用. 世界华人消化杂志 1999;7:737~739
- 15 Li G, Ma HH, Lau GK, Leung YK, Yao CL, Chong YT, Tang WH, Yao JL. Prevalence of hepatitis G virus infection and homology of different viral strains in Southern China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1081~1087
- 16 Yan J, Chen LL, Lou YL, Zhong XZ. Investigation of HGV and TTV infection in sera and saliva from non-hepatitis patients with oral diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:857~862
- 17 Chen YD, Liu MY, Yu WL, Li JQ, Dai Q, Zhou ZQ, Tismanetzky SG. Mix-infections with different genotypes of HCV and with HCV plus other hepatitis viruses in patients with hepatitis C in China. *World J Gastroenterol* 2003;9:984~992
- 18 Wang T, Wang Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcriptor NF-kappaB regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:356~360
- 19 Huang JM, Huang TH, Qiu HY, Fang XW, Zhuang TG, Liu HX, Wang YH, Deng LZ, Qiu JW. Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol* 2003;9:736~740
- 20 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445~454
- 21 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
- 22 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
- 23 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25~27
- 24 Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL, Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6:805~811

- 25 Poovorawan Y, Chatchatee P, Chongsrisawat V. Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis: a global perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S155-166
- 26 杜竟辉, 查文章. 丙型肝炎与原发性肝癌关系研究现状. 世界华人消化杂志 1999;7:176-179
- 27 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745
- 28 Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:61-68
- 29 姚光弼, 王宝恩, 崔振宇, 姚集鲁, 曾明德. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎患者的长期疗效. 中华肝脏病杂志 1999;7:80-83
- 30 Dusheiko G. Lamivudine therapy for hepatitis B infection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1999;230:76-81
- 31 Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996;24:711-713
- 32 郑可飞, 杨守平, 陈孟峰, 黄志贤, 胡晚霞, 倪炼. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎 HBV YMDD 变异与肝组织病理状况. 世界华人消化杂志 2002;10:1089-1091
- 33 Kanai K, Kako M, Okamoto H. HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to interferon. *Lancet* 1992;339:1543
- 34 Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Croce LS, Franzin F, Unoura M, Bercich L, Tiribelli C, Crovatto M, Santini G. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol* 1994;43:291-296
- 35 Takada N, Takase S, Enomoto N, Takada A, Date T. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J Hepatol* 1992;14:35-40
- 36 Pozzato G, Moretti M, Franzin F, Croce LS, Tiribelli C, Masayu T, Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet* 1991;338:509
- 37 Silini E, Bottelli R, Asti M, Bruno S, Candusso ME, Brambilla S, Bono F, Iamoni G, Tinelli C, Mondelli MU, Ideo G. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a case-control study. *Gastroenterology* 1996;111:199-205
- 38 Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Yasuji A, Koida I, Saitoh S, Hashimoto M, Iwasaki S, Kobayashi M, Hiromitsu K. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994;19:1088-1094
- 39 Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Lunel F, Laurent-Puig P, Pawlotsky JM, Kleter B, Bassit L, Nkengasong J, van Doorn LJ. Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples. *Virus Res* 1995;38:137-157
- 40 Tran PH, Peiffer DA, Shin Y, Meek LM, Brody JP, Cho KW. Microarray optimizations: increasing spot accuracy and automated identification of true microarray signals. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e54
- 41 Efron B, Tibshirani R. Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays. *Genet Epidemiol* 2002;23:70-86
- 42 Yuen T, Wurmback E, Pfeffer RL. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e48

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.

大鼠骨髓基质干细胞分化为胰岛样细胞

陈立波, 姜小兵, 杨 炳

陈立波, 姜小兵, 杨炳, 华中科技大学协和医院外科 湖北省武汉市430022
陈立波, 男, 1972-10-15生, 江苏省泗洪县人, 汉族。1997年同济医科大学七年制硕士毕业, 2000年华中科技大学同济医学院博士毕业, 副教授, 副主任医师。主要从事肝癌生物学和胰岛细胞移植等的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30170911
湖北省科技攻关计划, No. 2002AA301C26
项目负责人: 陈立波, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科。libo_chen@hotmail.com
电话: 027-85726301 传真: 027-85776343
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-12-08

Islet-like cells differentiated from rat marrow mesenchymal stem cells

Li-Bo Chen, Xiao-Bin Jiang, Lian Yang

Li-Bo Chen, Xiao-Bin Jiang, Lian Yang, Department of Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30170911, and Science and Development Foundation of Hubei Province, No. 2002AA301C26
Correspondence to: Dr. Li-Bo Chen, Department of Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. libo_chen@hotmail.com
Received: 2003-10-10 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To explore the possibility of differentiating functional islet-like cells from marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Rat marrow mesenchymal stem cells (MSC) were isolated from Wistar rats and cultured. Passaged MSCs were induced to differentiate into islet-like cells under following condition: LN group, pre-induced with L-DMEM including 10 mmol/L Nicotinamide + 1 mmol/L β -Mercaptoethanol + 20 mL/L fetal bovine serum for 24 h, then induced with serum free H-DMEM solution including 10 mmol/L nicotinamide + 1 mmol/L β -mercaptoethanol for 10 h. HN group, pre-induced with L-DMEM including 20 mmol/L Nicotinamide + 20 mL/L fetal bovine serum for 24 h, then induced with serum free H-DMEM solution including 10 mmol/L nicotinamide for 10 h. Differentiated cells were observed under inverse microscope, insulin and nestin expressed in differentiated cells were detected with immunocytochemistry. Diabetes model was induced with streptozotocin (STZ) injection, and 3 diabetes rats were subcutaneously injected with 1×10^7 islet cells differentiated from MSC respectively, and blood glucose level was tested 1 week after cell injection.

RESULTS: Islet-like clustered cells were observed under both LN and HN groups, abundant insulin expression was detected in islet-like cells, and nestin was detected in pre-differentiated cells. Glucose level in STZ-diabetic rats could be effectively controlled by islet cells differentiated from MSC.

CONCLUSION: Islet-like functional cells can be differentiated from marrow mesenchymal stem cells, which may be a new procedure for clinical treatment of diabetes.

Chen LB, Jiang XB, Yang L. Islet-like cells differentiated from rat marrow mesenchymal stem cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4): 871-874

摘要

目的: 探讨体外自体骨髓基质干细胞(MSC)定向诱导分化为胰岛样细胞的可能性, 为进一步诱导分化胰岛细胞治疗糖尿病奠定实验和理论基础。

方法: 对Wistar大鼠骨髓基质干细胞(MSC)进行体外培养, 通过不同的条件诱导MSC向胰岛样细胞分化: LN组, 10 mmol/L尼克酰胺+1 mmol/L β -巯基乙醇的L-DMEM(含20 mL/L FBS)预先诱导24 h, 10 mmol/L尼克酰胺+1 mmol/L β -巯基乙醇的无血清H-DMEM诱导10 h。HN组, 含20 mmol/L尼克酰胺的L-DMEM(20 mL/L FBS)预先诱导24 h, 20 mmol/L尼克酰胺的无血清H-DMEM诱导10 h。诱导细胞形态通过倒置显微镜观察, 并通过免疫细胞化学检测分化细胞表达Insulin和Nestin。向3只Streptozotocin(STZ)诱导糖尿病大鼠皮下种植MSC分化胰岛细胞 1×10^7 , 1 wk后观察大鼠血糖水平变化。

结果: LN、HN组细胞均可见部分骨髓基质干细胞分化、增生, 形成胰岛样细胞团, 部分细胞向神经元样细胞分化, 对照组细胞未见明显分化。免疫细胞化学显示Insulin在诱导细胞呈显著表达, Nestin在分化前细胞显著表达。皮下种植MSC分化胰岛细胞可有效降低STZ糖尿病大鼠的血糖水平。

结论: 体外诱导骨髓基质干细胞定向分化为胰岛样细胞存在可行性, 本实验将可能为临床糖尿病干细胞治疗提供新的途径。

陈立波, 姜小兵, 杨炳. 大鼠骨髓基质干细胞分化为胰岛样细胞. 世界华人消化杂志 2004;12(4):871-874

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/871.asp>

0 引言

骨髓基质干细胞(marrow mesenchymal stem cell, MSC)存在定向分化潜能, 已有报道MSC可以分化为脂肪细胞、软骨细胞、肌细胞等中胚层细胞和神经细胞等外

胚层细胞以及肝细胞等内胚层细胞^[1-2]。但对MSC是否可以在体外直接诱导分化为胰岛细胞国内外文献都未见报道。我们发现，在体外培养大鼠MSC，通过不同条件培养基对MSC进行定向诱导分化，可以稳定诱导部分MSC形成功能性胰岛样细胞团，在体实验初步证明MSC分化胰岛细胞可有效降低STZ糖尿病大鼠的血糖水平。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠购自同济医学院实验动物中心。L-DMEM、H-DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)等购自GIBCO公司， β -巯基乙醇、尼克酰胺、B27购自Sigma公司；Nestin、Insulin mAB购自Santa Cruz公司。

1.2 方法 无菌条件下取4-8 wk Wistar大鼠胫骨和股骨，用含20 mL/L FBS的L-DMEM冲出骨髓，充分吹打成单细胞悬液，200目筛网过滤，调整细胞密度，按 $1 \times 10^9/L$ 密度接种，37℃、502 mL/L CO₂的细胞培养箱培养48 h后更换培养液，弃去未贴壁细胞，此后每3-4 d换液1次。约10 d待MSC接近长满瓶底时以252 mL/L胰蛋白酶消化、吹打成单细胞悬液，1 000 r/min离心10 min，弃上清，用含20 mL/L FBS的L-DMEM悬浮沉淀，按1:3比例传代。取传至2-3代的MSC细胞按 $5 \times 10^8/L$ 密度接种于置有盖玻片的24孔板内制备细胞爬片，待细胞长至70-80%融合时，按下列几种方法诱导MSC分化：LN组，10 mmol/L尼克酰胺+1 mmol/L β -巯基乙醇的L-DMEM(含20 mL/L FBS)预先诱导24 h，更换培养液，PBS洗涤3次，再加入含10 mmol/L尼克酰胺+1 mmol/L β -巯基乙醇的无血清H-DMEM诱导10 h。HN组，含20 mmol/L尼克酰胺的L-DMEM(20 mL/L FBS)预先诱导24 h，更换培养液，PBS洗涤3次，再加入含20 mmol/L尼克酰胺的无血清H-DMEM诱导10 h。同时设立以下对照组：(1)不加任何诱导剂，(2)10 mmol/L尼克酰胺，(3)加1 mmol/L β -巯基乙醇。不同时期诱导细胞在倒置显微镜下观察形态变化，免疫细胞化学检测细胞表达insulin和Nestin的表达水平。

1.3 分化细胞在体控制血糖效应的初步观察 取200 g左右健康大鼠经尾静脉注射STZ 50 mg/kg制备糖尿病模型。1 wk后以8只血糖水平高于24 mmol/L大鼠为实验对象，3只大鼠各皮下注射诱导分化细胞 1×10^7 ，3只大鼠各皮下注射未诱导分化细胞 1×10^7 ，2只大鼠为接受皮下注射为空白对照。注射细胞1 wk后测定各只大鼠血糖水平。

2 结果

2.1 MSC的分离培养分化 将骨髓细胞悬液接种在培养瓶里，48 h内可见大量贴壁细胞，此时换液除去未贴壁细胞，3-4 d后可见数个细胞克隆，细胞为纺锤形，成网状或栏栅状排列，形态均一。10-15 d后MSC

接近融合，传2-3代后MSC纯度达99%以上。通过LN、HN诱导骨髓基质干细胞分化30 min-2 h，光镜下可见部分细胞转分化为胰岛样细胞(图1)，倒置显微镜下细胞呈圆形团状排列，细胞内含有丰富的内分泌颗粒，和ESC定向分化形成的胰岛样细胞相似。并可见部分细胞分化为神经元样细胞。而不同对照条件下培养的MSC细胞仍呈梭形，无上述胰岛样细胞形成。



图1 MSC诱导分化为胰岛样细胞($\times 40$)。

2.2 检测Insulin、Nestin等的表达 在诱导分化为胰岛样细胞的胞质中可以见到大量的insulin阳性表达产物，而在未分化的梭形细胞未见到insulin表达(图2)。我们同时发现，nestin在分化前梭形细胞呈阳性表达，尤其在向神经元样分化细胞中表达明显(图3)。

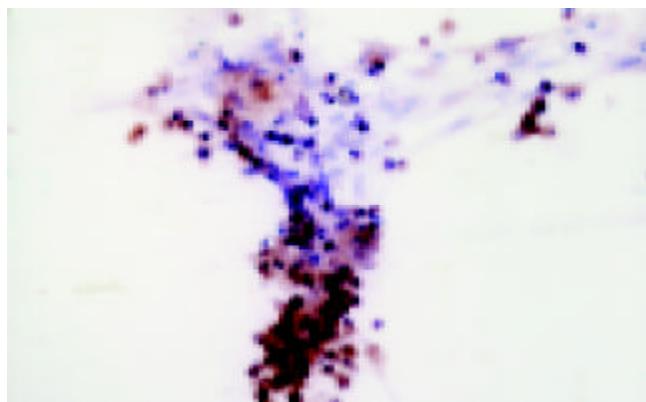


图2 Insulin在诱导分化细胞表达($\times 10$)。

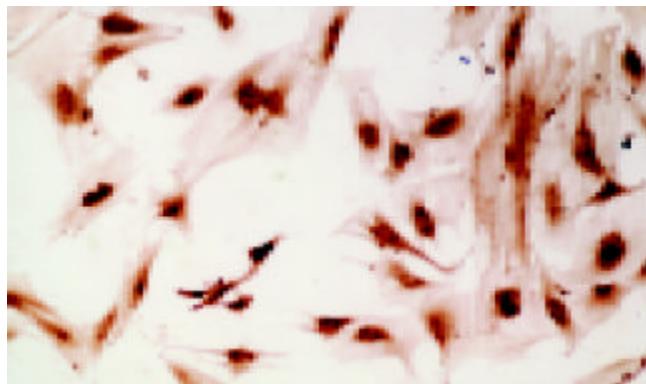


图3 Nestin在分化为胰岛样细胞前的MSC表达($\times 40$)。

2.3 皮下种植MSC分化胰岛细胞对糖尿病大鼠血糖水平控制的初步观察见表1.

表1 MSC 分化胰岛细胞在体控制糖尿病大鼠血糖水平

不同注射组	注射前	注射 1 wk 后
	血糖水平(mmol/L)	血糖水平(mmol/L)
分化细胞1	>33.3	25.4
分化细胞2	>33.3	21.4
分化细胞3	25.3	19.7
未分化细胞1	>33.3	>33.3
未分化细胞2	28.9	29.7
阴性对照鼠	>33.3	>33.3

由于实验组动物数量较少且实验持续时间较短, 我们未进行统计学处理。尽管缺乏统计学依据, 但从表1可以推测, 和MSC相比, 诱导分化形成的胰岛样细胞可有效降低糖尿病大鼠血糖水平。

3 讨论

糖尿病是世界范围的常见病, 胰岛细胞移植是最有价值的治疗方法之一, 但供体来源缺乏、胰岛细胞体外以及移植活力难以维持和移植排斥等阻碍了胰岛细胞移植的应用^[3-7]。胰腺导管上皮内干细胞^[8-14]、胚胎干细胞(ESC)^[15-20]和其他多种来源的干细胞^[21-22]可分化为功能性胰岛细胞, 但存在供体细胞来源不足或移植排斥等缺陷。近来发现骨髓基质干细胞(MSC)可以诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞、肌细胞、内皮细胞、神经细胞、肝细胞等多胚层细胞^[1-2, 23-26]。诱导MSC分化为功能性细胞理论上可以解决器官移植的主要障碍: (1)自体MSC定向分化后移植(Auto-graft)可以避免移植排斥; (2)骨髓干细胞来源丰富且具有巨大的增生效能^[27], 可能解决供体来源不足问题, 为临床提供足够的功能细胞或组织。

骨髓基质干细胞不仅可分化为中胚层细胞如脂肪细胞, 也可以分化为肝细胞等内胚层细胞; 肝细胞和胰岛细胞来源于同一祖细胞^[21], 肝细胞中的干细胞可以转分化为胰岛细胞^[22], 都表明诱导骨髓干细胞分化为胰岛细胞理论上存在可行性。在体实验也证明分化骨髓细胞可以在受体糖尿病动物胰岛中分化为胰岛样细胞, 并有效调控血糖水平^[28]。因而, 通过分离患者自体骨髓干细胞并诱导分化, 将可能提供足够的功能性胰岛细胞, 而不会发生移植排斥, 具有重要的科研价值和临床应用前景。但在体外直接诱导MSC分化为功能性胰岛样细胞尚未见报道。我们通过分离培养大鼠MSC, 并采取适当条件成功诱导MSC向胰岛样细胞分化。

我们通过不同条件诱导MSC体外定向分化, 首次发现MSC可以分化为胰岛样细胞团。形态学和初步的功能鉴定结果可确定所诱导细胞为胰岛样细胞: (1)ESC诱导的胰岛样细胞在形态上和本组结果相似^[16]; (2)MSC可

向中胚层分化, 本组诱导细胞形态上属于内胚层细胞, 说明MSC已被成功诱导跨胚层分化, 内胚层细胞在适宜条件下可向肝细胞、胰岛细胞进一步分化, 而尼克酰胺是较特异的胰岛细胞分化剂, 因而本组细胞为胰岛样细胞; (3)本组中部分细胞向神经元样细胞分化, 细胞分化过程中胰岛样细胞可能来源于神经元样细胞^[8-9, 12, 16], 进一步支持本组细胞属于胰岛样细胞。免疫组织化学显示insulin在诱导分化细胞呈特异性表达, 从蛋白水平证实本组诱导细胞为功能性胰岛样细胞。有报道Nestin阳性细胞是ESC等干细胞向胰岛样细胞分化过程中胰岛样细胞的前体细胞^[12, 16]。为进一步确定MSC诱导分化为胰岛样细胞的可能性, 我们对胰岛细胞Nestin的表达进行检测, 发现Nestin在胰岛样细胞分化前的细胞呈特异表达, 尤其在部分向神经元样细胞分化的细胞中显著表达, 进一步证明MSC向胰岛样细胞诱导的可行性。有报道干细胞可通过细胞融合或黏附相应蛋白质而获得其他细胞表型^[29-31], 本组中分化细胞性质还需要RT-PCR 检查insulin基因转录、测定细胞分泌insulin等的进一步验证。尽管缺乏统计学资料, 我们的在体实验初步表明MSC分化胰岛细胞可有效降低糖尿病大鼠的血糖水平。

本文首次报道体外骨髓基质干细胞(MSC)可以诱导分化为胰岛样细胞。尽管需要对分化细胞进行进一步的功能学鉴定、MSC分化细胞的免疫学特性, 以及明确分化细胞对糖尿病的治疗效应, 我们的形态学和初步功能表明这些细胞为功能性胰岛样细胞。本研究结果为通过MSC诱导胰岛样细胞、以及通过大规模制备分化功能胰岛细胞治疗糖尿病提供了新的途径。

4 参考文献

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-377
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbett GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-238
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7999-8004
- Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 2002;143:3152-3161
- Schmid BM, Ulrich A, Matsuzaki H, Ding X, Ricordi C, Weide L, Moyer MP, Batra SK, Adrian TE, Pour PM. Transdifferentiation of human islet cells in a long-term culture. *Pancreas* 2001;23:157-171
- Lipsett M, Finegood DT. beta-cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes* 2002;51:1834-1841

- 8 Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000;6:278-282
- 9 Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 2000;127:3533-3542
- 10 Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 2000;49:163-176
- 11 Guz Y, Nasir I, Teitelman G. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 2001;142:4956-4968
- 12 Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001;50:521-533
- 13 Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 2003;52:2007-2015
- 14 Hardikar AA, Marcus-Samuels B, Geras-Raaka E, Raaka BM, Gershengorn MC. Human pancreatic precursor cells secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet-like cell aggregates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7117-7122
- 15 Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quieto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000;49:157-162
- 16 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-1394
- 17 Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-1671
- 18 Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16105-16110
- 19 Shiroi A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, Takahashi Y. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* 2002;20:284-292
- 20 Kim D, Gu Y, Ishii M, Fujimiy M, Qi M, Nakamura N, Yoshikawa T, Sumi S, Inoue K. In Vivo Functioning and Transplantable Mature Pancreatic Islet-Like Cell Clusters Differentiated from Embryonic Stem Cell. *Pancreas* 2003;27:E34-E41
- 21 Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 2001;128:871-881
- 22 Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8078-8083
- 23 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- 24 Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, Etievent JP, Kantelip JP. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003;108(Suppl 1):II253-II258
- 25 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49
- 26 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- 27 Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-2625
- 28 Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003;111:843-850
- 29 Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 2003;299:363
- 30 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542-544
- 31 Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2397-2402

一氧化氮在大鼠梗阻性黄疸继发肝功能损伤中的作用

涂 巍, 智迎辉, 郭仁宣

涂巍, 智迎辉, 郭仁宣, 中国医科大学附属第一医院普外二科 辽宁省沈阳市 110001

涂巍, 男, 1962-04-08 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族。1986 年中国医科大学学士, 2000 年日本关西医科大学博士, 2000 于日本关西医科大学博士后研究, 2001 年中国医科大学博士后研究, 副研究员。主要从事肝、胆、胰外科疾病的病理生理研究, 已发表论文 13 篇, 参与编写专著 3 部。

中国医科大学博士后启动基金项目, No. 2002-157

项目负责人: 涂巍, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普外二科. tuwei77@hotmail.com

电话: 024-23281793

收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-24

Effect of nitric oxide on hepatic dysfunction in rat obstructive jaundice

Wei Tu, Ying-Hui Zhi, Ren-Xuan Guo

Wei Tu, Ying-Hui Zhi, Ren-Xuan Guo, The Second Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by Postdoctoral Foundation of China Medical University, No. 2002-157

Correspondence to: Dr. Wei Tu, The Second Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. tuwei77@hotmail.com

Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-24

Abstract

AIM: To examine whether obstructive jaundice influences the production of nitric oxide and alters hepatic functions including energy metabolism.

METHODS: Hepatocytes were isolated by perfusing the liver with collagenase and cultured from a rat model of obstructive jaundice or sham-control. Rat cultured hepatocytes were incubated with cytokines including IL-1 β . The production of nitric oxide was measured with Griess reagent method and Western blot analysis. Adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) were measured by a high performance liquid chromatography. Ketone bodies in the medium were measured enzymatically.

RESULTS: Obstructive jaundice increased the production of nitric oxide by IL-1 β time-and dose-dependently. Western blot analysis revealed that protein levels of iNOS were unchanged between two groups. IL-1 β decreased the ATP content and KBR in obstructive jaundice but not that in sham-control. Addition of L-NMMA blocked the decreases of ATP content and KBR as well as nitric oxide production.

CONCLUSION: Enhancement of nitric oxide production following obstructive jaundice is associated with the alteration of hepatic energy metabolism through mitochondrial dysfunction, resulting in liver failure. Regulation of nitric oxide may be a useful therapy for preventing liver damage in obstructive jaundice.

Tu W, Zhi YH, Guo RX. Effect of nitric oxide on hepatic dysfunction in rat obstructive jaundice. Shijie Huaren Zazhi 2004;12(4):875-879

摘要

目的: 探讨一氧化氮(NO)在梗阻性黄疸合并肝功能障碍中的作用。

方法: 将 56 只 Wistar 大鼠随机分成假手术对照组和胆总管结扎组(实验组)。应用胶原酶灌注法分离肝细胞并进行培养; 用白介素-1 β (IL-1 β)等细胞因子处理培养的肝细胞, 应用 Griess 法和 Western 印迹分析法检测两组 NO 及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的产生; 应用高效液相色谱法(HPLC)检测两组肝细胞 5' 三磷酸腺苷(ATP)的合成; 应用酶法检测两组肝细胞酮体含量并计算酮体比率(乙酰乙酸盐/ β -羟基丁酸盐)(KBR)。

结果: 实验组 NO 产生量明显高于对照组($207.99 \mu\text{mol/L}$ vs $78.57 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$); NO 的产生与 IL-1 β 作用时间和作用剂量有关; 实验组和对照组的 iNOS 产生量在蛋白水平没有差异; IL-1 β 降低了实验组培养肝细胞的 ATP 含量($15.94 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}$ vs $20.21 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}$, $P < 0.05$), 对照组改变不明显; IL-1 β 降低了两组的 KBR, 实验组降低程度大于对照组; 一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 N^G-甲基-L-精氨酸(L-NMMA)抑制了 NO 的产生, 使降低的肝细胞 ATP 含量、KBR 得以恢复。

结论: 梗阻性黄疸能够促进肝细胞产生 NO, 导致肝功能障碍。L-NMMA 可以缓解由于大量 NO 导致的 ATP 合成障碍及 KBR 下降。对 NO 产生的调节可能会成为预防及治疗梗阻性黄疸继发肝功能损害的有效方法。

涂巍, 智迎辉, 郭仁宣. 一氧化氮在大鼠梗阻性黄疸继发肝功能损伤中的作用.

世界华人消化杂志 2004;12(4):875-879

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/875.asp>

0 引言

梗阻性黄疸患者术后经常并发肝功能衰竭, 严重者导致死亡。梗阻性黄疸可以导致机体复杂而严重的病理生理改变^[1-3], 但目前其机制尚不清楚。一氧化氮(NO)对机体生理活动的影响作用主要依靠刺激因子的种类和反应条件^[4-8]。某些细胞因子如 IL-1 β 等能够诱导肝细胞 iNOS 基因的表达, 促进肝细胞产生 NO, 抑制 ATP 合成, 降低酮体比率(KBR), 从而造成细胞线粒体功能的异常^[9-11]。因此, 可以推测 NO 与梗阻性黄疸并发的肝功能衰竭之间存在着密切关系。目前, 国内外关于此方面的研究较少并且存在着争议。我们检测梗阻性黄疸大鼠肝细胞 NO

的产生并探讨其在肝功能障碍中的作用如下:

1 材料和方法

1.1 材料 56只♂Wistar大鼠(6-8周龄, 250-300g), 由中国医科大学实验动物管理中心提供。人重组IL-1 β 由大冢制药公司提供, 每毫克IL-1 β 蛋白含有 2×10^7 U的活性成分。兔抗鼠iNOS多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。Williams' E培养基购自美国GIBCO公司。ECL显色剂购自Amersham Pharmacia公司。测定酮体含量的酶反应试剂盒购自美国Phoenix Pharmaceuticals公司。其他试剂购自美国Sigma公司。

1.2 方法 动物模型制作根据中国医科大学实验动物管理中心的饲养方法喂养所有大鼠。实验动物随机分成2组: 假手术对照组28只; 胆总管结扎组(实验组)28只。在乙醚全身麻醉下, 对实验组大鼠进行胆总管结扎术: 取上腹部正中切口入腹, 游离胆总管后用4-0丝线双重结扎, 结间横断胆总管, 关腹。对照组仅在胰腺上方游离胆总管, 不结扎即关腹^[12]。分别于术后1, 3, 5, 7d对实验组(OJ)和对照组(Sham)大鼠取血样。血样在室温下存放30min后进行血清生化分析, 即测定两组大鼠血清总胆红素水平和转氨酶水平。应用胶原酶灌注法, 分别于术后1, 3, 5, 7d从OJ组和Sham组大鼠肝脏中分离肝细胞^[13]。应用trypan blue法计算选取具有80%以上活性的肝细胞进行培养。将每毫升含有 $5\text{-}6\times10^5$ 个有活性细胞的培养液播种于塑料培养皿(2mL培养液/培养皿, 美国Falcon Plastic公司)中。将培养皿放入37℃、50mL/L CO₂的温箱内进行单层培养。培养基为Williams' E培养基(含有11mM的葡萄糖), 其中加入100mL/L新生小牛血清, HEPES(5mM), 青霉素(100ku/L), 链霉素(0.1g/L), 地塞米松(10^{-8} mol/L)和胰岛素(10^{-8} mol/L)。培养4-5h后用含有新鲜血清而不含激素的培养基(1.5mL/皿)取代原培养基, 培养过夜后以备后续实验。参考Horiuti法通过计算细胞核的数量推算细胞数量^[14]。细胞核与细胞比例为 1.39 ± 0.03 (mean±SD)。应用显微镜确定培养肝细胞的纯化率大于98%^[15]。NO产生量的测定参照以往文献报道, 应用Griess reagent法通过测定培养上清液中亚硝酸盐含量来估算NO产生量^[16]。移去原培养基, 用新鲜的Williams' E培养液漂洗肝细胞两遍。分别用含有和不含有IL-1 β (IL-1 β , 1nm; 347ku/L)的1mL培养液继续培养术后7d分离的肝细胞12h, 测定亚硝酸盐含量前15min向培养液中加入N⁶-甲基-L-精氨酸(L-NMMA, 330μmol/L)或L-精氨酸(10mmol/L)。分别测定两组术后不同时间分离肝细胞培养上清液中的亚硝酸盐含量。在未加入IL-1 β 时及加入后0h、4h、8h和12h, 分别测定两组术后7d分离的肝细胞培养上清液内的亚硝酸盐含量。亚硝酸钠作为标准对照。Western印迹分析将OJ组术后7d分离肝细胞的培养皿置于冰面, 用冷磷酸盐缓冲液漂洗细胞两遍, 将细胞放入含有50mL/L甘油, 20g/L SDS

和20g/L2-巯基乙醇的125mM Tris-HCl缓冲液中(pH=6.8), 在100℃下煮沸3min, 以16500g离心5min。抽取上清液, 行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 将电泳印记固定于聚乙烯二氟膜上。以免抗鼠iNOS多克隆抗体作为一抗进行免疫结合, 应用ECL系统显色。细胞内ATP含量的测定参照以往报道所描述的方法^[17], 应用高效液相色谱法测定两组肝细胞核苷酸(ATP, ADP和AMP)含量。在4℃下, 迅速移去培养液, 用1mL盐溶液漂洗细胞两遍, 与70g/L高氯酸混合, 以橡胶棒搅匀。用2mM/L磷酸钾试剂调整细胞裂解液pH值至6.0-6.5, 以10000g离心10min。滤过上清液并在-80℃下保存, 以备测定。应用容积为40mL, 以0.1mmol/L磷酸二氢胺盐(PH6.0)为缓冲剂, 流动率为1mL/min的反向洗脱柱(ODS-M4mm×50mm, 柱温50℃, 灌注体积40μL)分别在2.19min, 2.48min和4.05min分离出ATP, ADP和AMP。以254nm的光谱测定核苷酸含量。酮体率的测定应用酶反应试剂盒测定两组培养肝细胞的酮体含量。酮体率(KBR)可通过计算乙酰乙酸盐与β-羟基丁酸盐含量的比值而获得。

统计学处理 所有数据采用mean±SD表示, 统计学处理采用SPSS软件和Microsoft excel软件在微机上进行, 两组间差异比较采用t检验, 以P<0.05为差异显著, P<0.01为差异非常显著。

2 结果

胆总管结扎后1d(实验1d)OJ组大鼠血清胆红素、AST和ALT水平没有发生显著变化, 大于或等于3d出现显著升高并在5d和7d达到最高值。整个实验中, Sham组胆红素和转氨酶水平没有发生明显变化(表1, 2)。在实验1d、3d、5d和7d分离两组大鼠肝细胞并进行培养。加入IL-1 β 后, Sham组有NO产生, 但其水平没有变化。OJ组NO1-5d逐渐增加, 7d时其水平大约是Sham组的3倍以上。大于或等于9d未见NO产生, 考虑可能是肝细胞活性降低的缘故(表3)。培养肝细胞中添加IL-1 β 后, 4h开始NO逐渐产生。于12h, 实验(OJ)组NO产生量明显高于对照(Sham)组(P<0.01)。当向两组培养肝细胞中加入NO产生促进剂L-精氨酸(L-Arg), 两组NO产生量增加, 加入NOS抑制剂L-NMMA后NO水平显著降低(表4)。两组NO水平的差异随着IL-1 β 应用浓度的增加而增大, 最大可达1-10nmol/L, 但于 10^{-9} 浓度时达到峰值, 继续增加IL-1 β 浓度并不能使NO产生得到增加。两组ED₅₀相似, 大约为0.2nmol/L。这表明梗阻性黄疸提高了肝细胞iNOS对IL-1 β 的反应性(表5)。Western电泳分析显示两组间iNOS蛋白(130ku)产生量并没有显著差异(图1), 无论是否向两组中加入L-NMMA或L-精氨酸, iNOS蛋白所对应的电泳条带均未发生变化, 这说明OJ组高水平NO的产生可能是NOS蛋白受到翻译后修饰作用的结果。

NO对正常或受损肝细胞能量代谢的调节起着重要

的作用。我们对两组培养肝细胞 ATP 含量进行了比较(表6)。未加入 IL-1 β 时, 两组培养肝细胞的 ATP 含量相似。加入 IL-1 β 后, OJ 组 ATP 含量下降, Sham 组没有发生显著变化, 二者差异显著。L-NMMA 的加入使 OJ 组下降的 ATP 含量有所上升。L-精氨酸的加入使 Sham 组的 ATP 含量有所下降, 但他并没有使两组的 ATP 含量产生显著差异。KBR 与线粒体 NAD $^+$ /NADH 的比例成正相关(氧化还原状态下), 因此他能够反映肝细胞的线粒体功能。IL-1 β 显著降低了 OJ 组的 KBR, Sham 组的降低程度不明显, 二者差异显著。L-NMMA 的加入使 OJ 组下降的 ATP 含量有所上升, 而 L-精氨酸的加入对 KBR 的影响作用不显著(表7)。

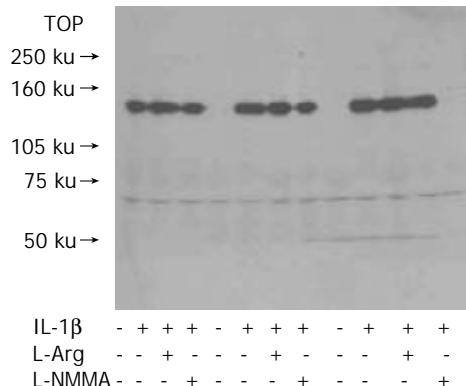


图1 梗阻性黄疸对肝细胞 iNOS 蛋白表达的影响。

表4 NO 的产生与 IL-1 β 作用时间的关系

NO	0 h		4 h		8 h		12 h	
	Sham	OJ	Sham	OJ	Sham	OJ	Sham	OJ
IL-1 β (-)	0	0	2.82±1.7	5.41±2.6	2.91±0.3	6.45±1.8	6.16±1.9	13.61±0.7
IL-1 β (+)	1.29±0.3	6.12±1.8	11.48±2.4	38.45±1.5	68.15±7.2	92.41±4.2 ^b	78.57±10.6	207.99±3.9 ^b
L-NMMA							9.17±2.7	19.95±1.4
L-Arg							120.25±3.5	300.58±5.9 ^b

^bP <0.01 vs Sham.表5 NO 的产生与 IL-1 β 浓度的关系

NO (nmol/L)	10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹³	10 ⁻¹²	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸
OJ	0.5±0.0	0.8±0.0	1.0±0.0	1.2±0.1	30.0±1.9	92.4±7.8 ^b	207.9±3.9 ^b	206.5±9.6 ^b
Sham	0.4±0.0	0.7±0.0	0.9±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0	25.6±0.9	78.6±10.6	68.3±7.6

^bP <0.01 vs Sham.

表6 NO 对肝细胞 ATP 产生的影响

ATP(nmol/L)	0 t/h		4 t/h		8 t/h		12 t/h	
	IL-1 β (-)	IL-1 β (+)						
Sham	27.9±1.1	27.9±1.1	26.8±0.5	26.2±0.2	23.8±0.6	23.6±0.6	23.3±0.7	21.2±0.3
OJ	28.1±0.4	28.1±0.4	26.1±0.4	24.6±0.8	23.2±0.2	22.7±0.3	20.8±0.8	15.9±1.1 ^a

^aP <0.05 vs Sham.

表1 血清胆红素的产生与术后时间的关系

	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
Sham	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1	0.2±0.0
OJ	0.3±0.0	0.9±0.2 ^a	6.9±0.8 ^a	6.7±0.5 ^a

^aP <0.01 vs Sham.

表2 血清转氨酶的变化与术后时间的关系

	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
GPT (OJ)	12.5±0.9	52±1.2 ^a	60±1.4 ^a	61±0.8 ^a
GOT (OJ)	20±1.8	172±2.1 ^b	210±2.5 ^b	227±1.7 ^b
GPT (Sham)	10±0.2	11±0.3	12±0.3	13±0.5
GOT (Sham)	12±0.5	13±1.0	14±0.6	16±0.2

^aP <0.05, ^bP <0.01 vs Sham.

表3 NO 的产生与术后时间的关系

	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
Sham	82.94±4.2	80.06±5.2	89.35±4.8	78.57±3.2
OJ	110.92±9.2	119.80±9.8	123.19±10.2	210.00±15.1 ^b

^bP <0.01 vs Sham.

表7 NO的产生对肝细胞KBR的影响

KBR	4 t/h		8 t/h		12 t/h		12 t/h	
	IL-1β (-)	IL-1β (+)	IL-1β (-)	IL-1β (+)	IL-1β (-)	IL-1β (+)	L-NMMA	L-Arg
Sham	4.3 ± 1.7	2.8 ± 0.1	3.7 ± 0.5	1.8 ± 0.1	2.3 ± 0.7	0.6 ± 0.0	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.0
OJ	4.0 ± 1.2	2.4 ± 0.1	3.4 ± 0.3	0.5 ± 0.0 ^b	1.7 ± 0.2	0.2 ± 0.0 ^a	1.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs Sham.

3 讨论

NO代谢异常会导致许多疾病的发生^[18-20]. 决定NO是保护性还是损伤性的最重要因素在于NO的定位、产生NO的数量以及与NO相同位置中正在产生的超氧化阴离子的相对数量^[21-24]. 梗阻性黄疸后期，机体产生的NO大量积聚，其血管舒张作用和毒性作用增强，血管过度扩张不仅不能改善肝微循环，反而加剧门体静脉分流，减少肝脏对抗原物质的接触和摄取，结果导致肝脏损伤加重乃至肝硬化^[25]. 张嵩 et al^[26]也曾报道肝硬化晚期血清中NO的产生增加，并且与肝硬化腹水病程密切相关. 陈刚 et al^[27]报道在腹腔感染及其并发症的发生发展过程中，可观察到iNOS的表达和大量NO的产生. 本结果显示，与Sham组相比，炎症递质IL-1β显著增加了胆总管结扎后1d OJ组NO的产生. 血清胆红素和转氨酶(ALT, AST)水平并无变化，而3d显著升高，5-7d AST, ALT达最高值，7d NO产生量大约是对照组的3倍以上. IL-1β对两组NO产生的影响效应与其作用的时间及作用剂量有关. Western印迹分析分析表明iNOS的活化导致了OJ组NO产生量的增加，而NOS的含量并没有增加. 王玉梅 et al^[23]也曾报道在FS-112诱导的肝衰竭模型中，肝组织iNOS的变化与血清ALT, TB水平的变化相平行，提示NO的变化与肝损伤的程度相一致. 另据报道，酪氨酸磷酸化作用可能参与iNOS翻译后的修饰过程，L-精氨酸(阳离子氨基酸)能够促进NO的产生^[28]. 以上报道与本研究的结果相似，此外，酶的磷酸化作用似乎能够激活iNOS.

本结果显示，实验7d NOS抑制剂L-NMMA的加入可以抑制肝细胞NO的产生，使降低的肝细胞ATP含量、KBR得以恢复. L-精氨酸的加入使两组NO的产生量增加50-60%. 加入IL-1β后，OJ组培养肝细胞ATP含量和KBR下降显著. KBR反映线粒体NAD⁺/NADH的比例关系(氧化还原状态下)，并且与线粒体呼吸链磷酸化作用密切相关，低水平KBR与线粒体功能障碍有关^[29]. L-NMMA可以抑制OJ组ATP含量和KBR的降低，同时也可以使Sham组的KBR得以恢复，而L-精氨酸的加入对两组ATP含量和KBR都未产生显著影响. 这些结果表明，NO产生量的增加能够使肝细胞线粒体的功能发生障碍，从而抑制ATP的合成. 另据报道，NO在线粒体水平可以抑制Krebs环化酶的活性和呼吸链作用，NOS抑制剂能够抑制细胞因子和内毒素介导的NO产生并且对肝硬化导致的循环超负荷具有治疗作用^[30-31]，

这些观点也支持了本实验的结论.

研究表明，NO的大量产生尤其是血管内皮源性NO的产生与血管、心脏的活动及肾脏功能的改变密切相关^[32-33]. 梗阻性黄疸的预后同有效循环血量改变密切相关^[34]. 然而，目前关于梗阻性黄疸时NO产生与肝功能障碍之间关系的研究很少. 我们发现，梗阻性黄疸时NO的大量产生可以促进肝细胞线粒体功能发生障碍，IL-1β诱导产生的NO对于梗阻性黄疸时肝功能的进一步恶化具有重要的促进作用. L-NMMA可以缓解由于大量NO导致的ATP合成障碍及KBR下降. 因此，对NO产生的调节可能会成为预防及治疗梗阻性黄疸继发肝功能损害的有效方法.

4 参考文献

- 1 Su CH, Peng FK, Lui WY. Factors affecting morbidity and mortality in biliary tract surgery. *World J Surg* 1992;16:536-540
- 2 张军, 刘玉河, 姜希宏, 徐克森. 梗阻性黄疸内毒素血症与细胞免疫功能的关系. 华人消化杂志 1998;6:305-306
- 3 石铁峰, 杨维良. 梗阻性黄疸时血浆内毒素含量及肠道细菌移位的研究. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):500
- 4 Wang QG, He LY, Chen YW, Hu SL. Enzymohistochemical study on burn effect on rat intestinal NOS. *World J Gastroenterol* 2000;6:421-423
- 5 严海密, 李运科. 慢性胃病中一氧化氮的研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:355-356
- 6 张喆颖, 任锡玲. 内皮素一氧化氮与肝硬变. 新消化病学杂志 1996;4:40-41
- 7 王斌, 俞红, 周霞秋. 急性肝坏死大鼠NO水平的动态变化和作用. 华人消化杂志 1998;6:499-501
- 8 杨川杰, 甄承恩, 姚希贤. 肝硬化患者血中NO与性激素水平的关系. 华人消化杂志 1998;6:976-978
- 9 张喆颖, 任锡玲, 姚希贤. 内皮素与一氧化氮在肝硬变血流动力学紊乱中的作用. 华人消化杂志 1998;6:588-590
- 10 黄颖秋, 萧树东, 张德中, 黄剑忠. 一氧化氮与IL-8在肝硬变高动力循环中的作用. 华人消化杂志 1998;6:1079-1081
- 11 汪义军, 李宁, 吴性红, 黎介寿. 肝硬变患者血清一氧化氮和细胞因子检测及其临床意义. 华人消化杂志 1998;6:543-545
- 12 Reynolds JV, Murchan P, Redmond HP, Watson RW, Leonard N, Hill A, Clarke P, Marks P, Keane FB, Tanner WA. Failure of macrophage activation in experimental obstructive jaundice: association with bacterial translocation. *Br J Surg* 1995;82:534-538
- 13 Kanemaki T, Kitade H, Hiramatsu Y, Kamiyama Y, Okumura T. Stimulation of glycogen degradation by prostaglandin E2 in primary cultured rat hepatocytes. *Prostaglandin* 1993;45:459-474
- 14 Horiuti Y, Ogishima M, Yano K, Shibuya Y. Quantification of cell nuclei isolated from hepatocytes by cell lysis with nontoxic detergent in citric acid. *Cell Struct Funct* 1991;16:203-207
- 15 Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biology* 1976;13:29-83
- 16 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in

- biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-138
- 17 Matsui Y, Kitade H, Kamiya T, Kanemaki T, Hiramatsu Y, Okumura T, Kamiyama Y. Adenylate energy charge of rat and human culture hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 1994; 30:609-614
- 18 Peng X, Feng JB, Wang SL. Distribution of nitric oxide synthase in stomach wall in rats. *World J Gastroenterol* 1999;5:92
- 19 Huang YQ, Xiao SD, Zhang DZ, Mo JZ. Nitric oxide synthase distribution in esophageal mucosa and hemodynamic changes in rats with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:213-216
- 20 滕书玲, 武希润, 习玲. 一氧化氮和自由基对大鼠急性肝损伤的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:222-223
- 21 陈玺华, 李正中, 鲍民生, 郑绘霞. 一氧化氮在大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:295-297
- 22 王玉梅, 冯国和, 赵桂珍, 乔光彦. 肿瘤坏死因子- α 及一氧化氮对暴发性肝衰竭肝损伤的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:646-649
- 23 王玉梅, 冯国和. 实验性暴发性肝功衰竭大鼠肝再生与一氧化氮的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:109-110
- 24 王根生, 刘耕陶. 一氧化氮在小鼠肝损伤中的作用. 中华医学杂志 1996;76:203-206
- 25 Bories PN, Campillo B, Azaou L, Scherman E. Long-lasting NO overproduction in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1997;25:1328-1334
- 26 张巍, 任万英, 张世兰, 王海滨. 肝硬化腹水患者血浆降钙素原与一氧化氮的变化. 世界华人消化杂志 2002;10:1353-1354
- 27 陈刚, 龚海燕, 邹声泉, 陈忠. 诱导型一氧化氮合酶在腹腔感染大鼠肝细胞中的表达. 世界华人消化杂志 1999;7:704-705
- 28 刁同进, 姚晓平, 季兵, 杨甲梅, 吴孟超, 张绍庚. L-精氨酸在大鼠原位肝移植冷缺血再灌注损伤中的作用. 华人消化杂志 1998; 6:291-295
- 29 Williamson DH, Lund P, Krebs HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* 1967;103:514-525
- 30 Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:87-94
- 31 Stadler J, Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, Ochoa JB, Simmons RL. Effects of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991; 260:910-916
- 32 陈嵩, 刘冰, 蔡学敏, 顾长海. 重型肝炎患者外周血内皮素及一氧化氮水平变化的意义. 世界华人消化杂志 1999;7:122-124
- 33 李蕴铷, 孙静媛, 王笑梅, 张首省, 杨胜彩. 一氧化氮和内皮素在肝硬变合并肝肾综合征患者中的变化及意义. 世界华人消化杂志 2000;8:484-485
- 34 石景森, 卢云, 艾红, 韩玥, 于跃利, 李国才. 梗阻性黄疸对肝脏血流动力学的影响. 华人消化杂志 1998;6:974-975

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 点击和下载次数

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

Melatonin对大鼠肝再灌注损伤的保护作用

李建一, 张文海, 周勇, 杨军, 秦毅民

李建一, 中国医科大学附属第二医院普外四科 辽宁省沈阳市 110003
张文海, 周勇, 中国医科大学附属第二医院(二部)普外科 辽宁省沈阳市 110022
杨军, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001
秦毅民, 沈阳市第十人民医院普外科 辽宁省沈阳市 110044
李建一, 男, 1976-07-27生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2003年中国医科大学硕士, 医师, 主要从事器官移植中I/R的发病机制及与其相关的影响因素的研究。
辽宁省自然科学基金资助项目, No. 619025
项目负责人: 张文海, 110022, 辽宁省沈阳市铁西区滑翔路39号, 中国医科大学附属第二医院(二部)普外科。surgeonzwh@163.com
电话: 024-25943022 传真: 024-83955072
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

Protective effect of melatonin on liver ischemia reperfusion injury in rats

Jian-Yi Li, Wen-Hai Zhang, Yong Zhou, Jun Yang, Yi-Min Qin

Jian-Yi Li, Fourth Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Wen-Hai Zhang, Yong Zhou, Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, Liaoning Province, China

Jun Yang, Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Yi-Min Qin, Department of General Surgery, The Tenth Municipal People Hospital of Shenyang, Shenyang 110044, Liaoning Province, China
Supported by the National Science Foundation of Liaoning Province, No. 619025

Correspondence to: Dr. Wen-Hai Zhang, Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, China Medical University, 39 Huaxiang Road, Shenyang 110022, Liaoning Province, China. surgeonzwh@163.net
Received: 2003-11-18 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To investigate the effect of melatonin (Mel) on liver ischemia reperfusion (I/R) injury in rats.

METHODS: 150 male Wistar rats (190-210 g, 6-7 weeks age) were divided into three groups at random: Mel exposure group, alcohol solvent control group and saline control group. The left branches of portal vein, hepatic artery, hepatic duct were blocked up for 60 min and then opened to establish liver I/R models in rats. In each group, samples were collected in 0.5, 1, 6, 12, and 24 h after reperfusion respectively. 20 mg/kg of Mel was injected peritoneally in rats 30 min before experimentation in Mel exposure group. The duplicate concentration of alcohol and the same volume of saline were injected in control group as a substitution. Serum alanine aminotransferase (ALT) by auto biochemical analyzer, and superoxide dismutase (SOD) and terminal products of lipid peroxidation (MDA) in liver tissue were measured. Pathological changes in liver and immunohistochemical staining of ICAM-1 were determined with optical microscope.

RESULTS: The level of ALT measured in various time after reperfusion in Mel group was totally significantly lower than

that in alcohol and saline control groups ($P < 0.05$). The level of MDA measured in 6 h, 12 h, and 24 h after reperfusion in Mel group was significantly lower than that in alcohol and saline control groups ($P < 0.05$). The level of SOD measured in 12, 24 h after reperfusion in Mel group was significantly higher than that in alcohol and saline control groups ($P < 0.05$). The expression level of ICAM-1 (%) measured in various time after reperfusion in Mel group was significantly lower than that in alcohol and saline control groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Exogenous Mel inhibits the activities of ALT, increases activities of superoxide dismutase (SOD), and decreases the cumulation of MDA in liver reperfusion tissue and expression of ICAM-1 in liver reperfusion tissue. Therefore, it can improve the hepatic function after reperfusion and plays a definitely protective role in liver I/R.

Li JY, Zhang WH, Zhou Y, Yang J, Qin YM. Protective effect of melatonin on liver ischemia reperfusion injury in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):880-885

摘要

目的: 探讨褪黑素对大鼠肝再灌注损伤的影响作用及其机制。

方法: 150只健康♂ Wistar大鼠(质量190-210 g, 6-7周龄), 随机分为褪黑素处理组(Mel)、酒精溶媒对照组(Alc)和生理盐水对照组(NS)。建立肝缺血再灌注损伤模型, 缺血均为60 min, 之后每组分别按再灌注后30 min、1、6、12、24 h采集标本。M组(20 mg/kg)于缺血前30 min腹腔注射melatonin; A组采取与Mel组相同浓度的酒精液, N组则注射同比例的生理盐水。测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT), 肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)及肝组织过氧化物终产物-丙二醛(MDA), 对肝组织进行HE染色及ICAM-1免疫组化染色。

结果: Mel组在再灌注后各时点的ALT均显著低于Alc及NS对照组($P < 0.05$), 且Alc组与NS组相比无显著性差异。Mel组在再灌注后6、12、24 h时点的MDA显著低于Alc及NS对照组($P < 0.05$), 且各时点内Alc组与NS组相比无显著性差异。Mel组在再灌注后12、24 h时点的SOD显著高于Alc及NS对照组($P < 0.05$), 且各时点内Alc组与NS组相比无显著性差异。Mel组在再灌注后各时点ICAM-1染色的阳性细胞率均显著低于Alc组和NS组($P < 0.05$), 且每时点内的Alc组与NS组相比无显著性差异。

结论: 外源性Mel可以抑制再灌注后血清丙氨酸氨基转移酶(ALT), 增加肝组织超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 减

少肝组织MDA的浓度, 抑制肝组织ICAM-1蛋白的表达, 对缺血再灌注肝损伤有明确的保护作用。

李建一, 张文海, 周勇, 杨军, 秦毅民. Melatonin 对大鼠肝再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2004;12(4):880-885
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/880.asp

0 引言

肝移植目前已成为治疗终末期肝病的有效方法, 但是仍然存在着术后原发无功能肝、排斥反应等亟待解决的并发症。肝的再灌注损伤能够导致移植术后原发无功能肝(primary non-function liver)的发生, 是导致肝移植失败的主要原因^[1]。再灌注损伤的发病机制至今尚未被完全阐明^[2], 与如下因素有关: 一氧化氮与内皮素^[3-4]、细胞因子(包括IL, TNF, IFN等)^[5]、Kupffer细胞的激活^[6-7]、黏附分子的表达与中性粒细胞的浸润^[8]、线粒体能量变化及通透性的改变^[9]、核转录因子的表达、热休克蛋白的表达^[10]、凋亡相关蛋白的表达及凋亡的发生等^[11]。褪黑素(melatonin, Mel)由于其在生殖系统、脂肪代谢和毛发替换、调节睡眠、免疫系统、心血管系统及抗氧化损伤及抗衰老方面的作用日益受到人们的重视而成为研究的热点^[12]。在肝脏方面的研究则主要限于中毒及免疫性肝损伤^[13], 我们以大鼠为研究对象, 建立肝再灌注损伤模型, 按时点采集标本, 对血清丙氨酸氨基转移酶(ALT), 肝组织脂质过氧化物的终产物-丙二醛(MDA)及肝组织超氧化物歧化酶(SOD)进行测定; 对肝组织进行HE染色及ICAM-1免疫组化染色, 光镜下观察肝组织细胞形态学改变, 探讨Mel对大鼠肝再灌注损伤的影响作用及其机制, 为Mel在临床肝脏外科的应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂Wistar大鼠(质量190-210 g, 6-7周龄)150只, 随机分为3组, 即褪黑素处理组(Mel)、酒精溶媒对照组(Alc)、生理盐水对照组(NS)。分别建立肝再灌注损伤模型, 缺血时间均为60 min, 之后每组分别按再灌注后30 min、1、6、12、24 h采集标本。在缺血手术前将以上3组大鼠分别饲养在12 h光照, 12 h黑暗的条件下(07:30-19:30为光明, 其余为黑暗)至少1 wk, 自由摄食饮水。动物模型制备参照Kobayashi法, 采取以动脉夹夹闭肝门静脉左支、肝动脉左支、左肝管60 min之后放开, 建立大鼠肝左叶、中叶再灌注损伤模型^[14]。

表2 缺血再灌注大鼠肝MDA(mean±SD)

分组		30 min	1 h	6 h	12 h	24 h
MDA(nmol/g)	Melatonin	436 ± 139	496 ± 67	556 ± 99 ^a	693 ± 158 ^a	1001 ± 318 ^a
	Alcohol	396 ± 85	548 ± 112	742 ± 102	1 001 ± 186	1815 ± 458
	N.S.	445 ± 93	559 ± 117	724 ± 144	974 ± 115	1844 ± 668
SOD (kNU/g)	Melatonin	125 ± 40	153 ± 55	164 ± 61	244 ± 63 ^c	234 ± 51 ^c
	Alcohol	103 ± 6	121 ± 23	130 ± 31	181 ± 53	151 ± 48
	N.S.	99 ± 24	132 ± 24	135 ± 20	167 ± 33	142 ± 26

^aP <0.05, vs Alcohol, NS组; ^cP <0.05, vs Alcohol, NS组。

褪黑素(Melatonin)1 g购自美国Sigma公司, 经400 mL/L酒精生理盐水溶解后低温保存, 每次用时稀释10倍, 按20 mg/kg计算给药量后, Mel组于缺血前30 min腹腔注射; Alc组采取与Mel组相同浓度的酒精液; NS组则注射同比例的生理盐水。麻醉采取用硫喷妥钠(40 mg/kg)缺血手术前45 min(即腹腔给药前15 min)大鼠股二头肌肌肉注射。40 g/L多聚甲醛0.1 mol/L磷酸缓冲液(PH=7.3); SOD、MDA试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 血生化相关试剂购自德国宝灵曼公司; ICAM-1试剂盒购自英国Serotech公司。OLYMPUS-BX60光学显微镜及照像系统; HITACHI-7600A全自动生化分析仪。

1.2 方法 经膈肌心脏穿刺取血; 取左叶边缘肝组织200-210 g行SOD及MDA测定; 取中叶中央部肝组织2 cm×1 cm×0.3 cm行ICAM-1免疫组化染色。利用自动生化分析仪测定ALT, TBA法测定MDA, NBT还原法测定SOD, SP法对肝细胞进行ICAM-1染色。免疫组化结果在400倍光镜下观察, 胞质内出现棕黄色细颗粒者为阳性细胞(包括肝血窦内皮细胞和肝细胞)。计数每个高倍视野中100个细胞中ICAM-1阳性细胞个数, 每张切片计数5个视野, 求出均值用mean±SD表示, 得出阳性细胞百分率。所有数据均用专业软件SPSS 11.0进行统计, 采用方差分析及SNK检验^[11]。

2 结果

2.1 血清ALT Mel组在再灌注后各时点的ALT均显著低于Alc组及NS组(^aP <0.05), 且Alc组与NS组相比无显著性差异(表1)。

表1 缺血再灌注大鼠血清ALT(mean±SD, μkat/L)

分组	30 min	1 h	6 h	12 h	24 h
Melatonin	3.4 ± 1.2 ^a	3.1 ± 1.0 ^a	3.1 ± 1.0 ^a	3.2 ± 1.1 ^a	4.5 ± 1.8 ^a
Alcohol	6.7 ± 2.3	6.2 ± 2.7	6.0 ± 2.5	5.6 ± 2.1	5.5 ± 2.3
N.S.	6.6 ± 2.2	6.4 ± 2.4	6.0 ± 1.7	5.4 ± 1.9	5.2 ± 1.2

^aP <0.05, vs Alcohol, NS组。

2.2 肝组织MDA和SOD Mel组在再灌注后6、12、24 h时点的MDA显著低于Alc及NS对照组(^aP <0.05), 且各时点内Alc组与NS组相比无显著性差异; Mel组在再灌注后12、24 h时点的SOD显著高于Alc及NS对照组(^cP <0.05), 且各时点内Alc组与NS组相比无显著性差异(表2)。

2.3 肝组织 ICAM-1 染色 Mel 组再灌注后各时点的阳性细胞率均显著低于 Alc 组和 NS 组($^aP < 0.05$)，且每时点内的Alcohol组与N.S.组相比无显著性差异。阳性细胞多为肝血窦内皮细胞，或为靠近中央静脉的肝细胞(图 1-6)。两组对照组的阳性细胞率的变化有明显的规律性，早在 30 min 及 1 h 时与 Mel 组相比就有较高的表达，且在再灌注后 6-24 h 呈平台值(表 3)。

表3 缺血再灌注肝组织 ICAM-1 染色 (mean \pm SD, %)

分组	30 min	1 h	6 h	12 h	24 h
Melatonin	4.1 \pm 2.4 ^a	7.8 \pm 2.4 ^a	12.6 \pm 4.2 ^a	16.3 \pm 3.0 ^a	14.8 \pm 4.0 ^a
Alcohol	15.9 \pm 3.2	22.7 \pm 3.7	40.1 \pm 4.4	39.2 \pm 6.0	39.0 \pm 5.2
N.S.	17.9 \pm 2.8	23.0 \pm 4.5	42.8 \pm 4.8	42.0 \pm 5.9	40.4 \pm 5.5

^aP < 0.05, vs Alcohol, NS 组。

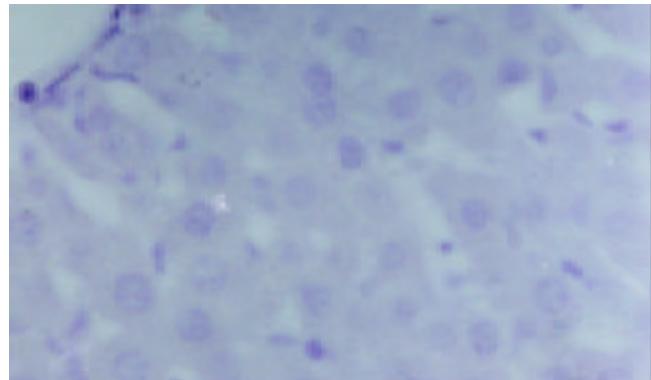


图1 Melatonin 组再灌注 1 h \times 400。

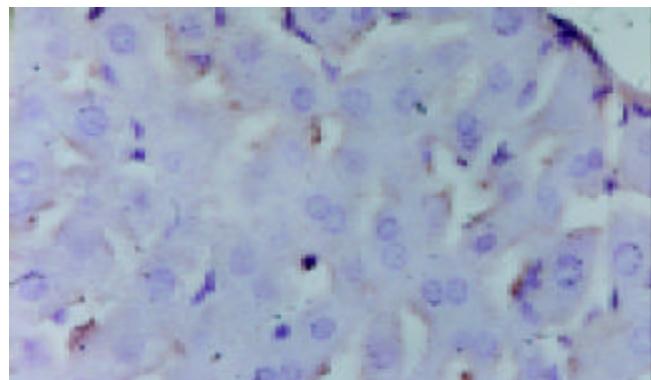


图2 Alcohol 组再灌注 1 h \times 400。

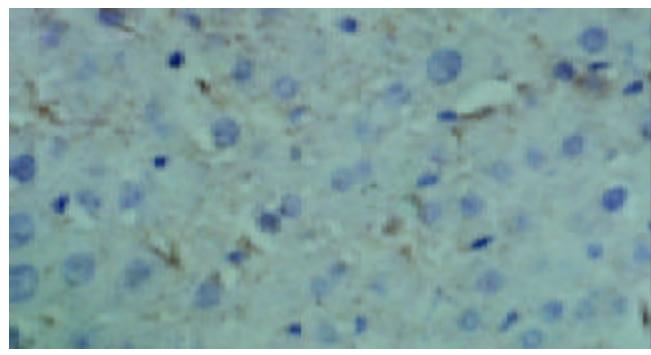


图3 NS 组再灌注 1 h \times 400。

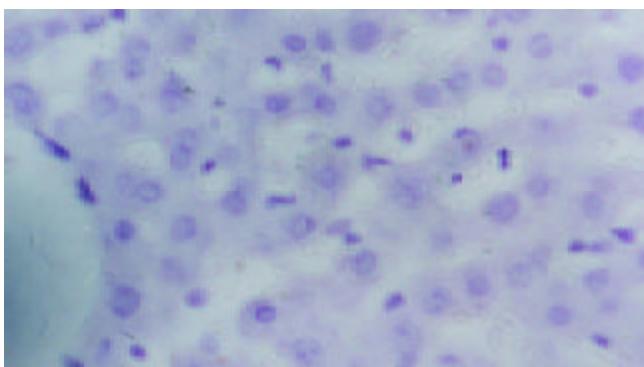


图4 Melatonin 组 再灌注 6 h \times 400。

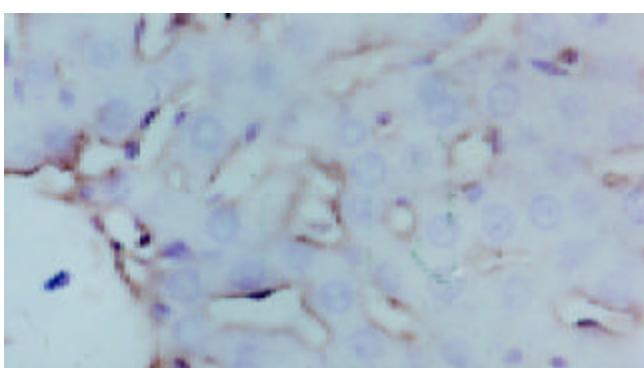


图5 Alcohol 组再灌注 6 h \times 400。

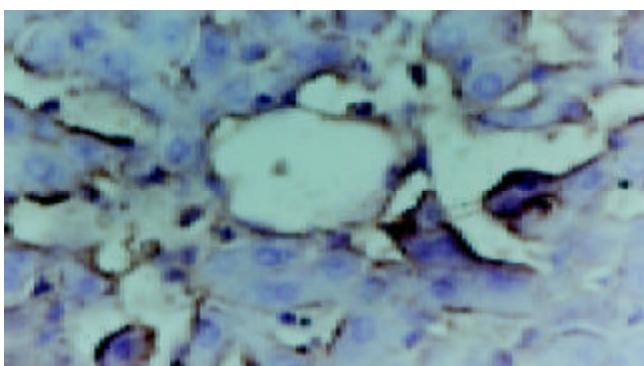


图6 NS 组再灌注 6 h \times 400。

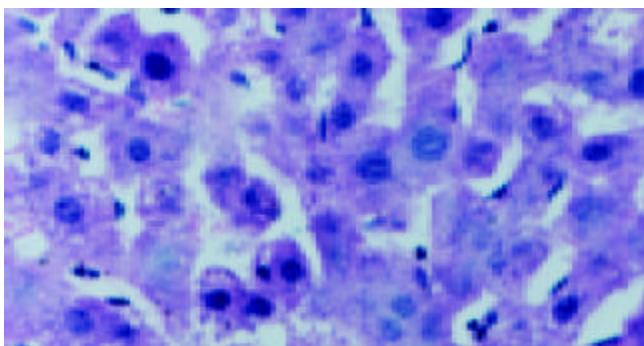


图7 Melatonin 组再灌注 12 h \times 400。

2.4 肝组织 HE 染色 在再灌注 12 h (图 7-9)及其之后的 24 h (图 10-12)时点的 Mel 处理组的肝细胞变性、坏死的程度与范围，肝索结构的破坏程度与范围均明显的轻于 Alc 组和 NS 组。并且对各组别内的各时点作了比

较, 发现随着再灌注的时间的延长, 两个对照组肝细胞变性坏死的程度及肝索破坏的范围也逐渐扩大, 到再灌注 24 h 时达到高峰; 而这一变化在 Mel 组则表现不明显, 从再灌注 12 及 24 h 的病理切片来看, 区别不明显。提示外源性 Mel 可以减轻 I/R 后肝细胞的变性和坏死的程度及范围。

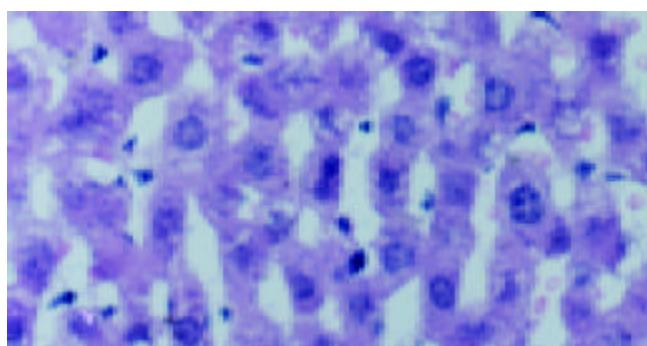


图 8 Alcohol 组再灌注 12 h $\times 400$.

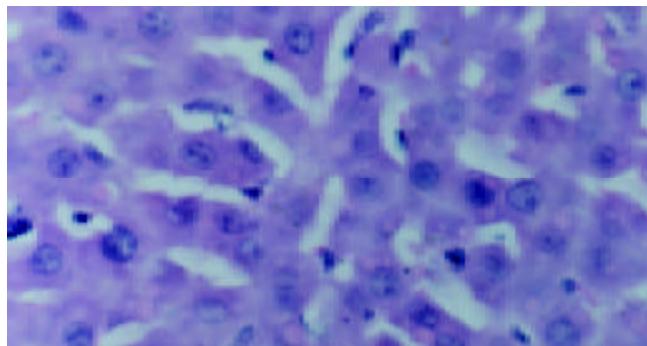


图 9 NS 组再灌注 12 h $\times 400$.

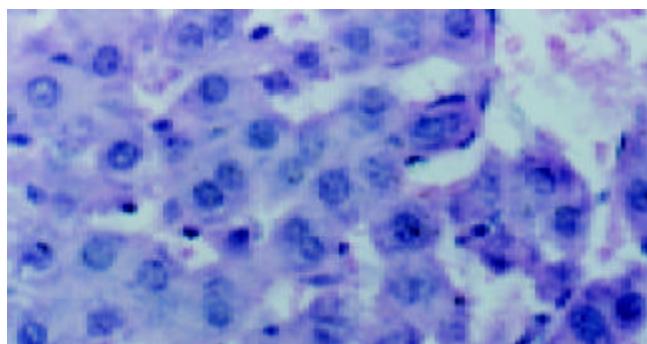


图 10 Melatonin 组再灌注 24 h $\times 400$.

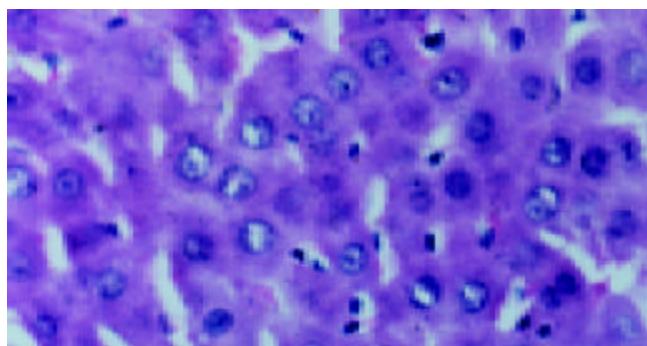


图 11 Alcohol 组再灌注 24 h $\times 400$.

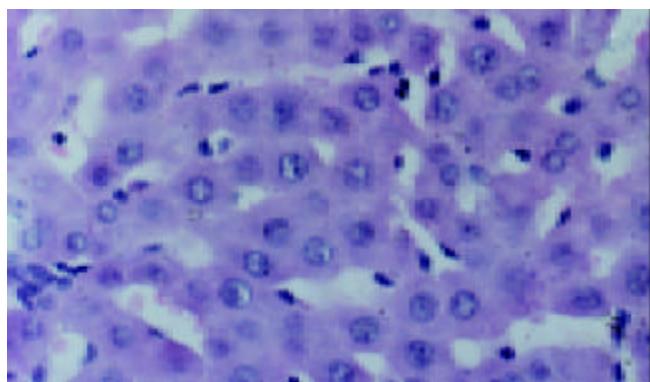


图 12 NS 组再灌注 24 h $\times 400$.

3 讨论

一般认为, I/R 可以造成 ROS 的大量释放^[15-16]; ROS 可以攻击生物膜, 造成后者通透性的改变^[17]; 生物膜通透性的改变诱发 Ca^{2+} 在细胞内及线粒体等浓度升高(Overload)^[18]; 细胞内 Ca^{2+} Overload 又加速 ROS 的产生, 同时可激活多种磷脂酶, 促进膜磷脂分解, 造成膜磷脂降解产物花生四烯酸、溶血磷脂等增多; 花生四烯酸的代谢产物(如白三烯)能吸引大量中性粒细胞黏附于血管内皮并进入组织^[19]; 中性粒细胞与血管内皮细胞黏附后进一步激活, 自身合成释放如 TNF、IL、黏附分子^[20-21]等多种具有趋化作用的炎性递质^[22-23], 使白细胞浸润进一步加重, 同时对血液流变学、微血管口径及血管通透性的影响最终造成了再灌注后的无复流现象^[24-25]。另一方面, 早在 1991 年 Ianas et al 首次报道了 Mel 的具有抗氧化作用^[26], 之后 2a Tan 的研究说明与 GSH 及甘露醇相比, Mel 能更有效地清除 $\cdot\text{OH}$ ^[27]。1996 年, Marshall 的研究发现 Mel 清除 ROO[·] 的能力是 V_E 的 2 倍^[28], 因此 Mel 是目前为止发现的最有效和最理想的自由基清除剂之一。

血清中 ALT, 是最敏感的肝功检测指标之一^[29]。表 1 显示各组的 ALT 在再灌注后 30 min 已普遍升高, 而且持续到再灌注后 24 h。从每个时点内组别情况来看, Mel 组的 ALT 值均显著低于其他两组对照组(${}^a\text{P} < 0.05$), 肝功能的损害明显减轻。实验分别测定肝组织 MDA, SOD 作为评价 ROS 损伤及内源性抗 ROS 的指标^[30-31]。表 2 第一组数据显示的是再灌注后肝组织 MDA 各组各时点的变化情况, 总体来看, 随着时间的延长, 各组 MDA 在肝组织内逐渐堆积, 呈逐渐增高的趋势, 从再灌注 6 h 开始, 与对照组相比 Mel 组 MDA 增加的速度逐渐放慢, 在 6、12、24 h 时点 MDA 值均显著性的低于对照组(${}^a\text{P} < 0.05$), 说明外源性 Mel 可以有效的降低再灌注后肝组织中 MDA 的浓度。2001 年 Sinha et al 通过闭塞大鼠的大脑中动脉来模拟脑 I/R 过程中, 发现 Mel 组的 MDA 的水平显著低于溶媒对照组($P < 0.05$)^[32]; 之后 1 a Inci et al 在以 Mel 为处理因素用于肺 I/R 的模型研究中同样发现, Mel 组肺组织内的 MDA、MPO 的活性以及支气管肺泡的亚硝酸水平都明显的低于对照组($P < 0.05$)^[33]。表

2的第二组数据显示由于再灌注损伤释放了大量ROS, 反应性的造成SOD随着再灌注时间的延长而保护性的增高, 这种增高在再灌注后12 h达到了高峰。与对照组相比, Mel组这种保护性的增高更为明显, 且延续的时间更长, 在12 h及24 h时这种明显的增高差异具有显著性($P < 0.05$)。说明外源性Mel可以提高再灌注后肝组织SOD的活性。与此同时以Mel为处理因素, 以MDA、SOD、GSH·px、GSSG、LPO等为测定的相关指标的再灌注损伤研究分别在胃^[34]、心脏^[35]、小肠^[36-37]等脏器中得到了相类似的结果。近年来有关Mel结构研究提示吲哚环5位上的甲氨基和侧链上的N-乙酰基是Mel作为自由基清除剂的必需基团^[38]。Mel主要通过提供电子来清除自由基, 失去电子后Mel本身变成了毒性很低的吲哚阳离子自由基, 而他又能清除超氧阴离子自由基(O_2^-), 最后变成AMFK并经肾脏排出^[39]。另外, Mel还可以通过增强诸如SOD、GSH·px等抗自由基酶系的活性来发挥其清除自由基的作用^[40]。更有报道证明, 外源性应用Mel可以在通过提升SOD mRNA的表达, 来发挥其对再灌注损伤的保护作用^[41]。最近有关Mel外周受体的研究显示, Mel可与除中枢外的多系统多脏器中的受体相结合, 来发挥多种生理作用^[42]。通过统计肝细胞ICAM-1染色的阳性细胞率, 其结果显示Mel组再灌注后各时点的阳性细胞率均显著低于对照组($P < 0.05$), 且每时点内的Alc组与NS组相比无显著性差异。验证了I/R诱发肝细胞ICAM-1的强表达, 而外源性Mel可以有效的抑制ICAM-1的表达。2000年Cuzzocrea et al通过钳夹肠系膜上动脉及腹腔干动脉建立大鼠的内脏器官缺血再灌注模型, 不仅通过测定MDA、LPO等指标证实了Mel可以通过清除ROS及抗氧化的途径来发挥对再灌注损伤的保护作用, 并且通过对回肠组织的免疫组织化学染色发现, 与对照组相比, Mel组的ICAM-1及P-selectin的蛋白表达明显减少($P < 0.05$)^[43]; 1 a以后他们在用Mel治疗二硝基苯磺酸所引起的结肠炎时再次证实了Mel可以通过抑制ICAM-1的表达, 有效地抑制中性粒细胞的浸润而发挥治疗作用^[44]。

4 参考文献

- 1 Jassem W, Susan V. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002;73:493-499
- 2 Mathie, Robert T. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *A J Surg* 2001;181:160-166
- 3 陈玺华, 李正中, 鲍民生, 郑绘霞. 一氧化氮在大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:295-297
- 4 Gong JP, Tu B. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10:73-76
- 5 Takiguchi M, Totsuka E. Attenuation of microcirculatory disturbance after liver ischemia by newly synthesized inflammatory cytokine suppressor, FR167653. *Hepatogastroenterology* 2003;50:789-793
- 6 Schauer RJ, Gerbes AL. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 2003;37:286-295
- 7 Zhu XH, Qiu YD. Effect of matrine on Kupffer cell activation in cold ischemia reperfusion injury of rat liver. *World J Gastroenterol* 2002;8:1112-1116
- 8 Benkoel L, Dodero F. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) during ischemia-reperfusion in human liver tissue allograft: image analysis by confocal laser scanning microscopy. *Dig Dis Sci* 2003;48:2167-2172
- 9 Zhang WH, Wang JS, Zhou Y, Li JY, Shen H, Shi MK, Ding YT. Gadolinium chloride and salvia miltiorrhiza compound ameliorate reperfusion injury in hepatocellular mitochondria. *World J Gastroenterol* 2003;9:2040-2044
- 10 Boeri D, Dondero F, Storace D, Maiello M, Pasqualini M, Pellicci R. Heat-shock protein 70 favours human liver recovery from ischaemia-reperfusion. *Eur J Clin Invest* 2003;33: 500-504
- 11 Li SQ, Liang LJ, Huang JF, Li Z. Hepatocyte apoptosis induced by hepatic ischemia-reperfusion injury in cirrhotic rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:102-105
- 12 Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003;8:d1093-1098
- 13 Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res* 2003;34:282-287
- 14 Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transpl* 2001;7:292-299
- 15 Bagchi D, Bagchi M. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000;148:187-197
- 16 Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002;33:774-797
- 17 Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 2002;9: 161-175
- 18 Sakon M, Ariyoshi H, Umehita K, Monden M. Ischemia-reperfusion injury of the liver with special reference to calcium-dependent mechanisms. *Surg Today* 2002;32:1-12
- 19 Belous A, Knox C, Nicoud IB, Pierce J, Anderson C, Pinson CW, Chari RS. Reversed activity of mitochondrial adenine nucleotide translocator in ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2003;75:1717-1723
- 20 Fujii M, Noshima S, Nakayashiki C. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) during hypoxia-reoxygenation by sinusoidal endothelial cells (SECs) in an obstructive jaundice model. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:367-371
- 21 Wu P, Li X, Zhou T, Zhang MJ, Chen JL, Wang WM, Chen N, Dong DC. Role of Pselectin and anti P selectin monoclonal antibody in apoptosis during hepatic/renal ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2000;6:244-247
- 22 Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2002;33:2115-2122
- 23 Young CS, Palma JM, Mosher BD. Hepatic ischemia/reperfusion injury in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 double-mutant mice. *Am Surg* 2001;67:737-744
- 24 Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32:169-173
- 25 Biasi F, Poli G. Effect of perioperative infusion of antioxidants on neutrophil activation during liver transplantation in humans. *Transplant Proceed* 2002;34:755-758
- 26 Ianas O, Manda D, Campean D, Ionescu M, Soare G. Effects of melatonin and its relation to the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis. *Adv Exp Med Biol* 1999;460:321-328
- 27 Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003;50:1129-1146

- 28 Gitto E, Romeo C, Reiter RJ. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *J Pediatr Surg* 2004;39:184-189
- 29 Lhuillier F, Parmantier P, Goudable J. Hepatic ischemia is associated with an increase in liver parenchyma nitric oxide that is in part enzyme-independent. *Anesthesiology* 2003;98:373-378
- 30 Klein MB, Chan PH, Chang J. Protective effects of superoxide dismutase against ischemia-reperfusion injury: development and application of a transgenic animal model. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:251-255
- 31 Michael D. Wheeler, Michelle Katuna, Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase gene against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Human Gene Therapy* 2001;12:2167-2177
- 32 Sinha K, Degaonkar MN. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur J Pharmacol* 2001;428:185-192
- 33 Inci I, Inci D, Dutly A. Melatonin attenuates posttransplant lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2002;73:220-225
- 34 Cabeza J, Motilva V. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sciences* 2001;68:1405-1415
- 35 Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y, Matsui H, Murase K, Mokuno S. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life Sci* 2000;67:101-112
- 36 Ustundag B, Kazeez A, Demirbag M, Canatan H, Halifeoglu I, Ozercan IH. Protective effect of melatonin on antioxidative system in experimental ischemia-reperfusion of rat small intestine. *Cell Physiol Biochem* 2000;10:229-236
- 37 Kazeez A, Demirbag M, Ustundag B, Ozercan IH, Saglam M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 2000;35:1444-1448
- 38 Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestone S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003;72:2183-2198
- 39 Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001;426:1-10
- 40 Simonini G, Pignone A, Generini S, Falcini F. Emerging potentials for an antioxidant therapy as a new approach to the treatment of systemic sclerosis. *Toxicology* 2000;155:1-15
- 41 Sainz RM, Mayo JC, Reiter RJ, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J* 1999;13:1547-1556
- 42 Mailliet F, Audinot V, Malpaux B. Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT(1) and MT(2) receptors. *Biochem Pharmacol* 2004;67:667-677
- 43 Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Micali A, De Sarro A, Caputi AP. Beneficial effects of melatonin in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *J Pineal Res* 2000;28:52-63
- 44 Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Micali A, De Sarro A, Caputi AP. Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pineal Res* 2001;30:1-12

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

• 消息 •

肠源性内毒素血症与肝病 出版

多种肝炎与肝病大多伴有肠源性内毒素血症(IETM). 胆病患者的临床表现与 IETM 密切相关, 常与患者血浆细胞因子, 炎性介质, 自由基等相伴而生. 韩德五教授领导的山西医科大学肝病研究所 20 年来围绕 IETM 与肝病进行了深入而系统的研究, 在大量动物实验与临床研究基础上提出了新的观点和理论(1)一般认为各种肝炎是通过各自的病因及其发病机制所造成的肝损伤(称之为“原发性肝损伤”). 我们发现原发性肝损伤往往伴有 IETM, 后者通过过度或持续激活枯否细胞所释放的细胞因子, 炎性介质, 自由基等又损伤了肝组织, 这种肝损伤称之为“继发性肝损伤”. 肝炎, 肝病患者的临床表现是这两种肝损伤的叠和; (2)由于 IETM 过度或持续激活枯否细胞可促使肝炎重症化(如重型肝炎)和慢性化(急性肝炎→慢性肝炎→肝纤维化→肝硬化→肝癌), 故对肝炎的发展与转归有着重要影响; (3)严重的急, 慢性肝病可因内毒素而诱发肝功能衰竭. 因此, IETM 是多种肝病的危险因素. 此理论为防治肝炎, 肝病提供了新的思路. 显然, 降低肠源性内毒素水平和阻断内毒素生物学效应的发挥就成了防治肝炎的关键因素之一.

本书共 10 章 51 节, 约 120 万字, 并附有百余张图片. 内容主要取材于 40 名研究生(包括博士生与硕士生)的学位论文, 以证实此学说的客观存在. 为了便与国际交流在论文之前附有英文摘要. 本书对多种肝炎, 肝病的发病机制进行了再认识, 故对消化内, 外科, 感染科医师, 病理生理学教师及研究生均有重要参考价值.

本书已由中国科学技术出版社出版, 各地新华书店发行. 购买者也可与山西医科大学肝病研究所直接联系, 电话: 0351 - 4135067.

银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化的作用

胡伟, 时昭红, 马庭芳, 于皆平

胡伟, 马庭芳, 于皆平, 武汉大学人民医院消化科 湖北省武汉市 430060
时昭红, 武汉市一医院消化科 湖北省武汉市 430032
胡伟, 女, 1969-01-21 生, 湖北省武汉市人, 2001 级武汉大学医学院硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事肝病研究。
武汉市青年科技晨光计划资助项目, No. 20025001023
项目负责人: 于皆平, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化科。
电话: 027-62733769
收稿日期: 2003-11-05 接受日期: 2003-12-08

Effects of Ginkgo biloba extract on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats

Wei Hu, Zhao-Hong Shi, Ting-Fang Ma, Jie-Ping Yu

Wei Hu, Ting-Fang Ma, Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Zhao-Hong Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan First Municipal Hospital, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Supported by the Youth Chenguang project of Science and Technology of Wuhan City, No. 20025001023
Correspondence to: Wei Hu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China.
Received: 2003-11-05 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To study the effects of Ginkgo biloba extract (EGb) on hepato-fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in rat model.

METHODS: Rat liver fibrosis model was induced by CCl_4 administration. Wistar rats were randomly divided into 5 groups: normal control group, a model group, a interventional group, a therapeutic group, and a EGb group. The EGb interventional group, apart from administration of CCl_4 , was treated concurrently with EGb 0.3 g/kg, ig once a day; the EGb therapeutic group was treated with EGb 0.3 g/kg, ig once a day after cirrhosis was induced successfully, and the EGb group was treated only with EGb 0.3 g/kg, ig once a day. At the end of week 8 and 16, all the rats were sacrificed. The pathological changes of liver were observed by H-E and Von-Gieson staining. The expression of mRNA and proteins of collagen I/ TGF β 1 in liver were determined by RT-PCR and immunohistochemistry.

RESULTS: The degree of liver fibrosis and level of mRNA and proteins of collagen I/ TGF β 1 in liver were significantly reduced in the EGb interventional and therapeutic groups compared with those in the model group (type I collagen mRNA: 0.0 778 ± 0.054 vs 0.2 361 ± 0.113, 0.1 075 ± 0.007 vs 0.2 361 ± 0.113, P <0.01; type I collagen proteins: 0.2 563 ± 0.009 vs 0.2 885 ± 0.025, 0.2 541 ± 0.076 vs 0.2 885 ± 0.025, P <0.01; TGF β 1 mRNA: 0.523 ± 0.015 vs 0.956 ± 0.049, 0.524 ± 0.009 vs 0.956 ± 0.049, P <0.01; TGF β 1 proteins: 0.2 785 ± 0.012 vs 0.3 015 ± 0.012, P <0.01). 其中转化生长因子 β 1

The EGb group had the same results as the normal control group.

CONCLUSION: EGb has prophylactic and therapeutic effects on CCl_4 -induced rat liver fibrosis, probably through its anti-lipoperoxidation, suppressing the activation of hepatic stellate cells and transition and reducing the synthesis of hepatic type I collagen and TGF β 1.

Hu W, Shi ZH, Ma TF, Yu JP. Effects of Ginkgo biloba extract on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):886-891

摘要

目的: 探讨银杏叶提取物对实验性大鼠肝纤维化的预防及治疗作用机制。

方法: 采用四氯化碳腹腔注射诱导的大鼠肝纤维化模型, 60只Wistar大鼠分为5组: 模型组、银杏叶干预组、银杏叶治疗组、银杏叶组, 另设正常对照组, 应用HE染色观察大鼠肝组织的改变及Von-Gieson胶原纤维特殊染色观察肝纤维化程度, 并采用免疫组织化学染色法及RT-PCR法检测肝组织I型胶原、TGF- β 1蛋白和mRNA的表达。

结果: 银杏叶干预及治疗组与模型组相比肝组织结构明显改善、纤维化增生程度减轻; 肝组织内I型胶原、TGF- β 1的含量(I型胶原: 0.2 563 ± 0.0 009 vs 0.2 885 ± 0.0 025, 0.2 541 ± 0.0 076 vs 0.2 885 ± 0.0 025, P <0.01; TGF- β 1: 0.2 785 ± 0.0 012 vs 0.3 015 ± 0.0 012, 0.2 791 ± 0.0016 vs 0.3 015 ± 0.0 012, P <0.01)以及mRNA的表达均明显低于模型组(I型胶原: 0.0 778 ± 0.054 vs 0.2 361 ± 0.113, 0.1 075 ± 0.007 vs 0.2 361 ± 0.113, P <0.01; 0.523 ± 0.015 vs 0.956 ± 0.049, 0.524 ± 0.009 vs 0.956 ± 0.049, P <0.01); 银杏叶组与正常对照组之间无差异。

结论: 银杏叶提取物可抑制肝星状细胞激活和转化, 下调I型胶原、TGF- β 1蛋白质及其mRNA的表达, 从而抑制或逆转纤维化形成。

胡伟, 时昭红, 马庭芳, 于皆平. 银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(4):886-891

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/886.asp>

0 引言

肝纤维化是一切慢性肝病发展至肝硬化的必经之路, 是由于肝脏细胞外基质(ECM)合成和降解失衡, 最终引起ECM过度沉积所致^[1-8]. 其中转化生长因子 β 1

(TGF- β 1)被认为是肝纤维化形成过程中重要的始动刺激因子之一^[9-12]. 虽然普遍认为肝纤维化在一定条件下是可以逆转的, 但至今仍缺乏有效的抗纤维化药物. 银杏叶提取物(EGb)主要药理成分为黄酮甙和银杏内酯, 具有广泛的生物学作用^[13-18], 主要包括清除氧自由基、抑制脂质过氧化、改善微循环等. 银杏叶提取物具有防止肝损伤, 治疗肝纤维化的作用^[19]. 我们选用CCl₄诱导的大鼠肝纤维化模型, 旨在进一步探讨EGb抗肝纤维化作用的机制, 为EGb的临床应用提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级, ♂Wistar大鼠60只, 体质量160±20 g, 购于湖北省实验动物中心; EGb由武汉市一医院中药制剂室提供, 经湖北午时药业股份有限公司检验, 编号02-391; CCl₄, 郑州化学试剂二厂产品; I型胶原、TGF- β 1多克隆抗体及免抗鼠SP试剂盒为北京中山生物制品公司产品; Trizol购自Gibco公司; 逆转录酶MMLV, Oligo(dT)18, Tac酶, MixdNTP均为Promega公司产品; RNA酶抑制剂为大连宝生物工程有限公司产品; TGF β 1和I型胶原及磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因引物序列为TGF β 1:上游5'-TGAGTGGCTGTCTTTGAGCG-3',下游5'-ACTTCCAAACCCAGGTCCCTTC-3'; I型胶原:上游5'-TACTACCAGGCCGATGATGC-3',下游5'-TCCTTGGGGTTGGGCTGATGTA-3'; GAPDH:上游5'-TCCCTCAACATTGTCAGCAA-3',下游5'-AGCTCCACAACGGATACTT-3',均由上海生物工程制品公司合成; HPIAAS-2000彩色图文分析系统; Biotra PCR扩增仪, Eppendorf低温离心机, 紫外分光光度仪等; Eppendorf低温离心机, Biometra UNOII PCR扩增仪, PE-Lambda 25UV紫外分光光度计, HW-8B型超级微量恒温器, Bio-Rad电泳仪, Bio-Rad GELDOC-2000紫外凝胶成像系统.

1.2 方法 将60只大鼠随机分为5组:正常对照组10只, 模型组18只, 银杏叶干预组12只, 银杏叶治疗组14只, 银杏叶组6只, 各组间暴露因素无差异. 模型组、干预组及治疗组均给予CCl₄+石蜡油1:1(V:V)混合, 腹腔注射8 wk, 1 mL/kg, 2次/wk. 干预组同时给予银杏叶制剂悬浊液0.3 g/kg灌胃, 1次/d. 模型组和治疗组在8 wk中共有6只死亡. 此后治疗组给予银杏叶制剂悬浊液0.3 g/kg灌胃, 1次/d, 共8 wk. 正常对照组给予生理盐水1 mL/kg, 腹腔注射8 wk. 银杏叶组仅给予银杏叶制剂悬浊液0.3 g/kg, 1次/d. 实验总周数为16 wk. 所有的动物都给予自来水及标准大鼠饲料喂养, 每12 h灯照及黑暗交替. 最后1次用药后3 d处死大鼠. 肝脏标本取右叶相同的部分以40 g/L甲醛固定, 3 d内石蜡包埋备组织病理学检测; 余下肝脏于液氮中速冻、-80 °C冰箱内保存, 备肝组织匀浆测组织生化、抽提组织RNA.

1.2.1 病理学研究 肝组织分别用HE染色和Von-Gieson

胶原纤维染色法检测肝纤维化组织病理学, 按照改良KnodelI评分标准^[20]进行纤维化程度评估: 0级, 无纤维化; 1级, 汇管区扩大, 轻度纤维化; 2级, 汇管区周围纤维化, 纤维隔形成, 小叶结构保留; 3级, 纤维隔伴小叶结构紊乱, 无肝硬化; 4级, 早期肝硬变或肯定的肝硬化. 肝组织I型胶原、TGF- β 1蛋白的免疫组化采用PAP法DAB显色. I型胶原、TGF- β 1表达程度应用HPIAAS-2000彩色医学图像分析仪, 对各组切片随机选取10个视野测量其光密度值, 取其平均值作为该切片的平均光密度值(MOD).

1.2.2 I型胶原、TGF- β 1mRNA表达 取50-100 mg左右冻存标本放入0.5 mL玻璃匀浆器中加Trizol 1 mL室温下匀浆, 抽提组织RNA, 加氯仿0.2 mL, 4 °C, 12 000 g下低温离心15 min, 取上清加等体积异戊醇4 °C, 12 000 g下低温离心10 min, 750 mL/L乙醇1 mL洗涤, 加dd H₂O 30-50 μL, 55-60 °C温浴10 min. 紫外分光光度仪检测吸光度A值. -80 °C冰箱内保存. 取RNA 2 μg加上dd H₂O及Oligo(dT)1 μL置于70 °C水浴箱内5 min, 冰上5 min, 加MMLV buffer, dNTP, RNA酶及其抑制剂、ddH₂O共25 μL, 于42 °C温浴90 min. 反应总体积为25 μL, 含Taq酶Buffer 2.5 μL, d NTP Mix (2.5 mol/L) 2 μL, Taq酶1 U, Primer (mix) 1 μL, c DNA 1 μL, 加双蒸水达25 μL体系混匀后离心15 s. TGF β 1的扩增条件: 95 °C 3 min预变性, 开始循环: 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 45 s. 共循环35次, 最后彻底延伸于72 °C 7 min, 4 °C保存, 扩增产物长度为350 bp. I型胶原的扩增条件: 95 °C 3 min预变性, 开始循环: 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s. 共循环35次, 最后彻底延伸于72 °C 7 min, 4 °C保存, 扩增产物长度为317 bp. GAPDH的扩增条件: 95 °C 3 min预变性, 开始循环: 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 45 s. 共循环35次, 最后彻底延伸于72 °C 7 min, 4 °C保存, 扩增产物长度为309 bp. PCR产物经2%琼脂糖凝胶, 25 mV, 50 mA下电泳. 电泳结果经Fluros-Multimager扫描仪扫描成像. 用Multi-Analyst software package进行PCR产物半定量, TGF β 1和I型胶原mRNA相对含量用TGF β 1和I型胶原的积分光密度值与GAPDH的积分光密度值的比值表示.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示. 应用SPSS 1.0统计软件包处理分析. 纤维化程度以等级资料表示, 并采用Ridit检验进行分析. P<0.05有统计学意义.

2 结果

2.1 肝组织病理学 模型组HE染色可见多数正常肝小叶结构破坏或消失, 由汇管区伸出较粗大的胶原纤维条索, 分割、包围肝小叶形成假小叶, 肝细胞索排列紊乱, 肝细胞浊肿明显, 并见广泛的脂肪变性, 部分肝细胞坏死. 纤维隔内有大量单核、淋巴、嗜酸性细胞及成纤维细胞浸润; VG胶原染色可见红色胶原纤维大量增

生, 汇管区-中央静脉区纤维间隔宽大, 增生的肝细胞被胶原纤维包绕、分割成大小不等的假小叶, 部分肝脏已形成典型肝硬化的改变。银杏叶干预组肝细胞有不同程度变性、坏死, 汇管区及小叶间有少量纤维组织增生, 与模型组比较差异显著, 肝纤维化程度计分显示与模型组有明显差异($P < 0.05$); 治疗组肝细胞也有不同程度变性、坏死, 汇管区及小叶间有少量纤维组织增生, 部分向小叶内伸展, 纤维间隔变细, 肝纤维化程度计分也显示与模型组有明显差异($P < 0.05$, 表1, 图1)。

表1 各组大鼠肝纤维化程度分级比较

组别	n	肝纤维化分级				
		0级	I级	II级	III级	IV级
正常对照组 ^a	12	12	0	0	0	0
模型组	14 (4/18)	0	0	1	5	8
干预组 ^a	12	0	4	6	2	0
治疗组 ^a	12 (2/14)	0	4	5	3	0
银杏叶组 ^a	6	0	0	0	0	0

^a $P < 0.05$ vs 模型组。

2.2 TGF- β 1和I型胶原蛋白表达 正常对照组和银杏叶组肝组织几乎不表达TGF- β 1, 模型组TGF- β 1阳性细胞主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带及肝纤维间隔中, 主要见于Kuffer细胞、类间质细胞质及其周围; EGb干预及治疗组阳性染色程度较模型组明显减轻。正常对照组和银杏叶组肝组织I型胶原蛋白主要存在于中央静脉、门脉区三联管周及管间纤维组织, 模型组I型胶原阳性细胞染色明显增多, 除汇管区、中央静脉周围增多外, 在纤维间隔内弥漫分布; 而EGb干预及

治疗组I型胶原蛋白主要位于中央静脉和门静脉周围纤维带(表2, 图2)。

表2 各组大鼠肝组织I型胶原及TGF- β 1蛋白表达的比较(mean±SD)

分组	n	I型胶原	TGF- β 1
正常对照组	10	0.2625 ± 0.029 ^b	0.2723 ± 0.0089 ^b
模型组	14 (4/18)	0.2885 ± 0.0025	0.3015 ± 0.0012
干预组	12	0.2563 ± 0.0009 ^b	0.2785 ± 0.0012 ^b
治疗组	12 (2/14)	0.2541 ± 0.0076 ^b	0.2791 ± 0.0016 ^b
银杏叶组	6	0.2632 ± 0.026 ^b	0.2733 ± 0.0078 ^b

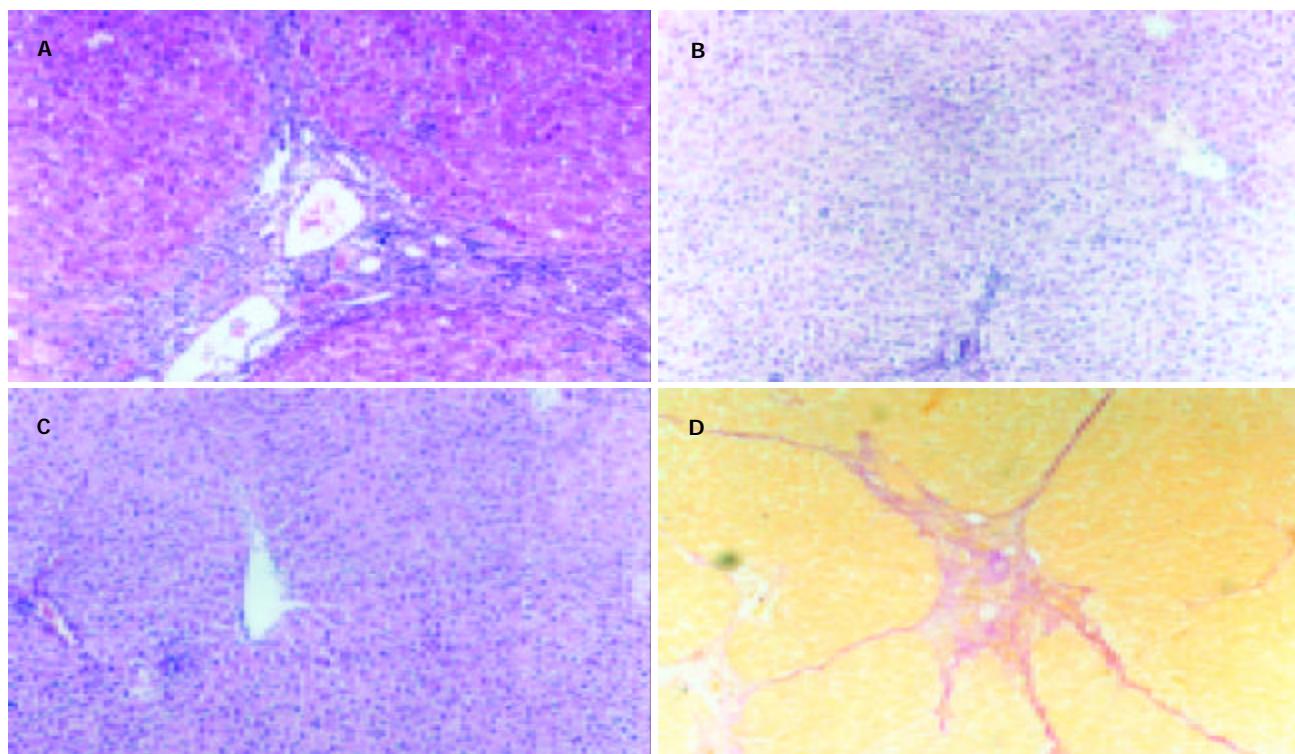
^b $P < 0.01$ vs 模型组。

2.3 I型胶原和TGF- β 1mRNA表达 模型组肝组织I型前胶原、TGF- β 1 mRNA相对含量显著高于正常对照组、银杏叶组、EGb干预及治疗组($P < 0.01$, 表3, 图3); 正常对照组、银杏叶组、EGb干预及治疗组的I型前胶原、TGF- β 1 mRNA相对含量无明显差异($P > 0.05$)。

表3 各组大鼠TGF β 1和I型胶原mRNA的表达比较(mean±SD)

分组	n	I型胶原/A	TGF- β 1/A
正常对照组	10	0.047 ± 0.05 ^c	0.507 ± 0.003 ^c
模型组	14(4/18)	0.236 ± 0.113	0.956 ± 0.049
干预组	12	0.078 ± 0.054 ^c	0.523 ± 0.015 ^c
治疗组	12 (2/14)	0.108 ± 0.007 ^c	0.524 ± 0.009 ^c
银杏叶组	6	0.057 ± 0.063 ^c	0.536 ± 0.017 ^c

^c $P < 0.001$ vs 模型组。



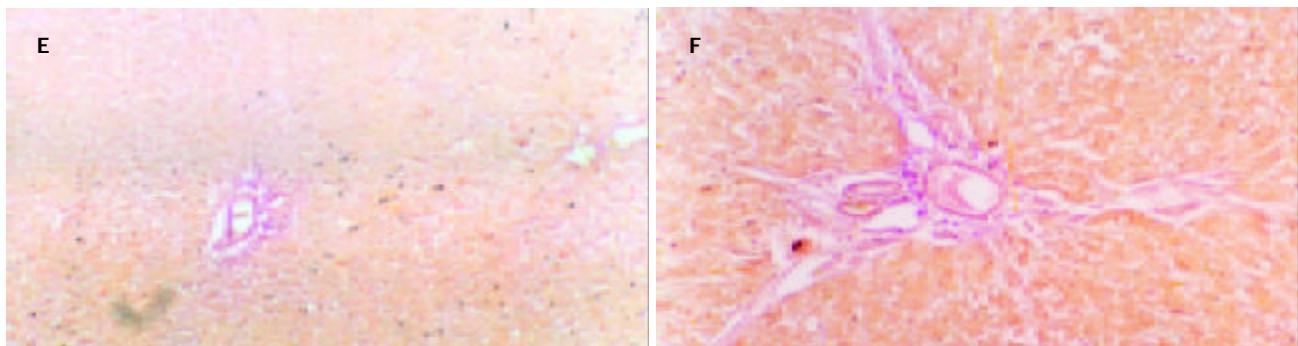


图1 各组大鼠肝组织病理变化. A: 模型组大鼠肝组织 HE 染色 $\times 100$; B: 银杏叶干预组大鼠肝组织 HE 染色 $\times 100$; C: 银杏叶治疗组大鼠肝组织 HE 染色 $\times 100$; D: 模型组大鼠肝组织 VG 染色 $\times 100$; E: 银杏叶干预组大鼠肝组织 VG 染色 $\times 100$; F: 银杏叶治疗组大鼠肝组织 VG 染色 $\times 100$.

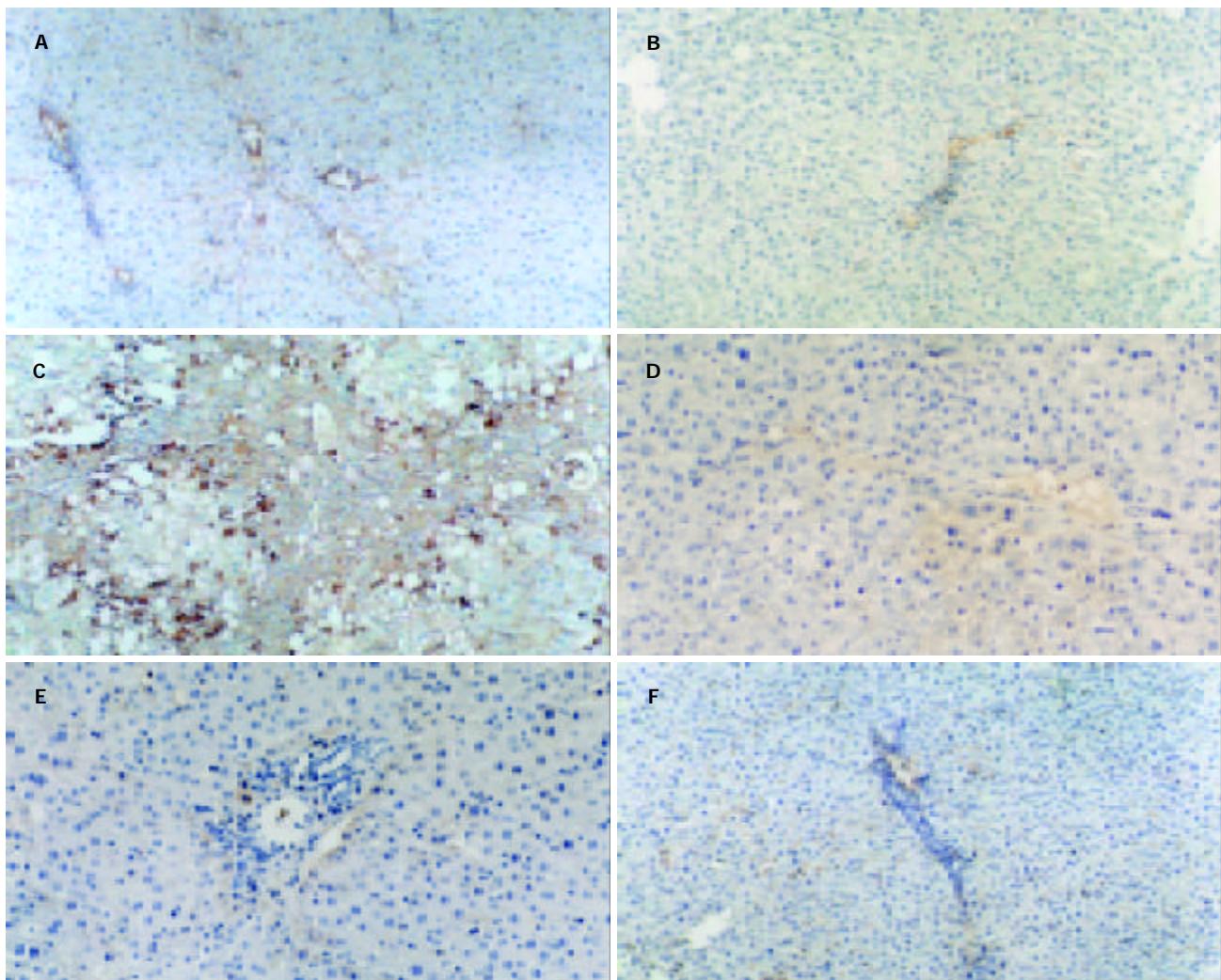


图2 I型胶原、TGF- β 1在各组大鼠肝组织中的表达. A: I型胶原在模型组大鼠肝组织表达 $\times 100$; B: I型胶原在银杏叶治疗组大鼠肝组织表达 $\times 100$; C: I型胶原在银杏叶干预组大鼠肝组织表达 $\times 100$; D: TGF- β 1在模型组大鼠肝组织表达 $\times 100$; E: TGF- β 1在银杏叶治疗组大鼠肝组织表达 $\times 100$; F: TGF- β 1在银杏叶干预组大鼠肝组织表达 $\times 100$.

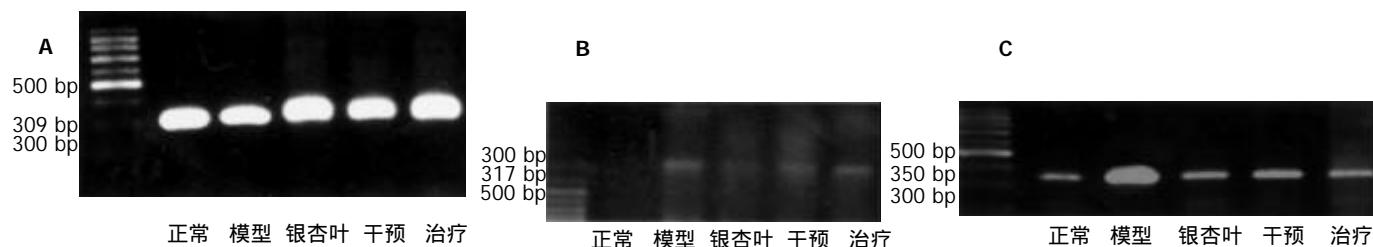


图3 I型胶原、TGF- β 1mRNA 在各组大鼠肝组织中的表达. A: 各组大鼠肝组织 GAPDH mRNA 电泳条带; B: 各组大鼠肝组织 I型胶原 mRNA 电泳条带; C: 各组大鼠肝组织 TGF- β 1 mRNA 电泳条带.

3 讨论

肝星状细胞(HSC)活化是肝纤维化发生的核心环节，氧化应激及脂质过氧化是引起肝细胞损伤与HSC活化的重要机制^[21-26]。肝损伤产生的氧自由基及细胞因子等激活HSC，产生大量以I型胶原为主的间质胶原，引起细胞外基质(ECM)数量和质量上的变化，最终导致肝纤维化的发生^[27-31]。因此，抑制HSC的激活，减轻细胞因子对其的影响成为防治肝纤维化的关键。银杏叶提取物(EGb)是天然的血小板活化因子拮抗剂。其主要成分银杏黄酮甙类有较强的抗氧化作用^[13-17]。黄酮甙的母核中含有还原性羟基功能基团，可直接清除O₂⁻、·OH、H₂O₂等氧自由基，并能捕获脂质自由基、脂过氧自由基、脂氧自由基和烷自由基等基团，终止自由基连锁反应链，从而抑制氧自由基反应和脂质过氧化反应，抑制MDA、共轭二烯等毒性物质的生成，增强自由基反应酶类如SOD、GST-PX等的活性，减缓氧自由基和脂质过氧化损伤。国内已有资料表明^[19]，EGb通过抗氧化应激抑制NF-κB诱导的HSC活化，抑制肝纤维化的发生。

我们利用CCl₄诱导实验性肝纤维化模型，同时用EGb干预和治疗，结果显示，实验性大鼠腹腔注射CCl₄8 wk后肝表面可见大小不一的颗粒，镜下可见胶原纤维大量沉积于汇管区，围绕肝再生结节，成功诱导出肝纤维化。干预组8 wk后大鼠均无明显肝纤维化形成，与正常对照组相比，除肝细胞排列紊乱外，汇管区无胶原纤维沉积；治疗组8 wk后肝纤维化的程度也明显改善，汇管区及小叶间仅有少量纤维组织增生，部分向小叶内伸展，证实EGb具有防治CCl₄诱导实验性肝纤维化的作用。免疫组化则显示正常对照组及银杏叶组I型胶原的表达仅见于汇管区，而模型组中，I型胶原阳性细胞染色明显增多，其分布除汇管区、中央静脉周围增多外，在肝纤维隔内也呈弥漫分布，EGb干预及治疗组I型胶原阳性细胞免疫组化染色程度明显弱于模型组；正常对照组及银杏叶组TGFβ1几乎不表达，模型组TGF-β1阳性细胞主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带及肝纤维间隔中，EGb干预及治疗组阳性染色程度较模型组明显减轻。同样，利用RT-PCR检测肝组织I型胶原和TGFβ1 mRNA的相对含量也表明正常及EGb组大鼠的表达很弱，而模型组I型胶原和TGFβ1 mRNA显著增强，EGb干预及治疗组则明显低于模型组，二者有显著差异(P<0.0001)。提示EGb可能通过减轻氧自由基和脂质过氧化对肝细胞的损伤，抑制HSC的增生，减少TGF-β1 mRNA的表达，从转录水平降低了I型胶原mRNA的生成，最终抑制/逆转肝纤维化的发生，并且无毒副作用。此为EGb应用于肝纤维化的防治提供了理论依据。

4 参考文献

1 王吉耀，刘维田，胡美玉，朱无难，童家琪. 甘草酸对成纤维细胞

- I、III型前胶原mRNA表达的抑制作用. 中华消化杂志 1997; 17: 60-61
- 2 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514
- 3 蒋业贵，李兆申. 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1443-1446
- 4 Liu YK, Shen W. Inhibitive effect of cordyceps sinensis on experimental hepatic fibrosis and its possible mechanism. *World J Gastroenterol* 2003;9:529-533
- 5 Wang ZR, Chen XM, Li DG, Wei HS, Huang X, Zhan YT, Lu HM. Suppression of expression extracellular matrix in hepatic fibrosis rat with tetrandrine and glycyrrhizinic acid. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:970-974
- 6 Arthur MJ. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion* 1998;59:376-380
- 7 Schaefer B, Rivas-Estilla AM, Meraz-Cruz N, Reyes-Romero MA, Hernandez-Nazara ZH, Dominguez-Rosales JA, Schuppan D, Greenwel P, Rojkind M. Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2003;162:1771-1780
- 8 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003;125:178-191
- 9 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807
- 10 Xu JW, Gong J, Feng XL, Chang XM, Luo JY, Dong L, Jia A, Xu GP. Effects of estradiol on type I, III collagens and TGFβ1 in hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11: 1185-1188
- 11 Gressner AM, Krull N, Bachem MG. Regulation of proteoglycan expression in fibrotic liver and cultured fat-storing cells. *Pathol Res Pract* 1994;190:864-882
- 12 Williams EJ, Gaca MD, Brigstock DR, Arthur MJ, Benyon RC. Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000;32:754-761
- 13 Li W, Dai QT, Liu ZE. Preliminary study on early fibrosis of chronic hepatitis B treated with Ginkgo biloba Composita. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1995;15:593-595
- 14 Ozenirler S, Dincer S, Akyol G, Ozogul C, Oz E. The protective effect of Ginkgo biloba extract on CCl₄-induced hepatic damage. *Acta Physiol Hung* 1997;85:277-285
- 15 Bruck R, Shirin H, Aeed H, Matas Z, Hochman A, Pines M, Avni Y. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. *J Hepatol* 2001;35:457-464
- 16 Gohil K, Packer L. Bioflavonoid-rich botanical extracts show antioxidant and gene regulatory activity. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:70-77
- 17 Rimbach G, Wolffram S, Watanabe C, Packer L, Gohil K. Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on differential gene expression. *Pharmacopsychiatry* 2003;(36 Suppl 1):S95-99
- 18 Birks J, Grimley EV, Van Dongen M. Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;4:CD003120
- 19 Liu SQ, Yu JP, Luo HS, Ran ZX. Effects of Ginkgo biloba extract on expression of NF-κB in rat liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:922-926
- 20 Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000;31:241-246
- 21 Baroni GS, Pastorelli A, Manzin A, Benedetti A, Marucci L, Solforosi L, Di Sario A, Brunelli E, Orlandi F, Clementi M, Macarri G. Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver* 1999;19:212-219
- 22 Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J* 2001;42:1-8

- 23 Kang WZ, Xie YM, Nie QH, Zhang Y, Hao CQ, Wang JP, Chen WH. Effect of Oxymatrine on experimental liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:195-198
- 24 Liu C, Liu P, Liu CH, Zhu XQ, Ji G. Effects of Fuzhenghuayu decoction on collagen synthesis of cultured hepatic stellate cells, hepatocytes and fibroblasts in rats. *World J Gastroenterol* 1998;4:548-549
- 25 Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound on collagen expression of hepatic cells in experimental liver fibrosis of rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:877-880
- 26 Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7:115-119
- 27 Xu JW, Gong J, Chang XM, Luo JY, Dong L, Hao ZM, Jia A, Xu GP. Estrogen reduces CCl₄- induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:883-887
- 28 Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002;36:12-21
- 29 Liang J, Yang GY, Zhang XL, Pang YS, Yuan HF, Liang JS, Huang RB, Wei X, Wei M. Inhibitory mechanism of taurine against CCl₄- induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1392-1395
- 30 陈颖伟, 卫新革, 展玉涛, 张文竹, 徐芹芳, 李定国. 大黄与粉防己碱抗实验性肝纤维化的对照研究. 中华消化杂志 2003;23:476-479
- 31 Wu XL, Zeng WZ, Wang PL, Lei CT, Jiang MD, Chen XB, Zhang Y, Xu H, Wang Z. Effect of compound rhodiola sachalinensis A Bor on CCl₄-induced liver fibrosis in rats and its probable molecular mechanisms. *World J Gastroenterol* 2003;9:1559-1562

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 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. 他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.

食管癌线粒体DNA体细胞性突变与种系性变异

谭端军, 刘玲玲, 刘 鹏, 文 毅, Julia Chang, Kun-Tu Yeh, Lee-Jun C Wong

谭端军, 刘玲玲, 刘鹏, 文毅, 中国人民解放军总医院老年心血管病研究所 北京市 100853

Julia Chang, Kun-Tu Yeh, 台湾彰化基督教医院病理科
Lee-Jun C Wong, 美国华盛顿特区乔治城大学医学中心分子与人类遗传研究所 20007

谭端军, 男, 1963-06-28 生, 湖南望城县人, 汉族, 1984 年湖南医科大学本科毕业, 1993 和 1998 年北京解放军军医进修学院硕士和博士研究生毕业, 2000 年美国乔治城大学医学中心博士后, 副教授, 主要从事线粒体基因变异与老年疾病的研究。

解放军总医院院长基金资助项目, No. 03YZJJ005

项目负责人: 谭端军, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院老年心血管病研究所. tdj301@yahoo.com.cn

电话: 010-68168517

收稿日期: 2003-12-17 接受日期: 2004-01-12

Mitochondrial DNA somatic mutations and germline variations in patients with esophageal cancer

Duan-Jun Tan, Ling-Ling Liu, Peng Liu, Yi Wen, Julia Chang, Kun-Tu Yeh, Lee-Jun C Wong

Duan-Jun Tan, Ling-Ling Liu, Peng Liu, Yi Wen, Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Julia Chang, Kun-Tu Yeh, Department of Pathology, Changhua Christian Hospital, Changhua, Taiwan, China

Lee-Jun C Wong, Institute for Molecular and Human Genetics, Georgetown University Medical Center, Washington, 20007, USA
Supported by the Dean Grant of Chinese PLA General Hospital, No. 03YZJJ005

Correspondence to: Dr. Duan-Jun Tan, Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, 28 Fuxing Road, Beijing, 100853, China.
tdj301@yahoo.com.cn

Received: 2003-12-17 Accepted: 2004-01-12

Abstract

AIM: To detect somatic mutations in the complete mitochondrial genome and to investigate the role of mtDNA in the tumorigenesis of esophageal cancer.

METHODS: A temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) method was used to analyze the somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in esophageal cancer. The entire mitochondrial genomes in 20 tumor samples and paired normal tissues were amplified by using 32 pairs of overlapping primers. DNA fragments showing different banding patterns between normal and tumor mtDNA were sequenced to identify the somatic mutations and germline variations.

RESULTS: Eleven out of the 20 tumors (55%) displayed at least one somatic mtDNA mutation. Total fourteen somatic mutations were found. Among them, one was in tRNA (7.1%), 4 in mRNA (28.5%), and 9 in the hypervariable D loop region (64.3%). There were two missense mutations in four novel somatic mutations. A total of 187 distinct germline variations were identified. Fourteen of these variations were novel, and 173 of them had been recorded in

the Mitomap database.

CONCLUSION: The high incidence of mtDNA mutations presents in patients with esophageal cancer. mtDNA alterations may play an important role in tumorigenesis of esophageal cancer.

Tan DJ, Liu LL, Liu P, Wen Y, Chang J, Yeh KT, Wong LJC. Mitochondrial DNA somatic mutations and germline variations in patients with esophageal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):892-896

摘要

目的: 探讨线粒体DNA体细胞性突变和种系性变异在食管癌的发生情况及其可能的作用。

方法: 利用时相温度梯度电泳方法分析了食管癌的线粒体基因体细胞性突变。采用32对重叠引物扩增了来自20例食管癌患者的肿瘤组织和配对正常组织的线粒体全长基因, 在肿瘤和正常组织中不同的电泳条带类型的DNA片段被测序以辨别其突变类型。

结果: 在20例肿瘤中11例(55%)至少发现一个体细胞性突变, 总共发现14个体细胞性突变, 其中1个位于rRNA(7.1%), 4个位于mRNA(28.5%), 另外9个位于高变D环区(64.3%)。4个新的体细胞性突变中2个为错义突变。在测序片段中共发现187个种系性变异, 其中14个为新发现的变异, 173个为已被报道并记录在线粒体基因数据库中。

结论: 食管癌患者线粒体DNA存在高发生频率的体细胞性突变提示线粒体DNA的变异可能与食管癌的发生发展有关。

谭端军, 刘玲玲, 刘鹏, 文毅, Julia Chang, Kun-Tu Yeh, Lee-Jun C Wong. 食管癌线粒体DNA体细胞性突变与种系性变异. 世界华人消化杂志 2004; 12(4):892-896

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/892.asp>

0 引言

线粒体是细胞质内的主要细胞器, 它通过氧化磷酸化以ATP形式产生能量, 线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)缺失性突变已在众多的神经肌肉疾病中被报道^[1-5]。线粒体DNA的突变率较核基因增高至少10倍, 线粒体DNA具有高突变率, 对于与肿瘤有关的氧化性DNA损伤极为敏感^[6-8]。线粒体在能量代谢、活性氧的产生、衰老和细胞凋亡的起始过程中的重要角色提示线粒体是细胞死亡和非正常生长的关键点, 因此而在肿瘤的发生过程中可能起着重要作用。体细胞性线粒体

DNA突变已经在乳腺癌、结直肠癌、膀胱癌、头颈部肿瘤、白血病、肺癌和口腔癌被报道^[9-17]. 是否在食管癌组织中同样具有线粒体基因的体细胞突变? 如果有突变那么他们与食管癌发生发展具有何种和关系? 他们与其他肿瘤中报道的突变率是否具有差异? 为了阐明上述问题, 我们对食管癌组织线粒体基因体细胞突变和肿瘤特征的相关性进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 食管癌组织和匹配的正常组织共20例, 使用蛋白酶K和酚/氯仿抽提总DNA, 荧光Hoechst染料H33258于DYNA QUANT200系统上测定含量, DNA被稀释至5 mg/L供PCR反应用.

1.2 方法 首先使用32对重叠引物扩增线粒体16.6 kb全长基因, 所得片段长度为306-805 bp, 平均594 bp, 扩增片段全长18 953 bp. 由于部分扩增区域重叠, 因此较线粒体基因16 569 bp长出14%. 利用时相温度梯度凝胶电泳筛选线粒体基因体细胞突变, 对来自于正常组织和肿瘤组织的片段进行配对分析^[18-19]. 在TTGE分析中, 单一条带的迁移变化代表着同质性的DNA改变, 出现多条带则代表异质性的突变. 对任何显示肿瘤和正常组织电泳条带类型的不同的DNA片段进行测序分析, 以辩明确切的突变. DNA测序采用荧光染料链终止测序试剂盒(Perkin Elmer)于ABI377(applied biosystem)自动测序仪上进行. DNA测序结果利用MacVector™ 7.0^[20] (Oxford Molecular Ltd, Oxford, England)软件与MitoMap的剑桥修正序列^[21]进行比对分析, 在肿瘤和正常组织线粒体基因中均发现的变异被认为是种系性突变, 如在二者间出现不同则筛选为体

细胞性突变.

2 结果

2.1 体细胞突变率 在20例食管癌中有11例(55%)具有体细胞突变, 其中9例在高变D环区具有突变. 8例具有1个突变, 剩余3例具有多个突变, 突变总数达14个. 除核酸303-309位点多聚C的插入与缺失外, 每种突变仅发生1次. 在全部14个突变中, 1个位于rRNA(7.1%), 4个位于mRNA(28.5%), 另外9个位于高变D环区(64.3%), 且均位于核酸303-315区域. 肿瘤组织中5个突变为同质状态, 其中有3个在其周围正常组织为异质状态. 异质性产生可能是由于包含肿瘤周围正常组织所致, 或者形态学正常的组织在分子水平已经发生了改变. 剩余的9个突变在肿瘤组织中为异质状态, 其中6个是由周围正常组织同质状态向肿瘤的异质状态发生转变, 3个在肿瘤和周围正常组织中均为异质状态, 但突变线粒体DNA在定量上的所占百分率不同(表1).

2.2 错义突变的保留情况 在所有的14个突变中有4个突变是出现在新发现的突变位点上, 这些位点的变异在以前的研究中和MitoMap中未见记载(见表1), 其中2个错义突变分别发生在ND4L和ATPase 6基因区, G10500A造成了11号位点氨基酸由丙氨酸向苏氨酸转变, 动物进化保留情况分析显示该位点在脊椎动脉是属于保守序列, 该患者的正常组织已发生变异, 但在肿瘤组织中又发生回复性突变见图1. A9182G造成了氨基酸219号位点的天冬酰胺向丝氨酸转变, 同样该区域在脊椎动脉也属于相对保守的序列见图1, 这种突变有可能造成ATP合成酶功能的不良.

表1 食管癌组织的线粒体基因体细胞突变

病例	基因 ¹	体细胞突变	类型 ²	核酸编码	氨基酸改变 ³	已报道情况
E02	D环	T310C	HT → HT			多态性
E05	D环	303 → 309 缺失C(C8 → C7/8)	HM → HT			多态性
E05	12S	A1544T	HM → HT			新突变
E09	D环	303 → 309 缺失C(C9/8 → C8/9)	HT → HT			多态性
E10	D环	303 → 309 插入C(C8 → C8/9)	HM → HT			多态性
E12	ND4L	G10500A	HM → HT	GCA → ACA	A11T	新突变
E14	D环	303 → 309 插入CC(C7 → C9)	HM → HT			多态性
E14	COX III	G9377A	HM → HM	TGG → TGA	W57W	多态性
E15	D环	303 → 309 缺失C(C8/9 → C8)	HT → HM			多态性
E15	ATPase 6	A9182G	HT → HM	AAC → AGC	N219S	新突变
E16	D环	303 → 309 插入C(C7/8 → C7/8/9)	HT → HT			多态性
E17	D环	303 → 309 插入C(C8 → C9)	HM → HM			多态性
E18	ND4	10941 缺失TAACAAACCCCC	HM → HT			新突变
E19	D环	303 → 309 缺失CC(C9/10 → C7)	HT → HM			多态性

¹COX- 细胞色素C氧化酶亚单位; ATPase-ATP合成酶亚单位; ND-NADH氧化还原酶亚单位; ²Ht: Heteroplasmy, 异质性; Hm: homoplasmy, 同质性; ³A- 丙氨酸; T- 苏氨酸; W- 色氨酸; N- 天冬酰胺; S- 丝氨酸. 总突变数14个, 其中6个为HM → HT, 3个为HT → HM, 2个为HM → HM, 3个为HT → HT

ATPase6 E15 A9182G(N219S)		ND4L E12G10500A(A11T)
AYVFTLLVSLYLHDNT	肿瘤组织	IYMNIML T FTISLLG
AYVFTLLVNLYLHDNT	正常组织	IYMNIMLAFTISLLG
AYVFTLLVSLYLHDNT	人	IYMNIMLAFTISLLG
AYVFTLLVSLYLHENT	猩猩	IYMNIMLAFTISLLG
AYVFTLLVSLYLHDNT	牛	VVMNIMMAFTVSLVG
AYVFTLLVSLYLHDNT	鼠	TFFNLTM A FSLSLLG
AYVFVLLSLYLQENI	鸡	LHFSFYSAFTFSSLG
AYVFVLLSLYLQENT	青蛙	MTFFLIMMF T IVLMG
SYVFAVLSTLYSSEVN	苍蝇(DM)	YWSLPMIL F ILGLFC
SYVFAVLSTLYSSEVN	苍蝇(DY)	YWSLPMIL F ILGLFC
AYVFTALVHFYLNQNI	海胆	LLIVLISIF Y LGLLG

图1 体细胞性突变位点的进化保留情况分析。

2.3 移码突变 我们发现1例位于NADH氧化还原酶亚单位4基因的11个碱基缺失(起始于10 941位点、终止于10 946位点),自61号氨基酸位点开始,其后续的编码发生移位,在移位154个氨基酸后遭遇链终止密码子UAA而氨基酸链合成终止。NADH氧化还原酶亚单位4基因共包含459个氨基酸,而本例肿瘤由于移码突变而导致编码合成了215个氨基酸后即终止了合成。TTGE和测序图像均显示该突变为异质性改变(图2)。

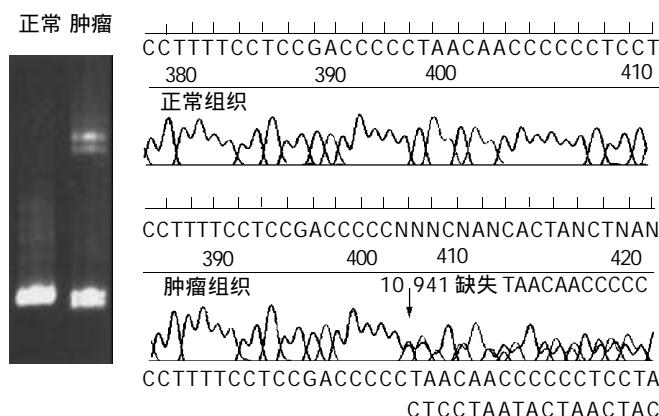


图2 NADH 氧化还原酶亚单位4基因异质性的移码缺失突变。

2.4 种系性序列变异 我们对TTGE上显示出在正常和肿瘤组织电泳条带不同的DNA片段进行了测序,以辨明可能的体细胞性突变,当将正常组织的序列与已报道的剑桥序列进行比较时,我们也检测到187个种系性变异,其中173个已被记录在MitoMap数据库中,发生频率在25%以上的变异包括248-249缺失A、303-309插入或缺失C、311-315插入C、T489C、514-523缺失CA。A8860G、T9540C、C12705T、T16189C、C16223T、T16304C和T16519C。此外,本研究也发现14个在其他文献和线粒体文库中未见报道的、新的种系性变异,除2个位于D环区外,其余12个位于基因编码区。其中7个位于呼吸链氧化磷酸化复合物I、4个位于复合物IV、1个位于复合物V,7个错义变异造成了氨基酸

的改变,但所有的新变异均仅发生一次见表2。

表2 食管癌组织发现的新种系性突变

病例	基因	核酸改变	类型	编码	氨基酸改变 ⁴
E13	D环	G251A	HM		
E3	D环	C481T	HM		
E19	COII	T7711C	HM	CTT→CTC	L42L
E16	COII	G7910C	HM	GAG→CAG	E109Q
E16	COII	G7912C	HM	GAG→GAC	E109D
E15	ATPase 6	G9182A	HT	AGC→AAC	S219N
E1	COIII	A9545G	HM	GGA→GGG	G113G
E14	ND3	T10282A	HT	CTA→CAA	L75Q
E13	ND4L	T10609C	HM	ATA→ACA	M47T
E2	ND4	A11976C	HT	TAC→TCC	Y406S
E8	ND5	G12561A	HM	CAG→CAA	Q75Q
E5	ND5	C12882T	HM	TTC→TTT	F182F
E1	ND5	T12957C	HM	AAT→AAC	N207N
E13	ND5	G13928C	HM	AGC→ACC	S513T

⁴D-天冬氨酸; E-谷氨酸; F-苯丙氨酸; G-甘氨酸; L-亮氨酸; M-甲硫氨酸; N-天冬酰胺; Q-谷氨酰胺; S-丝氨酸; T-苏氨酸; Y-酪氨酸。错义变异用加黑表示。

3 讨论

线粒体是体内重要的细胞器,存在于胞质内。每个人类细胞中含有数以百计的线粒体,每个线粒体内含有2-10个拷贝的mtDNA分子。mtDNA位于线粒体基质中,是目前发现的惟一存在于人细胞质中的DNA分子,他是独立于细胞核染色体外的基因组,具有自我复制、转录和编码功能。线粒体既有自己的一套遗传控制系统,同时也受细胞核DNA的控制。许多生物化学反应都在线粒体内进行,其中尤为重要的是通过氧化磷酸化作用产生ATP,供生命活动需要。我们报道了人类食管癌的体细胞性突变的全面研究,在14个独立的体细胞性突变中,10个已经在其他肿瘤中被报道,4个为首次被观察到。最近报道的研究结果显示,大部分针对肿瘤的体细胞性线粒体基因突变的研究都集中在D环区和包含有微卫星的区域,但对全线粒体基因进行突变检测的较少,约7-80%的线粒体基因已被采用不同的方法进行研究,包括单链构象多态性检测、二维基因扫描和手动测序等^[9-10,13]。最具有对比性的研究是通过全线粒体基因测序调查了10例卵巢癌的体细胞性突变,其中发现60%(6/10)卵巢癌具有体细胞性突变,33%的突变位于D环区^[9]。在本研究中我们对全线粒体基因突变进行了扫描,发现55%的食管癌具有线粒体基因体细胞性突变,64.3%的突变位于D环区,其突变发生率与上述卵巢癌研究基本相同,D环区突变发生率略高,但全部位于核酸303-315区域。既往的研究表明该区域是一个高度多态的区域,胞嘧啶(C)的数目在不同个体的

正常组织是非常多变的, 在核酸 310 位点为胸腺嘧啶(T), 其前后分别为单核苷酸 C 的重复, 其中 303-309 的长度从 7C 到 10C 不等, 最常见的野生型为 7-8C, 311-315 绝大部分为 6C^[22]. 在我们的另一项研究中发现, 在 149 个不同类型的肿瘤中 43 例(占 28.86%)具有该区域的体细胞性突变, 最常见的表现形式是插入和缺失, 说明这是一个基因不稳定区域^[23].

另外, 我们还发现部分突变位于线粒体结构与功能的重要区域, 但在肿瘤发生学过程中每种突变所扮演的作用尚不清楚, 但在基因编码区、进化保留区、复制起始区、转录推动子和转录因子结合位点的突变可能影响整个线粒体的转录量和成熟蛋白, 最后, 氧化磷酸化活性将受到影响。例如, NADH 氧化还原酶亚单位 4 基因异质性的移码缺失突变导致了氨基酸合成链的终止; 此外, 二个保留的错义突变也可能具有一定的意义, 如 ATP6 合成酶亚单位 6 的 219 号位点天冬酰胺向丝氨酸转变, 这个位点在脊椎动物是属于保守序列, 这种改变将可能导致 NADH 氧化还原酶功能的改变。此外 NADH 氧化还原酶亚单位 4L 的 11 号氨基酸位点丙氨酸向苏氨酸转变, 此位点同属脊椎动物保守序列, 但正常组织中发生突变, 而在肿瘤组织中又回复为原保留序列, 在肿瘤组织这种返祖现象的原因不明, 但我们认为在肿瘤组织中的体细胞性突变可能是乘客突变 (passenger mutation) 或一过性突变, 或者在肿瘤发生学上并不扮演起因角色。

我们发现许多的种系性突变, 值得提及的是在 14 个新的种系性变异中 7 个为错义变异, 导致了氨基酸的变化。剩余的均为同质性变异, 尽管通常认为这种同质、多态性突变的生物化学作用很弱, 不足以引起氧化磷酸化的改变, 但长时间、轻微的氧化磷酸化改变最终可导致氧化应激, 尤其在肿瘤等疾病出现时, 他们可能因影响肿瘤发生的危险因素而在肿瘤的发生发展过程中发挥潜在的作用。通过对全 mtDNA 突变检测表明食管癌组织中存在高频率的体细胞突变, 他们在线粒体基因中的分布是散在的, 在食管癌发病中的作用目前尚难以判断, 但可以明确的是 mtDNA 的编码和非编码区的突变会影响 mtDNA 的正常表达, 影响线粒体蛋白质的合成与功能, 这些突变是否参与了肿瘤的发生与发展尚有待进一步的生物化学研究加以证实。薛凌霄^[24-25] et al 通过恶性肿瘤报告分析了消化系恶性肿瘤的发病状况, 在 1691 例恶性肿瘤中统计分析结果显示消化系恶性肿瘤 1 160 例占 68.60%, 其中食管癌 552 例占 47.59%, 是发生率最高的肿瘤, 而且容易发生区域淋巴结转移, 手术后 5 a 生存率约 10%。在多种肿瘤中等位基因异常被证明是肿瘤发生早期事件, 食管癌中常见的染色体缺失区及其相关基因有 17 号染色体短臂(p53 基因)、13 号染色体长臂(Rb 基因)等^[26]。林军 et al^[27] 从基因水平探讨湖北地区汉族人食管癌 HLA-DQB1 等位基因的遗传易感性, 结果发现湖北汉族人食管癌患者与正常人比

较, HLA-DQB1.0301 基因频率显著增高。汪栋 et al^[28] 的研究发现有 53.8% 的食管癌具有抑癌基因 p16 基因第 2 外显子缺失, 而癌旁正常食管组织均无缺失。其他多项研究也证实食管癌的发生与遗传具有一定的相关性^[29-32], 本研究中发现的线粒体基因突变可能对食管癌发生的研究具有重要意义, 首先本研究明确了食管癌的发生发展过程中具有高发生频率的线粒体基因的突变; 其次, 这些突变引起了基因编码的氨基酸发生改变, 导致了基因功能的不良; 第三, 这些变异可能反映食管癌的遗传风险特征或有可能作为潜在的肿瘤生物学标志之一, 进一步对这些突变所造成的线粒体功能变化进行研究可望为彻底阐明食管癌的发生发展提供基础研究依据。

4 参考文献

- 1 Lane H, Bermingham N, Farrell MA, Redmond J, Connolly S, Brett FM. Mitochondrial disorder with a common 4977-bp deletion presenting as a novel multisystem neurodegenerative disorder. *Ir Med J* 2003;96:249-250
- 2 Ro LS, Lai SL, Chen CM, Chen ST. Deleted 4977-bp mitochondrial DNA mutation is associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a hospital-based case-control study. *Muscle Nerve* 2003;28:737-743
- 3 Jacobs LJ, Jongbloed RJ, Wijburg FA, De Klerk JB, Geraedts JP, Nijland JG, Scholte HR, De Coo IF, Smeets HJ. Pearson syndrome and the role of deletion dimers and duplications in the mtDNA. *J Inher Metab Dis* 2004;27:47-55
- 4 Nadasi EA, Melegi B, Seress L, Kosztolanyi G. Mitochondrial DNA4977 deletion in brain of newborns died after intensive care. *Acta Biol Hung* 2003;54:253-262
- 5 Carod-Artal FJ, Solano-Palacios A, Playan-Ariso A, Viana-Brandi I, Lopez-Gallardo E, Andreu A, Lopez-Perez M, Montoya J. A single deletion of mitochondrial DNA in a Brazilian patient with chronic progressive external ophthalmoplegia. *Rev Neurol* 2003;37:1029-1031
- 6 韩琤波, 李凡, 辛彦. 线粒体 DNA 与消化性肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:624-627
- 7 Liu CS, Tsai CS, Kuo CL, Chen HW, Li CK, Ma YS, Wei YH. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res* 2003;37:1307-1317
- 8 Brown MD, Hosseini S, Steiner I, Wallace DC, Korn-Lubetzki I. Complete mitochondrial DNA sequence analysis in a family with early-onset dystonia and optic atrophy. *Mov Disord* 2004;19:235-237
- 9 Liu VW, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, Wong LC, Ngan HY. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:5998-6001
- 10 房殿春. 基因不稳在胃癌发生中的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:1-5
- 11 Tan DJ, Bai RK, Wong LJ. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:972-976
- 12 Tan DJ, Chang J, Chen WL, Agresti LJ, Yeh KT, Wang B, Wong LJ. Novel heteroplasmic frameshift and missense somatic mitochondrial DNA mutations in oral cancer of betel quid chewers. *Gene Chrom Cancer* 2003;37:186-194
- 13 Kumimoto H, Yamane Y, Nishimoto Y, Fukami H, Shinoda M, Hatooka S, Ishizaki K. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004;108:228-231

- 14 Hiyama T, Tanaka S, Shima H, Kose K, Tuncel H, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Shimamoto F, Haruma K, Chayama K. Somatic mutation in mitochondrial DNA and nuclear microsatellite instability in gastric cancer. *Oncol Rep* 2003;10: 1837-1841
- 15 He L, Luo L, Proctor SJ, Middleton PG, Blakely EL, Taylor RW, Turnbull DM. Somatic mitochondrial DNA mutations in adult-onset leukaemia. *Leukemia* 2003;17:2487-2491
- 16 Liu VW, Yang HJ, Wang Y, Tsang PC, Cheung AN, Chiu PM, Ng TY, Wong LC, Nagley P, Ngan HY. High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Br J Cancer* 2003;89:697-701
- 17 Carew JS, Zhou Y, Albitar M, Carew JD, Keating MJ, Huang P. Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. *Leukemia* 2003;17:1437-1447
- 18 Wong LJ, Liang MH, Kwon H, Park J, Bai RK, Tan DJ. Comprehensive Scanning of the entire mitochondrial genome for mutations. *Clin Chem* 2002;48:1901-1912
- 19 Chen TJ, Boles RG, Wong LJ. Detection of mitochondrial DNA mutations by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Clin Chem* 1999;45:1162-1167
- 20 Rastogi PA. MacVector - Integrated sequence analysis for the Macintosh. *Methods Mol Biol* 2000;132:47-69
- 21 Kogelnik AM, Lott MT, Brown MD, Navathe SB, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database-1998 update. *Nucleic Acids Res* 1998;26:112-115
- 22 Tang M, Baez S, Pruyas M, Diaz A, Calvo A, Riquelme E, Wistuba II. Mitochondrial DNA mutation at the D310 (displacement loop) mononucleotide sequence in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10: 1041-1046
- 23 谭端军, 刘玲玲, 卢才义, 刘鹏, Chang J, Yeh KT, Wong LJC. 人类肿瘤组织线粒体基因D310区域的单核苷酸重复序列变异. 实用医学杂志 2003;19:1187-1190
- 24 薛凌霄. 消化系恶性肿瘤报告 1160 例流行病学分析. 世界华人消化杂志 1998;(特刊 7):440
- 25 王洲, 刘相燕, 刘凡英, 陈景寒. 食管癌淋巴结微转移的诊断及预后的前瞻性研究. 世界华人消化杂志 2004;12:121-124
- 26 李洁, 刘芝华. 食管癌中的等位基因缺失. 世界华人消化杂志 2003; 11:1777-1781
- 27 林军, 邓长生, 孙洁, 周燕, 熊平, 汪亚平. 湖北食管癌 HLA-DQB1 的基因多态性. 世界华人消化杂志 2000;8:965-968
- 28 汪栋, 苏长青, 王媛, 叶玉坤. 食管癌 p16 基因缺失分析. 华人消化杂志 1998;6:1052-1053
- 29 李健, 牛正先, 王立东. 食管癌分子生物学的研究. 新消化病学杂志 1997;5:189-191
- 30 王立东. 食管癌变多阶段演进的形态学变化和分子学基础研究. 新消化病学杂志 1997;(特刊 6):15-16
- 31 王立东. 食管癌变机制和防治研究. 新消化病学杂志 1996;(特刊 5):9-10
- 32 赵亚刚, 张学庸, 惠宏襄, 王成济. HSV-tk/GCV 自杀基因系统对人食管癌细胞的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:961-962

World Journal of Gastroenterology 出版周期

《World Journal of Gastroenterology, WJG》将从 2004 年起由月刊改为半月刊, 以期在不增加出版篇幅的前提下进一步缩短出版周期, 力争论文的投稿时滞控制在 1-4 个月内出版, 并进入 Science Citation Index – Expanded 及 Index Medicus /MEDLINE 等国际著名检索系统, 以展示我国消化病学者在该领域的国际领先地位。例如, 2003 年第 10 期刊出的浙江大学医学院附属第二医院普外科彭淑牖教授等撰写的“采用 PMOD 和刮吸术通过不同途径进行肝尾叶切除术: 76 例”, 是一篇具有国际领先水平的论文, 该文从收稿至出版仅用 45 天。

大肠癌组织 HLA - I 类抗原及相关分子的表达意义

申龙树, 黄培林, 张建琼

申龙树, 黄培林, 东南大学基础医学院病理学系 江苏省南京市 210009
张建琼, 东南大学遗传研究中心, HLA 表达与肿瘤国际参考实验室 江苏省南京市 210009
申龙树, 男, 1970-02-03 出生, 江苏省南京市人, 汉族, 东南大学医学院病理学硕士研究生, 研究方向为肿瘤免疫学。
项目负责人: 黄培林, 210009, 江苏省南京市丁家桥 87 号, 东南大学基础医学院病理学系。 hpl@seu.edu.cn
电话: 025-83272450 传真: 025-83272392
收稿日期: 2003-09-08 接受日期: 2003-10-27

Expression of HLA molecule in colorectal cancer tissue

Long-Shu Shen, Pei-Lin Huang, Jian-Qiong Zhang

Long-Shu Shen, Pei-Lin Huang, Department of Pathology, Basic Medical College, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Jian-Qiong Zhang, Department of Genetics, Southeast University Medical School, International "HLA Expression in Cancer" Chinese Research Center, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Pei-Lin Huang, Department of Pathology, Basic Medical College, Southeast University Medical School, 87 Dingjiaqiaolu, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. hpl@seu.edu.cn

Received: 2003-09-08 Accepted: 2003-10-27

Abstract

AIM: To study the relationship between the expression of HLA class I and clinicopathological significance in colorectal cancers.

METHODS: Expression of HLA class I and associated proteins was studied by immunohistochemistry in colorectal cancer, histologically normal mucosa adjacent to cancer (<3 cm), and histologically normal mucosa distant from cancer. Several monoclonal antibodies (mAbs) were used in this study: HC10 and HCA2 reacted with the nonmorphic determinant of heavy chain of HLA class I antigen; L368 reacted with β_2 microglobulin; SY1 reacted with LMP2 antigen, and TO-5 reacted with calnexin.

RESULTS: In colorectal cancer tissues, the expression of HLA -A,B/C, β_2 M, LMP2 and calnexin were reduced compared to that of both in histologically normal mucosa adjacent to cancer and histologically normal mucosa distant from cancer ($P = 0.001$). The expression of calnexin in cancer was also reduced compared to that of both in histologically normal mucosa adjacent to cancer and histologically normal mucosa distant from cancer ($P = 0.004$). The expression of HLA-B/C antigen in cancer was associated with diverse groups of pathological stage. With increase in Dukes staging of the cancer, the expression of HLA-B/C downregulated, in which that in Dukes A was higher than that in Dukes D ($P = 0.0262$).

CONCLUSION: The expression of HLA class I and associated protein is downregulated in the colorectal cancer tissue. It may be one important mechanism by which colorectal can-

cer cell escapes immune surveillance.

Shen LS, Huang PL, Zhang JQ. Expression of HLA molecule in colorectal cancer tissue. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):897-901

摘要

目的: 探讨大肠癌组织HLA - I类分子及相关分子表达及其意义。

方法: 用免疫组化的方法, 以切端黏膜作为正常对照, 检测大肠癌组织、癌旁组织和正常黏膜组织中HLA - I类分子及相关分子的表达, 并结合肿瘤的临床病理资料综合分析。

结果: 受检的大肠癌组织中重链HLA - A位点、B/C位点及轻链 β_2 微球蛋白(β_2 M)较其相应正常黏膜表达明显下调($P = 0.001$); 肠癌中低分子量多肽(LMP2)($P = 0.001$), 钙联蛋白(calnexin)($P = 0.004$)较正常黏膜表达明显下调; 肠癌中HLA - I类分子表达与肿瘤分化无关; 随着肿瘤的Dukes分期, 癌组织中HLA - I类分子表达渐次降低, 但各位点表达情况并不相同, HLA - B/C表达水平与肿瘤分期相关, 其在Dukes A期表达水平高于D期($P = 0.0262$)。

结论: 肠癌组织及癌旁黏膜中HLA - I类分子、低分子量多肽及钙联蛋白较正常黏膜表达明显下调; 肠癌组织中HLA - B/C位点随着肿瘤Dukes分期演进其表达下调。

申龙树, 黄培林, 张建琼. 大肠癌组织 HLA - I 类抗原及相关分子的表达意义. 世界华人消化杂志 2004;12(4):897-901
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/897.asp>

0 引言

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)在肿瘤中表达下调或丢失使肿瘤抗原不能与HLA - I类抗原结合而递呈, 细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)不能识别肿瘤抗原, 导致肿瘤细胞逃避CTL杀伤作用而存活, 这是肿瘤逃避机体免疫监视的重要途径, 成为肿瘤免疫研究热点^[1-4]. 但各种肿瘤HLA - I抗原表达水平各家报道不一, 我们收集65例肠癌及其临床病理资料, 应用免疫组化的方法研究肠癌组织HLA - I类抗原及相关分子的表达并探讨其临床病理学意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集东南大学附属中大医院2000/2001年65

例肠癌手术切除标本及其临床病理资料, 取肠癌组织及紧靠肠癌的癌旁组织(靠近肠癌组织3 cm范围内), 常规石蜡包埋, 切片, 经病理医师明确诊断。同时以切端黏膜作正常对照。其中直肠癌30例, 结肠癌35例, 男37例, 女28例。Dukes A期9例、B期28例, C期20例, D期8例; 高分化21例, 中分化25例, 低分化19例。HC10(抗HLA-A位点重链抗原决定基), HCA2(抗HLA-B/C抗原决定基), L368(抗 β_2 M抗原决定基), SY-1(抗LMP2抗原决定基), TO-5(抗Calnexin抗原决定基)单克隆抗体, 阴性对照: 无关抗体MK2-23。以上抗体均由Soldano Ferrone教授(Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute, USA)提供。

1.2 方法 生物素亲合素复合物酶标法(ABC法)免疫组化方法参照Ferrone's Lab的方法, DAB显色, 试剂盒均为美国Vector公司产品。取石蜡标本, 切成4 μ m薄片, 脱蜡至水, 在微波炉中用柠檬酸钠抗原修复液中100 °C抗原修复15 min, PBS冲洗后用双氧水阻断15 min, 冲洗后用Cassin室温下阻断40 min, 分别加入一抗HC10(1:10), HCA2(1:40), L368(1:40), SY-1(1:180), TO-5(1:40), MK2-23(1:100)。4 °C冰箱过夜, PBS冲洗后, 加入生物素化二抗(1:200), 37 °C 60 min, PBS冲洗后, 加入生物素亲合素复合物(1:20)37 °C 40 min, 冲洗后浸入酶底物溶液中(0.5 g/L DAB 100 mL, 30 mL/L双氧水10 μ L), 室温下反应5 min。蒸馏水洗片终止反应, 苏木精染核, 封片后观察^[5-6]。染色结果分别由两位病理医师按以下标准判断, 每张切片观察全部视野。以组织中淋巴细胞作为阳性参照对象, 判断该片中淋巴细胞是否着色, 以反映染色成功与否; 染色呈棕黄色且阳性面积大于或等于75%记为3分; 染色呈黄色且阳性面积大于或等于75%或染色呈棕黄色且阳性面积在25-75%之间记为2分; 染色呈淡黄色且阳性面积大于或等于75%或染色呈黄色且阳性面积在25%与75%之间记为1分; 阳性染色面积小于或等于25%分记为0分^[4, 6-7]。以正常黏膜作为对照, 结合临床病理资料进行分期、分级^[8-9], 统计每组各抗原的表达水平, 并进行相关性分析。

统计学处理 用SAS软件(SAS institute Inc USA 6.12版)对资料用配对t检验和 χ^2 检验进行统计分析。

2 结果

所有组织切片中淋巴细胞都表达HLA-A, HLA-B/C, β_2 M, LMP2和calnexin, 且明显高于正常黏膜细胞($P=0.0001$), 成为本实验良好的内参照。HLA-A, B/C重链抗原在正常黏膜中多表达于细胞膜上, 呈黄色或棕黄色; 正常黏膜的HLA-A、HLA-B/C的表达水平高于肠癌组织($P=0.0001$, 图1)。癌旁组织的HLA-A, HLA-B/C的表达水平介于肠癌组织和正常黏膜之间,

癌旁组织与肠癌组织的表达水平差异性无显著性。在肠癌细胞表面HLA-A, HLA-B/C具有异质性即在同一肠癌组织中部分区域呈阳性, 部分区域呈阴性, 呈现异质性表达(图2-5)。

肿瘤组织HLA-A, HLA-B/C抗原表达水平与肿瘤分化程度无明显相关性; HLA-A表达随着Dukes分期依次降低, 但无明显差异; HLA-B/C位点抗原表达随着Dukes分期明显下调, A期与D期差异显著($P=0.0262$); 而且肠癌中HLA-A, B/C抗原异质性表达现象只发生在肠癌浸润周围组织及淋巴结或出现远处转移时(Dukes B, C期, 表1)。 β_2 微球蛋白(β_2 M)与HLA-I类抗原重链通过非共价键结合, 表达在细胞质及细胞膜表面, 呈黄色或淡黄色。 β_2 M在肠癌组织中表达水平较正常黏膜低($P=0.0001$); 癌旁黏膜表达强于肠癌组织而弱于正常黏膜, 与肠癌组织差异无显著性; 肠癌组织 β_2 M表达水平与肿瘤分期、分级、转移无明显相关性(图1, 表1)。低分子量蛋白2(LMP2)表达在细胞质内, 钙联蛋白(calnexin)呈膜浆型表达, 呈黄色或淡黄色(图6, 7), 在肠癌组织中呈现异质性表达, 表达水平较正常黏膜低($P=0.004$); 癌旁黏膜的LMP2和calnexin表达水平低于正常黏膜, 高于肠癌组织($P<0.01$)。LMP2和calnexin的表达水平与肠癌分级、分期无明显相关性(图1、表1)。

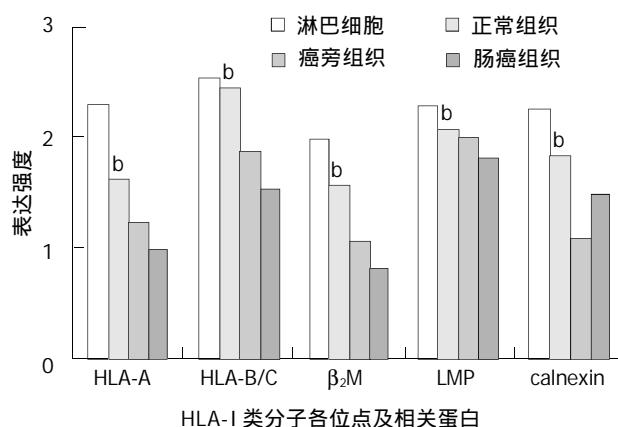
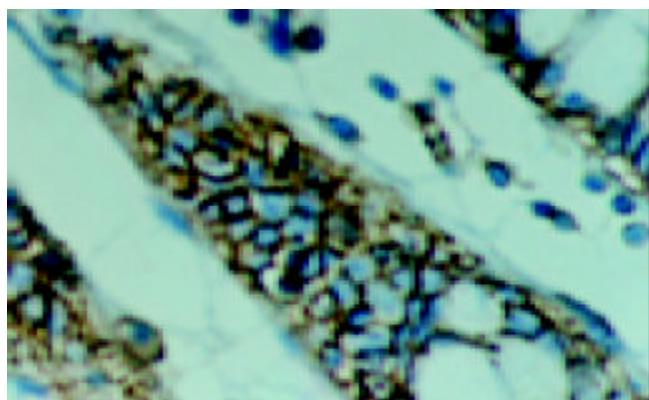
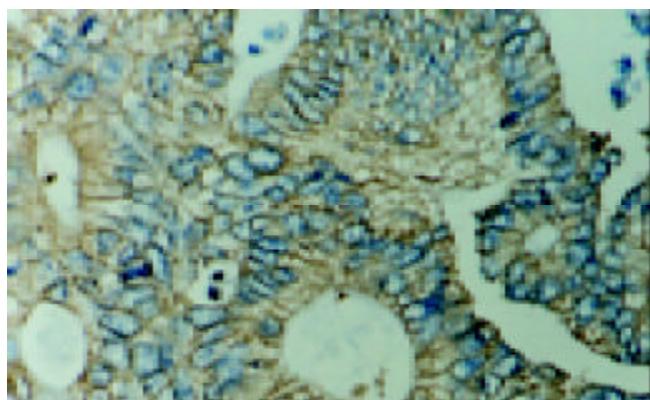
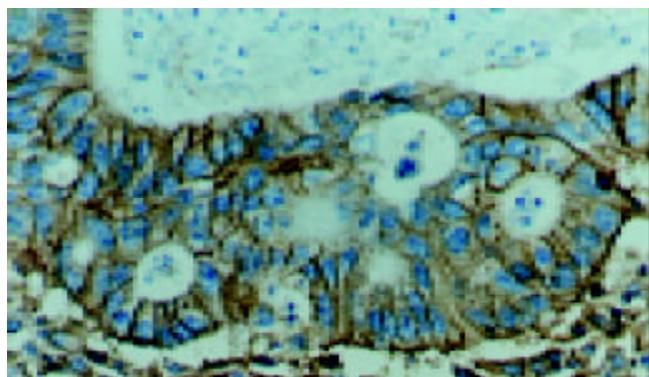
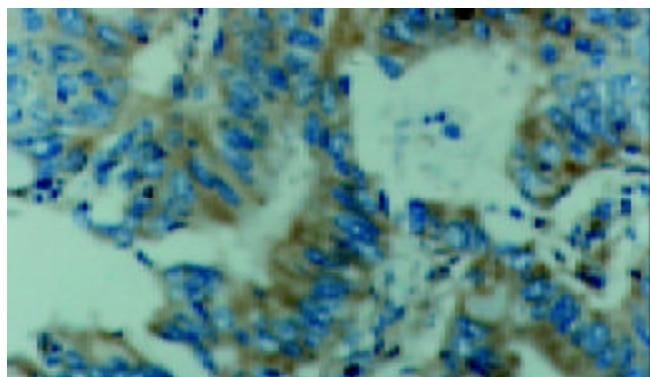
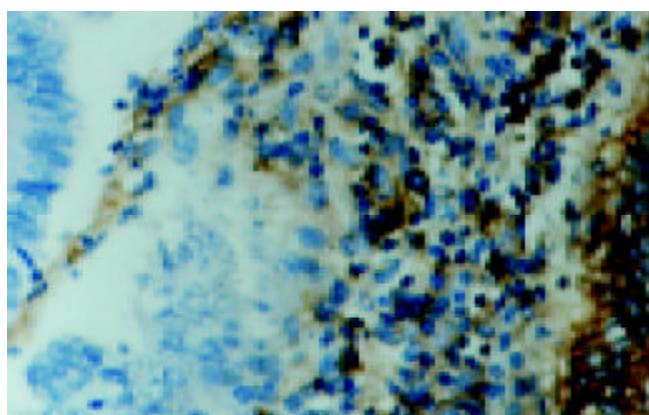
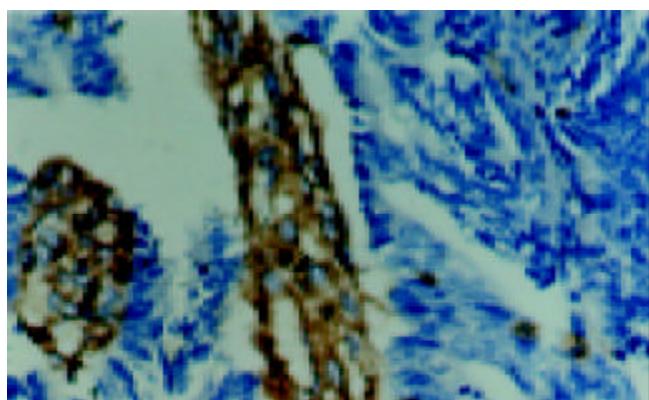


图1 肠癌组织HLA-I类分子及相关分子的表达。

表1 HLA-I类分子及相关分子表达与肠癌病理的关系(mean±SD)

	HLA-A	HLA-BC	β_2 M	LMP2	CALNEXIN
分化	高	0.90±1.00	1.46±1.03	1.06±1.12	1.23±1.00
	中	1.20±0.98	1.25±1.26	1.13±0.96	1.60±1.03
	低	2.33±1.15	1.68±0.90	1.45±0.93	1.59±0.91
分期	A	1.00±0.81	2.50±0.81 ^a	1.75±0.50	1.75±0.95
	B	1.42±1.10	1.76±0.86	1.23±1.05	1.75±0.88
	C	0.75±1.05	1.53±1.18	0.83±1.27	1.07±0.93
	D	1.00±1.00	0.90±0.74	0.75±1.50	0.90±1.00

^aP <0.01 vs D期。

图 2 HLA -B/C 分子在正常黏膜中表达 $\times 400$.图 6 Calnexin 分子在肠癌中表达 $\times 200$.图 3 HLA -B/C 分子在肠癌中表达 $\times 200$.图 7 LMP2 分子在肠癌中表达 $\times 200$.图 4 HLA -B/C 分子在肠癌中异质性表达 $\times 200$.图 5 HLA -B/C 分子在肠癌中不表达 $\times 200$.

3 讨论

肿瘤细胞表面 HLA -I 类抗原表达下调是肿瘤逃避免疫监视的重要途径^[10-11]. 本结果显示肠癌组织中 HLA-A, B/C 重链, β_2M 表达水平较正常黏膜明显下调($P < 0.01$), 在肿瘤的 Dukes 分期中, HLA -I 抗原中各位点情况并不相同, HLA -B/C 位点表达水平在 Dukes A 期与 D 期具有差异显著性. 抗原异质性表达现象只有出现在肠癌发生浸润及转移时. 肠癌细胞表面 HLA -I 类抗原表达降低使肿瘤可以逃避 CTL 的杀伤作用, 有利于癌细胞的生存^[12-13]. 肠癌组织存在多个亚克隆, 在肠癌 Dukes 分期中, HLA -I 类分子高表达的亚克隆被 CTL 杀伤, HLA -I 类抗原低表达的亚克隆得以演化成为优势克隆^[10-11, 14-15]. 肠癌细胞随着分期的变化, 该抗原表达逐渐降低, 并且在浸润至周围组织和/或发生淋巴结转移的肠癌细胞中 HLA -I 类抗原亦呈现低表达; 而在正常黏膜、肠癌早期未见该类抗原异质性表达现象.

肠癌细胞表面 HLA -I 类抗原表达降低逃避免疫监视的机制涉及许多方面因素, 其中 β_2M 表达下调或发生突变是影响 HLA -I 类抗原表达的重要因素^[16-17]. β_2M 与 HLA -I 类抗原重链通过非共价键结合, 可使重链稳定地表达在细胞膜上, 发挥递呈抗原的作用. 若 β_2M 发生突变或缺失, 可致 HLA -I 类抗原重链不能有效表达在细胞膜上^[18-19]. 在本研究中肠癌细胞 β_2M 的表达明显下调. β_2M 表达变化与 HLA -A、B/C 位点在肠癌中的改

变基本保持一致，随着 β_2M 表达下调，HLA-I类抗原重链表达亦下调，提示 β_2M 参与影响HLA-I类抗原表达。LMP2主要作用是将抗原蛋白加工成适合与HLA-I类抗原结合的多肽，他对HLA-I类抗原在细胞膜上表达的密度和稳定性起重要作用^[20-22]，LMP2缺陷或表达降低可导致HLA-I类抗原不能负载抗原肽，使HLA-I类抗原表达下调^[23]。在宫颈癌，卵巢癌，恶性黑色素瘤，肺小细胞癌，肾癌中发现HLA-I类抗原低表达伴随抗原加工递呈系统分子低表达或缺陷^[24-26]。在本实验中，比较正常黏膜与癌组织中LMP2分子表达，发现肠癌中这种抗原表达低于正常黏膜($P < 0.01$)。该抗原与肠癌分级、分期无相关性，但随着肿瘤的Dukes分期这种分子表达下降。本实验结果显示同时存在LMP2、HLA-I类抗原下调，提示LMP2下调是导致HLA-I类抗原下调的重要因素之一。钙联蛋白(calnexin)是一种分子伴侣，他帮助HLA-I类抗原正确折叠，形成有功能的二聚体^[27-28]。低表达或缺乏calnexin可使HLA-I不能形成二聚体，导致HLA-I类抗原表达下调^[29-32]。在本研究中，比较切端黏膜与癌组织中calnexin分子表达，显示肠癌中calnexin表达明显低于正常黏膜，calnexin分子与肠癌分级无相关性，但随着Dukes分期，这种分子表达逐步下调。肠癌中这种分子表达与HLA-I类抗原改变不一致。结果提示calnexin是一种影响HLA-I类抗原表达重要因素，他影响HLA-I类抗原的表达与 β_2M 影响HLA-I类抗原表达下调的机制不同。

在癌旁组织中HLA-A，B/C， β_2M ，LMP2表达介于正常组织与癌组织之间，HLA-A，HLA-B/C， β_2M 在癌旁与肠癌组织表达水平无显著差异，LMP，calnexin在癌旁与肠癌组织表达差异性显著($P < 0.01$)。癌旁组织和肠癌组织均出现HLA-A，HLA-B/C， β_2M 表达下调，提示肠癌组织通过某种细胞间的影响因子，降低HLA-I类抗原表达，这种作用对正常黏膜或癌细胞表面HLA-I类抗原的表达影响较为显著^[33]。癌旁组织LMP2，calnexin表达下调，但结果与HLA-I类抗原的表达有差异，提示影响HLA-I类抗原与LMP2，calnexin表达的机制不完全一样。本结果为肠癌的免疫治疗提供重要的理论依据。

4 参考文献

- 1 Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:654-657
- 2 吴胜利，潘承恩，杨威，牛新捷，耿志敏.原发性肝癌HSP70与MHC-I类抗原表达的意义.世界华人消化杂志 2002;10:291-294
- 3 Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Lopez-Nevot MA, Garrido F. Impaired surface antigen presentation in tumors: implications for T cell-based immunotherapy. *Cancer Biol* 2002;12:15-24
- 4 刘国政，银平章，王宝梅，孔令非，赵跃武.大肠癌中Fas/FasL/HLA-DR表达.世界华人消化杂志 1999;7:428
- 5 浦江，杨希山，张亚历，潘令嘉，周殿元.人胃肠道黏膜淋巴滤泡周围上皮HLA-DR抗原的表达.世界华人消化杂志 2000;8:706-707
- 6 翟守恒，刘俊彬，朱平，王彦宏.肝硬变和肝细胞癌组织中CD54，CD80，CD86和HLA-ABC的表达.世界华人消化杂志 2000;8:292-295
- 7 罗治彬，罗元辉，鲁荣，晋华源，张朋彬，徐采朴.胃癌和癌前病变中树突状细胞的免疫组化研究.世界华人消化杂志 2000;8:400-402
- 8 卿三华.结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义.世界华人消化杂志 2003;11:1760-1763
- 9 谢正勇，卿三华.国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点.世界华人消化杂志 2003;11:1511-1514
- 10 Dalerba P, Maccalli C, Casati C, Parmiani G. Immunology and immunotherapy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;46:33-57
- 11 Campoli M, Chang CC, Ferrone S. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 2002;20:40-45
- 12 Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Bonet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immuno-surveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997;18:89-94
- 13 Adam JK, Odhav B, Bhoola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacol Ther* 2003;99: 113-132
- 14 Lu QL, Abel P, Mitchell S, Foster C, Lalani EN. Decreased HLA-A expression in prostate cancer is associated with normal allele dosage in the majority of cases. *J Pathol* 2000;190:169-176
- 15 Menon AG, Morreau H, Tollenaar RA, Alphenaar E, Van Puijenbroek M, Putter H, Janssen-Van Rhijn CM, Van De Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ. Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab Invest* 2002;82:1725-1733
- 16 Hill DM, Kasliwal T, Schwarz E, Hebert AM, Chen T, Gubina E, Zhang L, Kozlowski S. A dominant negative mutant beta 2-microglobulin blocks the extracellular folding of a major histocompatibility complex class I heavy chain. *Biol Chem* 2003;278:5630-5638
- 17 Cabrera CM, Jimenez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 2003;61:211-219
- 18 Rothenfusser S, Buchwald A, Kock S, Ferrone S, Fisch P. Missing HLA class I expression on Daudi cells unveils cytotoxic and proliferative responses of human $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Cell Immunol* 2002;215:32-44
- 19 McEvoy CR, Seshadri R, Morley AA, Firgaira FA. Frequency and genetic basis of MHC, beta-2-microglobulin and MEMO-1 loss of heterozygosity in sporadic breast cancer. *Tissue Antigens* 2002;60:235-243
- 20 Delp K, Momburg F, Hilmes C, Huber C, Seliger B. Functional deficiencies of components of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:88-95
- 21 Seliger BJ, Maeurer M, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000;21:455-464
- 22 Seliger B, Hohne A, Knuth A, Bernhard H, Ehring B, Tampe R, Huber C. Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin Cancer Res* 1996;2:1427-33
- 23 Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:32-40
- 24 Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B. Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 2001;19:1211-1220
- 25 Dovhey SE, Ghosh NS, Wright KL. Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 2000;60:5789-5796

- 26 Le YS, Kim TE, Kim BK, Park YG, Kim GM, Jee SB, Ryu KS, Kim IK, Kim JW. Alterations of HLA class I and class II antigen expressions in borderline, invasive and metastatic ovarian cancers. *Exp Mol Med* 2002;34:18-22
- 27 Branza-Nichita N, Petrescu AJ, Dwek RA, Wormald MR, Platt FM, Petrescu SM. Tyrosinase folding and copper loading in vivo: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:720-725
- 28 Gassler N, Schnolzer M, Rohr C, Helmke B, Kartenbeck J, Grunewald S, Laage R, Schneider A, Kranzlin B, Bach A, Otto HF, Autschbach F. Expression of calnexin reflects paneth cell differentiation and function. *Lab Invest* 2002;82:1647-1659
- 29 Matsui M, Machida S, Itani-Yohda T, Akatsuka T. Downregulation of the proteasome subunits, transporter, and antigen presentation in hepatocellular carcinoma, and their restoration by interferon-gamma. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:897-907
- 30 Cresswell AC, Sisley K, Laws D, Parsons MA, Rennie IG, Murray AK. Reduced expression of TAP-1 and TAP-2 in posterior uveal melanoma is associated with progression to metastatic disease. *Melanoma Res* 2001;11:275-281
- 31 Kaklamani L, Leek R, Koukourakis M, Gatter KC, Harris AL. Loss of transporter in antigen processing transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Research* 1995;55:5191-5194
- 32 Seliger B, Wollscheid U, Momburg F, Blankenstein T, Huber C. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61:1095-1099
- 33 Grandis JR, Falkner DM, Melhem MF, Gooding WE, Drenning SD, Morel PA. Human leukocyte antigen class I allelic and haplotype loss in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical and immunogenetic consequence. *Clinical Cancer Research* 2000;6:2794-2802

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

• 消息 •

如何订购《世界华人消化杂志》?

1 如何订购2004年《世界华人消化杂志》?

答:《世界华人消化杂志》由北京报刊发行局公开发行,邮发代号82-262。订阅2004年《世界华人消化杂志》,请在邮局办理订阅事宜。

2 2004年《世界华人消化杂志》的订阅价格是多少?

答:《世界华人消化杂志》2004年为月刊,单价24.00元/期,全年12期,共计288.00元(含邮资)。

3 错过邮局征订时间,如何补订《世界华人消化杂志》?

如错过邮局征订时间,您可直接向编辑部联系办理邮购、补订手续。

4 购买历年《世界华人消化杂志》应该如何办理?

答:《世界华人消化杂志》1993年创刊至2002年,存有少量的精装合订本。如您需订购,请参阅下表,选择您所需要的《世界华人消化杂志》合订本。

5 如何办理汇款手续?

答:请按以下详细地址办理邮局汇款:

邮政编码:100023

收款人地址:北京市2345信箱

收款人姓名:世界胃肠病学杂志社发行部

电话:010-85381892

附:《世界华人消化杂志》订单

订刊目录	期数	单价	订数	合计金额
《新消化病学杂志》1993年合订本	1-4期	120.00元/套		
《新消化病学杂志》1994年合订本	1-4期	120.00元/套		
《新消化病学杂志》1995年合订本	1-4期	120.00元/套		
《新消化病学杂志》1996年合订本	1-12期	340.00元/套		
《新消化病学杂志》1997年合订本	1-12期	350.00元/套		
《华人消化杂志》1998合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》1999年合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》2000年合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》2001年合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》2002年合订本	1-12期	350.00元/套		
《世界华人消化杂志》2003年合订本	1-12期	350.00元/套		
《华人消化杂志》1998年特刊号	特刊7	34.00元		
《世界华人消化杂志》2004年(月刊)	1-12期	288.00元/期		

6 订刊时我还需注意什么?

答:特别要提醒的是,请将您所需订购年份的期刊及数量在汇款单附言栏写清楚,并将您的邮政编码、收件人地址、收件人姓名工整、清晰书写清楚,以便我部及时正确的邮寄给您。

幽门螺杆菌感染与慢性胃炎胃黏膜组织中 COX - 2、iNOS 表达的相关性研究

陈白莉, 曾志荣, 胡品津, 唐保东, 何 瑶, 陈 为

陈白莉, 曾志荣, 胡品津, 唐保东, 何瑶, 陈为, 中山大学第一附属医院消化内科 广东省广州市 510080

陈白莉, 女, 1972-01-09 生, 广东省普宁市人, 汉族。1994年中山医科大学本科毕业, 2001年中山医科大学硕士生毕业, 主治医生。主要从事消化系统疾病的研究。

2000年中山医科大学校基金资助项目, No. 200031

项目负责人: 何瑶, 510080, 广东省广州市, 中山大学第一附属医院消化内科。pjhumd @ vip.163.com

电话: 020-87755766-8172

收稿日期: 2003-09-09 接受日期: 2003-10-29

Association between *Helicobacter pylori* infection and expression of COX-2 and iNOS in chronic gastritis

Bai-Li Chen, Zhi-Rong Zeng, Pin-Jin Hu, Bao-Dong Tang, Yao He, Wei Chen

Bai-Li Chen, Zhi-Rong Zeng, Pin-Jin Hu, Bao-Dong Tang, Yao He, Wei Chen, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by Sun Yat-Sen University Foundation 2000, No.200031

Correspondence to: Yao He, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. pjhumd@vip.163.com

Received: 2003-09-09 Accepted: 2003-10-29

Abstract

AIM: To investigate the expression of COX-2 and iNOS in *H pylori* associated chronic gastritis, and also to analyze the relationship between apoptosis and proliferation and COX-2, iNOS expression in gastric epithelia cells.

METHODS: A total of 22 patients were diagnosed as having chronic superficial gastritis by endoscopy and pathology. *H pylori* infection was detected by fast urease and Giemsa stain. The expression of COX-1, COX-2, and iNOS was detected by RT-PCR and immunohistochemistry. Apoptosis and proliferation of gastric epithelial cells were quantitated by apoptosis index (AI) and PCNA labelling index (PCNA-LI).

RESULTS: There was a significant increase in both COX-2 and iNOS expression in *H pylori* positive gastritis compared with normal mucosa. Epithelial cell proliferation index and apoptosis index in *H pylori* gastritis were greater than that in normal mucosa; Expression of COX-2 and iNOS induced by *H pylori* had positive correlation with apoptosis and proliferation in gastric epithelial cells ($r = 0.716, 0.603, P < 0.01$; $r = 0.665, 0.572, P < 0.01$).

CONCLUSION: *H pylori* infection leads to gastric mucosal overexpression of COX-2 and iNOS, which is involved in apoptosis and proliferation imbalance in gastric epithelia

cell. Therefore, it may be one of the crucial mechanisms of *H pylori* inducing gastric cancer.

Chen BL, Zeng ZR, Hu PJ, Tang BD, He Y, Chen W. Association between *Helicobacter pylori* infection and expression of COX-2 and iNOS in chronic gastritis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):902-906

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)感染对慢性胃炎胃黏膜环氧化酶-2(COX-2)、一氧化氮合酶(iNOS)表达以及对胃上皮细胞增生与凋亡的影响, 阐明*H pylori*可能的致癌机制.

方法: 22例经胃镜及病理确诊为慢性浅表性胃炎患者, 采用快速尿素酶及改良Giemsa染色法检测*H pylori*; 采用半定量RT-PCR和免疫组化法检测胃黏膜中COX-1、COX-2和iNOS的表达; 以染色法原位检测胃上皮细胞的凋亡; 以免疫组化法检测胃上皮细胞的增生.

结果: 与正常对照组相比, *H pylori*相关性胃炎胃黏膜组织COX-2和iNOS表达明显增高, 增生、凋亡指数差异显著; *H pylori*感染导致的COX-2和iNOS表达程度与胃黏膜上皮细胞增生、凋亡呈正相关($r = 0.716, 0.603, P < 0.01$; $r = 0.665, 0.572, P < 0.01$).

结论: *H pylori*感染导致胃黏膜COX-2和iNOS的高表达, 与胃上皮细胞的增生与凋亡失衡有关, 从而参与致癌.

陈白莉, 曾志荣, 胡品津, 唐保东, 何瑶, 陈为. 幽门螺杆菌感染与慢性胃炎胃黏膜组织中 COX - 2、iNOS 表达的相关性研究. 世界华人消化杂志 2004; 12(4):902-906

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/902.asp>

0 引言

COX-2 和 iNOS 为诱导型酶, 其表达与胃肠道肿瘤发生密切相关^[1-7]. 业已明确 *H pylori* 感染是慢性胃炎的重要致病因子, 是胃癌发生的重要始发因素^[8-15], 但其致癌机制尚不清楚. 为此, 我们比较 COX-2 和 iNOS 在 *H pylori* 相关性胃炎和正常胃黏膜中的表达情况及 COX-2 和 iNOS 与胃上皮细胞凋亡和增生的关系, 以探讨 *H pylori* 可能的致癌机制.

1 材料和方法

1.1 材料 我院 2000-12/2001-04 因上腹不适就诊患者

43例, 其中经胃镜及病理检查确诊为慢性浅表性胃炎22例(男9例, 女13例, 年龄 46 ± 13 岁), 采用快速尿素酶试验和组织学 Giemsa 染色检测 H pylori 为阳性; 另 H pylori 阴性和胃黏膜正常患者21例(男8例, 女13例, 年龄 38 ± 13 岁)作为对照。凡有以下情况之一者除外: 近1mo 内接受过抗 H pylori 治疗、使用过影响 H pylori 的药物、使用过 NSAID 或激素以及伴有其他系统严重疾病。每例于胃窦部取4块黏膜组织, 其中2块迅速放入液氮, 另2块固定于40 g/L 中性甲醛。

1.2 方法 采用常规 SP 法进行免疫组织化学染色。一抗为兔抗人 COX-1 和 COX-2 多克隆抗体(购自美国 Santa Cruz 公司), iNOS 兔抗人多克隆抗体(购自武汉博士德公司)。以食管壁平滑肌细胞的棕黄色着色为阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照, 结果判定采用半定量积分法^[16]。RT-PCR 检测胃黏膜组织 COX-1、COX-2 和 iNOS mRNA 表达。采用经典总 RNA 抽提试剂盒(上海生工)提取胃窦黏膜组织中的总 RNA。RT-PCR 采用 Gibco 公司一步法试剂盒。反应体系 50 μL 包括 2 × 反应混合物 25 μL, 总 RNA 1 μg, 上下游引物(10 pM)各 1 μL、RT/PLTINUM Taq 酶 1 μL, 加 DEPC 处理的去离子水到 50 μL。PCR 引物为: COX-1 5' -GCAACACTGGAACATGGCTA-3' F, 5' -ACGCCACCATTCTGTCTTG-3' R(517 bp)。COX-2 5' -TTGCTGTTCCCACCCATGTC-3' F, 5' -ATGCGTGAA GTGCTGGGCAA-3' R(520 bp)。iNOS 5' -ACCACTCGG CTGCAGAACCC-3' F, 5' -CATTGCCAACGTACTGG TC-3' R(480 bp)。 β -actin 5' -CAAGAGATGGCCACGG CTGCT-3' F, 5' -TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA-3' R(275 bp)。94 °C 变性, 55 °C 退火, 72 °C 延伸, 扩增共 30 个循环。取 PCR 产物, 在含有溴化乙锭的 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下照像, 应用激光扫描仪进行密度扫描, β -actin 作为内参照。胃黏膜上皮凋亡细胞的原位检测试剂盒(*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD)为德国宝灵曼公司产品。染色步骤: 按试剂盒说明书进行, 以 PBS 替代 TUNEL 反应液作阴性对照。每张切片计算 1000 个以上上皮细胞的凋亡细胞(分布于 5 个以上不同视野), 以 100 个细胞中阳性细胞数来表示细胞凋亡指数(AI, %)^[17]。胃黏膜上皮细胞增生的检测采用免疫组化 LSAB 法, 鼠抗人 PCNA 单克隆抗体和过氧化酶标记的链霉卵白素(SP)染色试剂盒购自 Dako 公司, 操作按说明书进行。PCNA 阳性的细胞核有棕褐色颗粒, 每张切片计算 1000 个以上上皮细胞的 PCNA 阳性细胞数(分布于 5 个以上不同视野), 以 100 个细胞中阳性细胞数来表示细胞增生指数(PCNA-LI, %)^[17]。

统计学处理 对两样本均数的比较采用 t 检验; 对两样本率的比较采用精确概率法; 对等级资料及未知分布的计量资料采用秩和检验; 对双变量正态分布资料采用直线相关分析, 未知分布资料采用 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 胃黏膜 COX-1、COX-2 和 iNOS 蛋白的表达 H pylori 感染组及正常组胃黏膜固有层细胞、腺上皮细胞均有 COX-1 表达, 且无统计学差异。COX-2 阳性细胞呈棕黄色颗粒状, 主要位于胃窦上皮细胞, 固有层单核细胞和中性粒细胞胞质, 部分切片中巨噬细胞亦有染色(图 1), 与正常组相比(14.3%, 3/21), H pylori 感染组 COX-2 阳性表达率(68.2%, 15/22)明显升高($P < 0.01$)。iNOS 主要表达在上皮细胞, 固有层炎性细胞, 胞质呈棕黄色颗粒状。H pylori 感染组 iNOS 阳性细胞表达率为 59.1%(13/22), 而正常组仅 1 例呈低表达(4.8%, 1/21), 两组间有统计学差异($P < 0.01$)。

2.2 胃黏膜 COX-1、COX-2 和 iNOS mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示 H pylori 感染组与正常组均有 COX-1 mRNA 表达, 两组间无统计学差异。H pylori 感染组 95.5%(21/22)有 COX-2 mRNA 表达, 中位数为 1.13, 正常组中位数为 0.02, 二者之间有统计学差异。H pylori 感染组 86.4%(19/22)有 iNOS mRNA 表达, 中位数为 0.56, 正常组中位数为 0.01, 二者之间有显著性差异($P < 0.01$, 图 2)。RT-PCR 与免疫组化法检测 H pylori 感染组 COX-2 和 iNOS 表达结果显示两种方法存在统计学差异($P < 0.05$), 即 RT-PCR 较免疫组化法更敏感(表 1, 2)。

2.3 胃上皮细胞凋亡和增生 PCNA 阳性细胞主要分布于胃小凹底部和腺体, H pylori 感染组增生指数为 17.3 ± 10.9 , 与正常组(11.5 ± 7.4)比较有统计学差异($P < 0.05$)。

凋亡细胞主要位于胃黏膜表面及腺体, H pylori 感染组凋亡指数为 11.9 ± 6.8 , 与正常组(5.3 ± 3.5)相比差异显著($P < 0.05$)。胃上皮细胞增生、凋亡与 COX-1 表达无相关性($r = 0.138, 0.102, P > 0.05$), 而与 COX-2, iNOS 表达呈正相关($r = 0.716, 0.603, P < 0.01; r = 0.665, 0.572, P < 0.01$)。

表 1 RT-PCR 和免疫组化法检测 Hp 感染组 COX-2 表达结果

	免疫组化法		合计
	+	-	
RT-P	+	15	6
CR	-	0	1
合计		15	7
			22

RT-PCR 与免疫组化法比较 $P < 0.05$, 两种方法检测结果有差异。RT-PCR 较免疫组化法更敏感。

表 2 RT-PCR 和免疫组化法检测 Hp 感染组 iNOS 表达结果

	免疫组化法		合计
	+	-	
RT-PCR	+	13	6
	-	0	3
合计		13	9
			22

RT-PCR 与免疫组化法比较 $P < 0.05$, 两种方法检测结果有差异。RT-PCR 较免疫组化法更敏感。

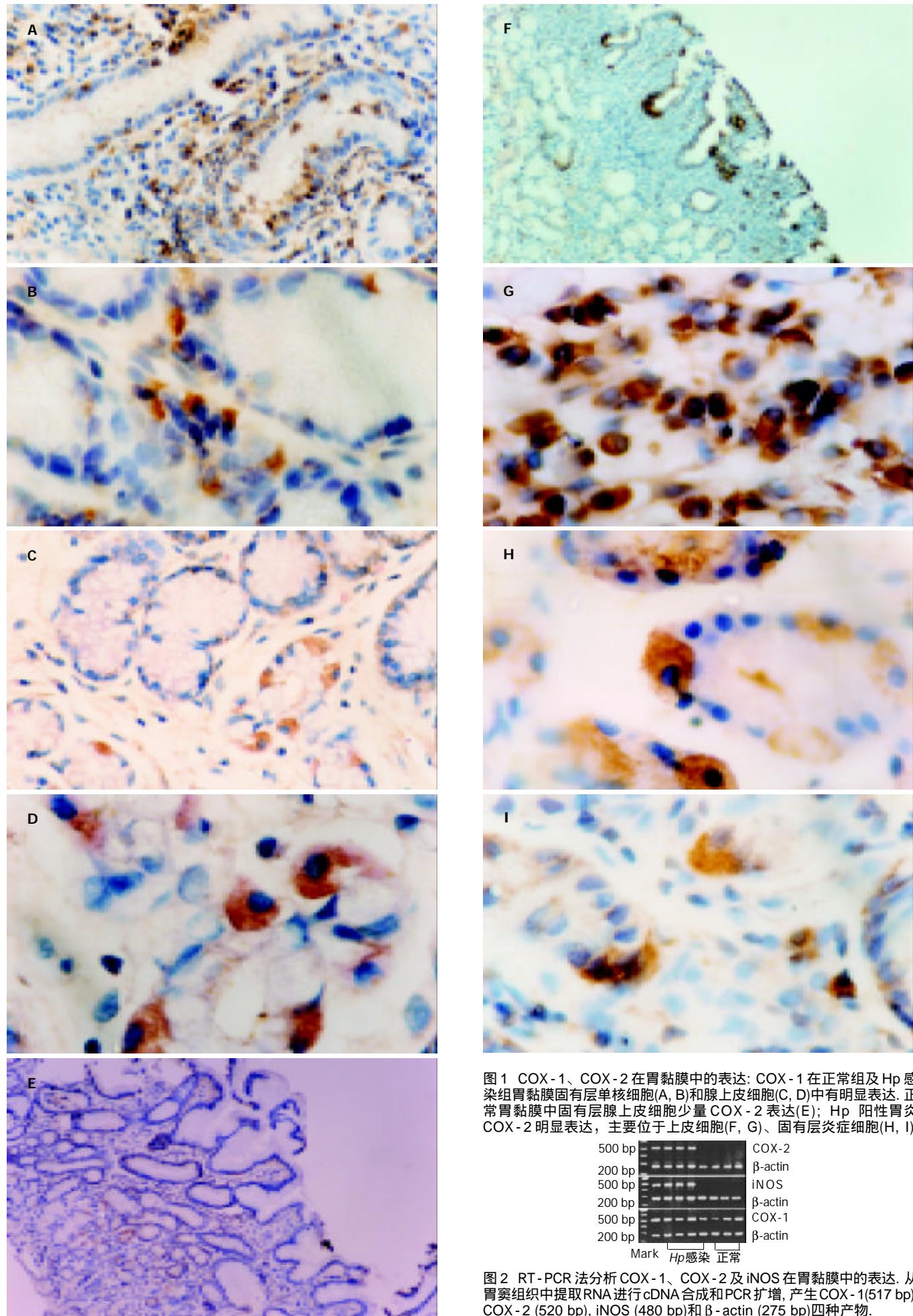


图1 COX-1、COX-2在胃黏膜中的表达: COX-1在正常组及Hp感染组胃黏膜固有层单核细胞(A, B)和腺上皮细胞(C, D)中有明显表达。正常胃黏膜中固有层腺上皮细胞少量COX-2表达(E); Hp阳性胃炎COX-2明显表达, 主要位于上皮细胞(F, G)、固有层炎症细胞(H, I)。

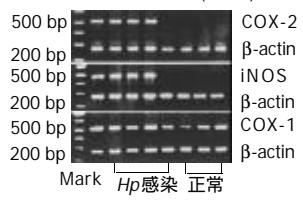


图2 RT-PCR法分析COX-1、COX-2及iNOS在胃黏膜中的表达。从胃窦组织中提取RNA进行cDNA合成和PCR扩增, 产生COX-1(517 bp), COX-2(520 bp), iNOS(480 bp)和β-actin(275 bp)四种产物。

3 讨论

幽门螺杆菌感染与人类胃癌发生、发展的关系早已为人们所熟知, 不过 *H pylori* 感染诱发胃癌的确切机制不明。研究发现 *H pylori* 培养滤液可诱导人胃癌上皮细胞 COX-2 mRNA 表达的显著上调, 与 *H pylori* 相关性胃癌有密切关系^[18]。本结果显示, *H pylori* 相关性胃炎胃黏膜组织 COX-2 和 iNOS mRNA 水平明显升高, 提示 *H pylori* 感染与 COX-2 和 iNOS mRNA 表达关系密切, *H pylori* 感染可增强胃黏膜中 COX-2 和 iNOS 的表达, 这与国内外报道一致^[19-20], 表明 COX-2, iNOS 表达在 *H pylori* 相关性胃病包括胃炎和胃癌发生中起作用。*H pylori* 感染可能通过激活 NF-κB 因子, 进而促进 COX-2, iNOS mRNA 的表达^[21]。RT-PCR 和免疫组化技术是检测细胞因子在组织或细胞中的表达常用的两种方法, 与免疫组化法相比, RT-PCR 技术具有快速、灵敏、准确的优点^[22]。

近年来研究表明, COX-2 和 iNOS 不仅是启动炎症反应的关键酶, 而且还通过促进细胞增生、抑制细胞凋亡、促进肿瘤血管形成, 增加肿瘤细胞侵袭、转移的潜能等机制参与各种肿瘤的发生、发展过程^[23-26]。已经证实, 在人胃癌组织中 COX-2 和 iNOS 表达明显上调^[27-28], COX-2 高表达能增加胃癌患者淋巴结转移的危险性^[29]。动物实验表明 COX-2 抑制剂能诱导裸鼠细胞凋亡, 从而抑制胃癌的生长^[30], 这些结果均提示 COX-2 和 iNOS 过度表达与胃癌有关。本研究比较了 COX-2, iNOS mRNA 表达与增生及凋亡的相关性, 提示在慢性胃炎阶段, 胃黏膜上皮细胞增生指数、凋亡指数与 COX-2 和 iNOS mRNA 表达呈正相关, 说明 COX-2 和 iNOS mRNA 的表达与胃黏膜上皮细胞增生、凋亡关系密切, 使细胞增生和凋亡失衡, 从而促进肿瘤的发生^[31]。我们既往的研究及国内外大量研究均证实, *H pylori* 感染可促进胃黏膜上皮细胞的增生及凋亡^[32-33]。本研究另一结果亦显示 *H pylori* 感染组增生与凋亡均明显高于对照组, 然而导致增生及凋亡的内在机制仍不明确。总之, *H pylori* 感染可上调 COX-2 和 iNOS 表达, 诱导胃黏膜上皮细胞增生, 导致的 COX-2 和 iNOS 表达程度与胃黏膜上皮细胞增生、凋亡呈正相关, 因此推测 COX-2 和 iNOS 基因的表达参与了 *H pylori* 相关性胃炎向癌前病变和胃癌的演变过程。*H pylori* 感染的胃黏膜 COX-2 和 iNOS 高度表达, 尤其是他在胃恶性肿瘤中的出现和在大肠癌的形成过程中的重要特征^[34-35], 提示 COX-2 和 iNOS 的诱导可能是 *H pylori* 潜在致癌的重要机制。

4 参考文献

- 1 Lagorce C, Paraf F, Vidaud D, Couvelard A, Wendum D, Martin A, Flejou JF. Cyclooxygenase-2 is expressed frequently and early in Barrett's oesophagus and associated adenocarcinoma. *Histopathology* 2003;42:457-465
- 2 Kong G, Kim EK, Kim WS, Lee KT, Lee YW, Lee JK, Paik SW, Rhee JC. Role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:914-921
- 3 Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;121:1339-1347
- 4 Joo YE, Kim HS, Min SW, Lee WS, Park CH, Park CS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ. Expression of cyclooxygenase-2 protein in colorectal carcinomas. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;31:147-154
- 5 Xue YW, Zhang QF, Zhu ZB, Wang Q, Fu SB. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:250-253
- 6 Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Schiavone N, Vannacci A, Nistri S, Sardi I, Baroni G, Marzocca C, Perna F, Mazzanti R, Bechi P, Masini E. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2003;162:793-801
- 7 Wu AW, Gu J, Ji JF, Li ZF, Xu GW. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1990-1994
- 8 Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ* 1998; 316:1507-1510
- 9 Vandeplassche Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 10 Takeuchi K, Ohno Y, Tsuzuki Y, Ando T, Sekihara M, Hara T, Kuwano H. *Helicobacter pylori* infection and early gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:321-324
- 11 Ohkuma K, Okada M, Murayama H, Seo M, Maeda K, Kanda M, Okabe N. Association of *Helicobacter pylori* infection with atrophic gastritis and intestinal metaplasia. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1105-1112
- 12 Zhuang XQ, Lin SR. Research of *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions. *World J Gastroenterol* 2000;6: 428-429
- 13 Wu AH, Crabtree JE, Bernstein L, Hawtin P, Cockburn M, Tseng CC, Forman D. Role of *Helicobacter pylori* CagA+strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus. *Int J Cancer* 2003;103:815-821
- 14 Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003;56:1
- 15 Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Changde County, Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:374-376
- 16 Chan FK, To KF, Ng YP, Lee TL, Cheng AS, Leung WK, Sung JJ. Expression and cellular localization of COX-1 and -2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:187-193
- 17 彭仲生, 梁湛聪, 谢礼雄, 王养梅. 幽门螺杆菌相关性胃病的细胞增生与凋亡的研究. 癌症 2000;19:575-578
- 18 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
- 19 Antos D, Enders G, Rieder G, Stolte M, Bayerdorffer E, Hatz RA. Inducible nitric oxide synthase expression before and after eradication of *Helicobacter pylori* in different forms of gastritis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;30:127-131
- 20 孙为豪, 俞谦, 欧希龙, 郭庆明, 俞婷, 毛翠华, 钱诚. 幽门螺杆菌感染诱导胃黏膜环氧化酶-2表达. 中华消化内镜杂志 2002;19:18-20
- 21 Zhang X, Ruiz B, Correa P, Miller MJ. Cellular dissociation of NF-κappaB and inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med* 2000;29:730-735
- 22 Lahr G. RT-PCR from archival single cells is a suitable method to analyze specific gene expression. *Lab Invest* 2000;80:1477-1479
- 23 Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:674-677
- 24 Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Tang ZH, Wang JH. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:1302-1306

- 25 Xiong B, Sun TJ, Yuan HY, Hu MB, Hu WD, Cheng FL. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1237-1240
- 26 Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-3340
- 27 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
- 28 罗玉琴, 吴开春, 孙安华, 潘伯荣, 张学庸, 樊代明. 浅表性胃炎、胃黏膜不典型增生及胃癌组织中COX-1、COX-2、iNOS表达的意义. 中华消化杂志 2000;20:223-226
- 29 Murata H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sawaoka H, Kimura Y, Shiozaki H, Hori M. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999;94:451-455
- 30 Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Gunawan ES, Takei Y, Nagano K, Hori M. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol* 1998;274(6 Pt 1):G1061-1067
- 31 Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:3-21
- 32 Konturek PC, Kania J, Konturek JW, Nikiforuk A, Konturek SJ, Hahn EG. *H pylori* infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR gamma and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. *Med Sci Monit* 2003;9:SR53-66
- 33 Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996; 38:498-501
- 34 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 1998;69:168-172
- 35 Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-3789

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

• 消息 •

如何订购《世界胃肠病学杂志(英文版)》?

1 如何订购2004年《世界胃肠病学杂志(英文版)》?

答: 《世界胃肠病学杂志(英文版)》由北京报刊发行局公开发行, 邮发代号82-261。订阅2004年《世界胃肠病学杂志(英文版)》, 请在邮局办理订阅事宜。

2 2004年《世界胃肠病学杂志(英文版)》的订阅价格是多少?

答: 《世界胃肠病学杂志(英文版)》2004年由月刊改为半月刊, 单价50.00元/期, 全年24期, 共计1200.00元(含邮资)。

3 如错过邮局征订时间, 如何补订《世界胃肠病学杂志(英文版)》?

如错过邮局征订时间, 您可直接向编辑部联系办理邮购、补订手续。

4 购买历年《世界胃肠病学杂志(英文版)》应该如何办理?

答: 《世界胃肠病学杂志(英文版)》自1995年创刊至2002年, 存有少量的精装合订本。如您需订购, 请参阅下表, 选择您所需要的《世界胃肠病学杂志(英文版)》合订本。

5 如何办理汇款手续?

答: 请您按以下详细地址办理邮局汇款:

邮政编码: 100023

收款人地址: 北京市2345信箱

收款人姓名: 世界胃肠病学杂志社发行部

电话: 010-85381892

附:《世界胃肠病学杂志》订单

订书目录	期数	单价	订数	合计金额
《中国新消化病学杂志(英文版)》1996年合订本	1-4期	288.00元/套		
《中国新消化病学杂志(英文版)》1997年合订本	1-4期	288.00元/套		
《世界胃肠病学杂志(英文版)》1998年合订本	1-6期	338.00元/套		
《世界胃肠病学杂志(英文版)》1999年合订本	1-6期	338.00元/套		
《世界胃肠病学杂志(英文版)》2000年合订本	1-6期	338.00元/套		
《世界胃肠病学杂志(英文版)》2001年合订本	1-6期	338.00元/套		
《世界胃肠病学杂志(英文版)》2002年合订本	1-6期	338.00元/套		
《世界胃肠病学杂志(英文版)》2003年合订本	1-12期	676.00元/套		
《世界胃肠病学杂志(英文版)》2004年(半月刊)	1-24期	1200.00元/套		

6 订刊时我还需注意什么?

答: 特别要提醒的是, 请将您所需订购年份的期刊及数量在汇款单附言栏写清楚, 并将您的邮政编码、收件人地址、收件人姓名工整、清晰书写清楚, 以便我部及时正确的邮寄给您。

颈交感神经干离断对应激大鼠ET - 1及胃黏膜血流量的影响

赵广翊, 孟凌新, 陈延英, 崔健君

赵广翊, 孟凌新, 崔健君, 中国医科大学附属第二医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110004
陈延英, 中国人民解放军空军总医院麻醉科 北京市 100036
赵广翊, 男, 1972-09-19生, 辽宁省辽阳市人, 满族。2002年中国医科大学硕士研究生毕业, 讲师。主要从事临床麻醉及危重症的监护治疗。
项目负责人: 赵广翊, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院麻醉科。zhaogy_sy@sina.com
电话 024-83955041 传真: 024-23891793
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-01-12

Effects of transections of cervical sympathetic trunk on gastric mucosal blood flow and ET-1 in water immersion restrain rats

Guang-Yi Zhao, Ling-Xin Meng, Yan-Ying Chen, Jian-Jun Cui

Guang-Yi Zhao, Ling-Xin Meng, Jian-Jun Cui, Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Yan-Ying Chen, Department of Anesthesiology, General Hospital of Chinese Air-Force, Beijing 100036, China
Correspondence to: Guang-Yi Zhao, Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhaogy_sy@sina.com
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-01-12

Abstract

AIM: To investigate the effect of transections of the cervical sympathetic trunk (TCST) on the gastric mucosal blood flow (GMBF) in water immersion restrain rats.

METHODS: A total of 30 male Sprague-Dawleys rats were randomly allocated into three groups: control group (Group I), water immersion restrain group (Group II) and TCST followed by water immersion restrain (Group III). Superior cervical ganglion were exposed and splited, but not cut off in Group I and Group II. In Group III, we cut off and ligated the cervical sympathetic nerve trunk below 3 mm of superior cervical ganglion. Then the rats of Group II and Group III were vertically immersed into water ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Six hours later, GMBF were measured by laser Doppler blood stream meter. And we evaluated the gastric mucosal ulcer index (UI) according to Guth score.

RESULTS: There was mucosal bleeding and erosion in Group II, Group III was obviously relieved as compared with Group II. The GMBF was 68.9 ± 12.7 ; 130.0 ± 14.5 (PU) in Group II and Group III respectively, while the UI was 50.1 ± 12.3 ; 26.6 ± 9.4 . ($P < 0.01$). The GMBF and UI was significant negative correlation ($\gamma = -0.847$, $P < 0.01$). ET-1 in plasma and gastric mucosa in Group II were higher than those in Group I. ET-1 in plasma in Group III were higher than that in Group I, while they were lower than that in Group II.

ET-1 in plasma had a moderate negative-correlation with GMBF.

CONCLUSION: Increased the GMBF due to TCST may contribute to attenuation in the lesion of gastric muscosa in water immersion restrain rats, and it may have something to do with ET-1 in plasma and gastric mucosa.

Zhao GY, Meng LX, Chen YY, Cui JJ. Effects of transections of cervical sympathetic trunk on gastric mucosal blood flow and ET-1 in water immersion restrain rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):907-910

摘要

目的: 研究颈交感神经干离断对浸水大鼠胃黏膜血流量的影响。

方法: 30只♂SD大鼠随机分为3组($n=10$) I组为正常对照组, II组为浸水对照组; III组为颈交感神经干离断后浸水组。I、II组只将颈交感神经干暴露、分离, 不离断; III组离断颈交感神经干并将断端结扎。将II、III组大鼠垂直浸水(水温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$)至剑突水平, 6 h后取出, 测定各组胃黏膜血流量(GMBF), 评价黏膜损伤程度。放免法测定血浆及胃黏膜ET-1含量。

结果: II组胃黏膜见出血及糜烂。III组黏膜损伤程度明显轻于II组。III组与II组比较GMBF明显升高, 二者分别为 130.0 ± 14.5 ; 68.9 ± 12.7 ($P < 0.01$)。II组和III组的溃疡指数(UI)分别为 50.1 ± 12.3 ; 26.6 ± 9.4 差异极显著($P < 0.01$)。II组和III组的GMBF值与UI呈高度负相关, $\gamma = -0.847$, $P < 0.001$ 。II组大鼠的血浆及胃黏膜的ET-1值明显高于I组, $P < 0.01$; III组的血浆ET-1值也明显高于I组但与II组比较明显减少, $P < 0.01$ 。III组大鼠的胃黏膜组织的ET-1值明显高于I组, $P < 0.01$, 但与II组比较无显著差异。

结论: 颈交感干离断可增加浸水应激大鼠胃黏膜血流量, 对胃黏膜损伤有保护作用。血浆及胃黏膜ET-1参与了颈交感神经干离断对胃黏膜保护的作用。

赵广翊, 孟凌新, 陈延英, 崔健君. 颈交感神经干离断对应激大鼠ET-1及胃黏膜血流量的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(4):907-910

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/907.asp>

0 引言

应激性溃疡是指机体在各类严重创伤、危重疾病等严重应激状态下, 发生的急性消化道糜烂、溃疡等病

变，可引起消化道出血、穿孔^[1]。其损伤机制涉及到胃的运动、分泌、血流、胃肠激素、氧自由基及细胞凋亡等多种因素^[2-10]，但近年来研究表明，局部胃黏膜血流量(GMBF)减少是其主要的病理生理过程^[11-15]。星状神经节阻滞作为一种疼痛治疗方法，在国内外已被广泛应用。星状神经节切除可减弱应激性溃疡的严重程度已被实验证实^[16]。但有关其内在的作用机制尚未有文献阐明。内皮素1(ET-1)是一种主要由血管内皮细胞分泌的缩血管生物活性多肽^[12, 17]。研究表明，内源性ET-1通过强烈的缩血管作用，对胃黏膜的损伤作用最强，被认为是胃黏膜损伤的始动因子^[14, 17]。我们以经典的浸水应激造成大鼠急性胃黏膜损伤，观察颈交感干离断对应激大鼠胃黏膜血流量、血浆及胃黏膜ET-1含量的变化，探讨星状神经节阻滞对胃黏膜血流量的影响及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley 大鼠(中国医科大学实验动物中心提供)，PF3型激光多普勒血流仪(Perimed, 瑞典)，S-500P紫外光视光连续分光光度计(法国)，内皮素-1试剂盒(北京东亚)。

1.2 方法 选用健康200-250 g ♂ SD大鼠30只，禁食12 h，禁水1 h后随机分为3组：I组(正常对照组，n=10)；II组(应激对照组，n=10)；III组(颈交感神经干离断后应激组n=10)。模型的制备：25 g/L 戊巴比妥钠40 mg/kg ip将大鼠麻醉。在显微镜下于颈总动脉分叉处的背侧面找到颈上神经节，I, II组只将颈交感神经干暴露、分离，不离断；III组距其下3 mm处离断颈交感神经干并将断端结扎，缝合切口。以上大鼠均于术后禁食(不禁水)24 h后乙醚轻度麻醉，II, III组大鼠束缚四肢于自制木板上，待其清醒后将动物浸水(水温23 ± 1 °C)至剑突水平，浸水应激至6 h取出。

胃黏膜血流量的测定 用25 g/L 戊巴比妥钠ip再次麻醉动物，于剑突下沿正中线剖腹并游离出胃，于幽门前壁少血管处切一5 mm小口。插入PF3型激光多普勒血流仪(测量单位为PU)探头分别于胃窦、胃体部的大小弯处4点测GMBF，取其平均值。抽取腹主动脉血2 mL注入含100 g/L EDTA二钠30 μL和抑肽酶40 μL的试管中，混匀后，4 °C，3 000 r/min离心10 min，分离血浆。置-20 °C保存。测定时室温复融，再次4 °C，3 000 rpm离心5 min，取上清测定。放免法测定血浆ET-1浓度。切除全胃，沿胃大弯切开并翻转胃黏膜使之朝外，经生理盐水漂洗后，按Guth (Gastroenterology 1979;76:88-93)标准评定损伤指数(UI)：点状糜烂1分，小于1 mm 2分，1-2 mm 3分，3-4 mm 4分，大于5 mm 5分。剪取1小块峭下5 mm的胃体上部黏膜，常规石蜡切片，HE染色后，进行组织学观察。剥取腺胃部的胃黏膜组织，滤纸吸净水分液氮冷冻后，转入-70 °C深低温冰箱储存备测ET-1。

统计学处理 应用SPSS V10.0美国SPSS公司(2000年)专业统计软件进行数据处理，数据均以mean±SD表示，两样本间均数比较用t检验，两变量间关系用直线相关分析。P < 0.05 统计学差异显著。

2 结果

在I组中有1只大鼠因戊巴比妥钠ip再次麻醉动物时死于呼吸抑制，被排除。II, III组动物实验过程中无异常经过。肉眼观察I组胃黏膜表面光滑，未见糜烂及溃疡。II, III组大鼠胃黏膜损伤主要分布于腺胃部，表现为点状出血性溃疡和条索状出血性溃疡，II组中少数表现为黏膜水肿及糜烂。III组溃疡指数为26.6 ± 9.4，II组溃疡指数为49.1 ± 13.9，差异显著(P < 0.01, 表1)，光镜下I组胃黏膜表面光滑有轻度渗出改变(图1)。II组可见黏膜表面上皮坏死、脱落形成表浅糜烂，并有渗出及片状出血改变，腺体分泌亢进，间质水肿(图2)。III组黏膜损伤较II组程度减轻，表面可见轻度上皮坏死脱落，形成较浅糜烂，有的表面仍光滑未见上皮细胞坏死，并见点状出血(图3)。

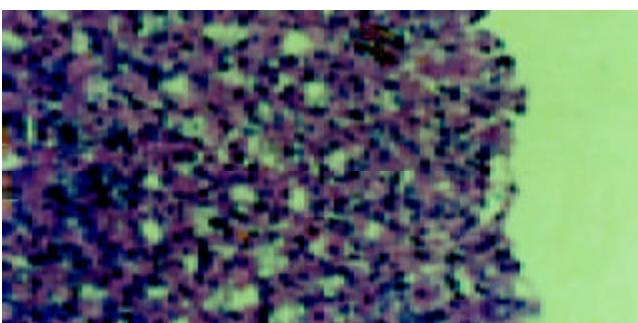


图1 I组黏膜表面光滑 HE×200.

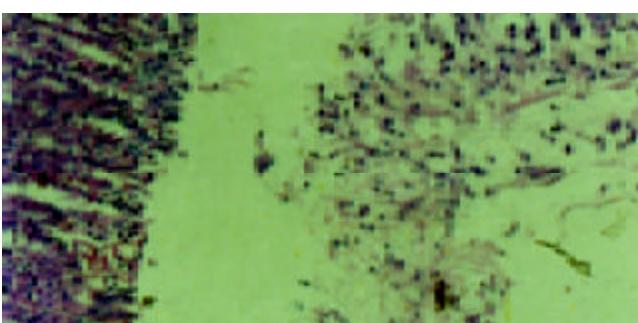


图2 II组黏膜表面上皮坏死、脱落形成糜烂、腺体分泌亢进 HE×200.



图3 III组轻度上皮坏死脱落形成较浅糜烂，点状出血 HE×200.

II 组大鼠的血浆的 ET-1 值明显高于 I 组($P < 0.01$); III 组的血浆 ET-1 值也明显高于 I 组但与 II 组比较明显减少($P < 0.01$)。II 组大鼠的胃黏膜组织的 ET-1 值明显高于 I 组($P < 0.01$); III 组胃黏膜组织的 ET-1 值也明显高于 I 组, 但与 II 组比较无显著差异。三组血浆 ET-1 与 GMBF 呈中度负相关($\gamma = -0.638$, $P < 0.01$)。血浆 ET-1 与胃黏膜 ET-1 呈中度正相关($\gamma = 0.589$, $P < 0.01$)。

表 1 浸水大鼠 GMBF、UI 及 ET-1 的变化

分组	n	GMBF(PU)	UI	μ ET(ng/L)	m ET(ng/g/tissue)
I	9	211.2 ± 8.8	-	159.7 ± 56.3	489.8 ± 184.8
II	10	68.9 ± 12.7 ^a	50.1 ± 12.3	269.1 ± 34.0 ^a	856.3 ± 144.1 ^a
III	10	130.0 ± 14.5 ^{ab}	26.6 ± 9.4 ^b	211.2 ± 33.3 ^{ab}	716.7 ± 95.0 ^a

^aP < 0.01 vs I 组; ^bP < 0.01 vs II 组。

3 讨论

胃黏膜微循环障碍是应激性溃疡发生的主要的病理生理过程。胃黏膜血流量的调节机制十分复杂, 其中 ET 起着重要作用。星状神经节阻滞(SGB)是一种临幊上常用的神经阻滞技术, 其不仅对其支配范围内的疾病有治疗作用, 近来其治疗范围已涉及到机体神经、内分泌、免疫系统的某些疾病^[18]。研究表明, 中枢神经系统中主要是下丘脑和延髓对 GMBF 有影响, 下丘脑对 GMBF 的影响可能是由去甲肾上腺素介导的。交感神经节后纤维分布于胃血管壁周围, 主要通过释放去甲肾上腺素使 GMBF 减少, 导致 SU 的发生^[12], 此时行 SGB 其作用在于阻断、调理和改善了这种病理生理过程。峯田昌之应用超声多普勒观察到: SGB 后人体腹腔动脉、肠系膜上动脉血流量增加^[19]。大鼠颈交感神经干离断可以模拟人类的星状神经节阻滞, 鼠 TCST 后, 表现为持续的眼裂狭小等这与人的 SGB 表现的上睑下垂相一致; 长期反复的 SGB 可产生与经 TCST 同样的结果。切断颈上神经节前纤维(颈交感神经干), 而保存颈上神经节可以保证节后纤维不变性, 是模拟人类 SGB 的较好的模型^[20]。下丘脑-垂体-肾上腺轴及颈交感神经干-下颌下腺轴在神经-内分泌-免疫系统的相互作用中起着重要作用。啮齿类动物的颈交感神经干-下颌下腺神经内分泌轴在应激情况下起着重要作用, 其各种多肽的释放是受交感神经控制的^[21]。本结果表明, 大鼠应激后胃黏膜血流量减少, 出现急性胃黏膜损伤。而行颈交感神经干离断后, 应激大鼠胃黏膜血流量的下降较单纯应激组明显减少, 溃疡指数明显减少, 说明颈交感神经干离断可增加胃黏膜血流, 对胃黏膜的损伤有保护作用。其原因与颈交感神经干离断降低胃部交感神经功能, 调理下丘脑^[22], 使机体的植物神经系统, 内分泌及免疫等功能保持正常, 维持恒常性机能活化有关。

ET 是血管内皮细胞分泌的由 21 个氨基酸残基构成的短链多肽, 是具有强大收缩血管作用的血管活性物

质, ET 增加通过收缩血管及增加渗出、减少循环血量等途径来降低胃黏膜血流进而引起胃黏膜损伤。李兆申 et al^[23]研究发现, 在冷束缚应激诱发大鼠急性胃黏膜损伤的过程中, 内源性 ET 水平异常升高, 并通过其强烈的缩血管作用引起 GMBF 显著下降, 参与应激性溃疡的病理生理过程, 造成胃黏膜缺血、糜烂、溃疡损伤。而特异性 ET-1 抗体及 ET-1 受体拮抗剂可有效地改善胃黏膜组织血液灌流, 减轻胃黏膜组织损伤程度, 起到保护胃黏膜组织的作用^[24-26]。我们发现浸水应激时大鼠血浆及胃黏膜组织 ET-1 明显增加, 且血浆 ET-1 与 GMBF 呈负相关, 相应的溃疡指数增加。说明 ET-1 在应激性溃疡的发生中起着重要作用。而行颈交感神经干离断后, 应激大鼠的血浆 ET-1 明显减少, 提示颈交感神经干离断保护胃黏膜与降低血中的 ET-1 有关。至于应激大鼠胃黏膜组织 ET-1 含量异常增高, 可能为应激状态下胃黏膜组织 ET-1 mRNA 表达异常增加, 导致 ET-1 大量合成分泌的缘故, 段义民 et al^[27]通过放免组化法研究, 发现大鼠胃黏膜肌层血管内皮细胞、平滑肌细胞及胃黏膜上皮细胞的胞质中存在 ET-1 阳性物质, 且应激后 ET-1 阳性细胞表达数量与强度较正常对照组明显增加。提示应激后胃黏膜组织局部可大量增加 ET-1 的合成、分泌, 从而参与 SU 的病理生理过程。这也可能是两组应激大鼠间胃黏膜组织 ET-1 含量无显著差别的原因。

总之, 尽管动物交感神经节的解剖位置与人类有所不同, 然而, 我们的研究结果表明: 颈交感干离断可增加浸水应激大鼠胃黏膜血流量, 对胃黏膜损伤有保护作用。大鼠浸水应激时血浆与胃黏膜组织 ET-1 均升高。颈交感神经干离断对胃黏膜损伤保护作用的机制可能与其调节血浆及胃黏膜 ET-1 水平有关。临幊上, 早期行星状神经节阻滞是否可以降低应激性溃疡的发生率并减弱其严重程度尚待进一步研究。

4 参考文献

- 萧树东, 许国铭, 李兆申, 黄莲庭, 孙永华, 卢亦成, 杨兴易, 湛先保, 赵继宗, 王集生. 应激性溃疡防治建议. 中华医学杂志 2002; 82:1000-1001
- 乐桥良, 文晓冬. 大鼠应激性溃疡中一氧化氮的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:815-816
- 雷银雪, 湛先保, 李兆申, 许国铭. 酸及抗酸剂在应激性溃疡中的作用. 华人消化杂志 1998;6:434-435
- Liu GS, Huang YX, Li SW, Pan BR, Wang X, Sun DY, Wang QL. Experimental study on mechanism and protection of stress ulcer produced by explosive noise. World J Gastroenterol 1998; 4:519-523
- Qui BS, Mei QB, Liu L, Tchou-Wong KM. Effects of nitric oxide on gastric ulceration induced by nicotine and cold-restraint stress. World J Gastroenterol 2004;10:594-597
- 陈国裕, 王志荣, 陈锡美. 热休克蛋白在胃黏膜保护中的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:969-971
- 刘婧, 李兆申, 许国铭, 宛新建, 王斐. 细胞凋亡和增生在大鼠应激性溃疡发病中的作用. 中华消化杂志 2003;23:595-598
- 张根葆, 钱大青, 孙俊, 秦兵, 徐玉兰. 银杏叶提取物对大鼠应激性溃疡的保护作用. 世界华人消化杂志 1999;7:869-871
- 张国锋, 张明敖, 陈易人, 汪良. 内皮素、一氧化氮在内毒素血症

- 大鼠胃黏膜损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):24
- 10 孙波, 李兆申. 非甾体类抗炎药胃黏膜损伤及预防实验研究. 世界华人消化杂志 2000;8:271-275
- 11 许冠荪, 孙勇, 王振玖, 张道芹, 顾新建. 电针对应激大鼠胃黏膜血流量及跨膜电位差的影响. 华人消化杂志 1998;6:4-6
- 12 罗燕军, 于皆平. 胃黏膜血流变化的影响因素. 世界华人消化杂志 2001;9:671-674
- 13 秦名, 黄欲新. 针刺对胃黏膜保护作用及其机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:456-457
- 14 杨琦, 秦名, 黄欲新, 王景杰, 赵保民, 高巍, 王庆莉. 电针对应激大鼠胃黏膜血流及血浆 ET, NO, CGPR 的影响. 第四军医大学学报 2001;22:800-803
- 15 Kawano S, Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):D1-6
- 16 小川秀道. 星状神经节阻滞的继发(中枢)性作用: 家兔胃溃疡模型的实验研究. 疼痛学杂志 1994;2:152-153
- 17 孙大勇, 黄裕新, 褚自宏, 高巍, 王庆莉, 刘国实. 电针对狗胃黏膜血流量的影响及与血浆胃肠激素的关系. 华人消化杂志 1998;6:936-938
- 18 张丽红, 张秉钧. 星状神经节阻滞的机制. 国外医学·麻醉学与复苏分册 2003;24:79-81
- 19 Masayuki M, Yoshinori T, Mitsuaki M. Change of blood flow in celiac artery and superior mesenteric artery after stellate ganglion block. *Masui* 1993;42:1808-1812
- 20 张丽红, 董有静, 崔健君. 颈交感神经干离断对妊娠大鼠及胎鼠的影响. 临床麻醉学杂志 2003;19:91-93
- 21 Rougeot C, Rosinski-Chupin I, Mathison R, Rougeon F. Rodent submandibular gland peptide hormones and other biologically active peptides. *Peptides* 2000;21:443-455
- 22 Adachi M, Otsuki M, Akatsu M, Tase C. The effects of heat stimulation and cold stress on the rats with cervical sympathectomy. *Masui* 2003;52:1293-1299
- 23 李兆申, 段义民, 湛先保, 许国铭. 内皮素在大鼠冷束缚应激性溃疡中的作用. 解放军医学杂志 1999;24:15-17
- 24 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭. 内皮素-1特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2003;11:990-993
- 25 Kuwahara K, Kitsukawa Y, Suzuki Y, Saito Y. Effects of several endothelin receptor antagonists on gastrointestinal transit of guinea pigs. *Dig Dis Sci* 2000;45:960-966
- 26 Krejci V, Hildebrand LB, Erni D, Sigurdsson GH. Endothelin receptor antagonist bosentan improves microcirculatory blood flow in splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med* 2003;31:203-210
- 27 段义民, 李兆申, 万维琴, 湛先保, 许国铭. 应激状态下胃黏膜组织内皮素-1水平及其免疫组化研究. 解放军医学杂志 2002;27:677-679

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。

超声图预测肝硬化患者食管静脉曲张程度

张晓红, 张宇锋, 宁方芹, 杨绍基

张晓红, 张宇锋, 杨绍基, 中山大学第三附属医院传染病科
广东省广州市 510630
宁方芹, 中山大学第三附属医院科研科 广东省广州市 510630
张晓红, 女, 1966-10-22 生, 黑龙江省肇东市人, 汉族。2001年中山大学
内科学硕士, 现任中山大学附属第三医院传染病科主治医师。从事医疗、教
学和研究工作, 并于2002年起在职博士生。
项目负责人: 张晓红, 510630, 广东省广州市, 中山大学第三附属医院传染
病科。zhangxhope@yahoo.com.cn
电话: 020-85516867-2027 传真: 020-85515940
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

Ultrasonographic prediction of esophageal varices in patients with liver cirrhosis

Xiao-Hong Zhang, Yu-Feng Zhang, Fang-Qin Ning, Shao-Ji Yang

Xiao-Hong Zhang, Yu-Feng Zhang, Shao-Ji Yang, Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Fang-Qin Ning, Department of Scientific Research, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Correspondence to: Xiao-Hong Zhang, Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. zhangxhope@yahoo.com.cn
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To study the value of ultrasonographic prediction of the esophageal varices in patients with liver cirrhosis.

METHODS: All 207 cases were examined by ultrasonography and endoscopy, and classified according to the Child-Pugh score. The valuable ultrasonographic variables were selected to form regression formulae to predict the esophageal varices degrees in patients with liver cirrhosis.

RESULTS: The esophageal varices degree was correlated with Child-Pugh classification ($r = 0.39$, $P < 0.01$). In class Child-Pugh C, about 93.3% of patients had over medium degree of esophageal varices. The Logistic formula ($P(B) = 1/[1+e^{(-19.554+9.295AS-2.757PUV-4.278GBBL+1.288PVD)}]$) might predict Child-Pugh B, and the diagnostic accuracy was 92.7%. The Logistic formula ($P(A) = 1/[1+e^{(-0.405+1.686PUV)}]$) might predict Child-Pugh A, and the diagnostic accuracy was 68.0%.

CONCLUSION: A majority of patients in class Child-Pugh C has over moderate esophageal varices, therefore all patients in this class should be examined by endoscopy. But patients in classes Child-Pugh B and A should be examined by ultrasonography first, and for high risk patients, endoscopy should be carried out.

Zhang XH, Zhang YF, Ning FQ, Yang SJ. Ultrasonographic prediction of esophageal varices in patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):911-913

摘要

目的: 筛选有意义的超声检查指标, 结合Child-Pugh分级对中度以上食管静脉曲张的肝硬化患者进行预测, 探讨超声检查预测肝硬化患者食管静脉曲张程度的价值。

方法: 将所有病例按Child-Pugh评分分级, 进行超声及胃镜检查, 用Spearman等级相关分析筛选出与食管静脉曲张程度相关并且对其判断贡献较大的指标, 建立Logistic回归方程。

结果: 食管静脉曲张程度与Child-Pugh分级呈正相关($r = 0.39$, $P < 0.01$), Child-Pugh C级患者中度以上食管静脉曲张占93.3%。对Child-Pugh A级患者, 判断食管静脉曲张程度贡献较大的指标是PUV, Logistic回归方程: $P(A) = 1/[1+e^{(-0.405+1.686PUV)}]$, 其判断准确率为68.0%, 敏感性为60.0%, 特异性为78.3%。对Child-Pugh B级患者判断食管静脉曲张程度贡献较大的指标有PV_D, PUV, GB_{BL}和AS, Logistic回归方程: $P(B) = 1/[1+e^{(-19.554+9.295AS-2.757PUV-4.278GBBL+1.288PVD)}]$, 其判断准确率为92.7%, 敏感性为96.8%, 特异性为80.0%。

结论: Child-Pugh C级肝硬化患者绝大部分有中度以上的食管静脉曲张; 以超声检查指标建立的回归方程对Child-Pugh A, B级患者中度以上的食管静脉曲张判断符合率较高, 可以用于肝硬化患者食管静脉曲张程度的预测。

张晓红, 张宇锋, 宁方芹, 杨绍基. 超声图预测肝硬化患者食管静脉曲张程度. 世界华人消化杂志 2004;12(4):911-913

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/911.asp>

0 引言

肝硬化在我国常见^[1-6], 而食管静脉曲张是肝硬化门静脉高压侧枝循环建立与开放的结果^[7-11], 是肝硬化致死性上消化道出血的主要原因^[12-16]。食管静脉曲张破裂出血发生率与其曲张程度呈正相关, 中度以上食管静脉曲张患者是上消化道出血的高危人群^[17-18]。胃镜是诊断及治疗食管静脉曲张的有效手段, 但具有侵入性, 给患者造成一定的痛苦, 且费用较高, 将其作为常规检查, 患者难以接受。B超检查可以从多个指标上间接反映门静脉高压的程度, 而且B超检查简便、无创、经济, 易普及^[19-22]。我们对不同Child-Pugh分级的肝硬化患者进行了B超及胃镜检查, 以找出通过B超检查指标预测食管静脉曲张程度的方法。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-08/2001-08在我科就诊的从未发生过消化道出血的肝硬化患者207例，符合2000年(西安)全国传染病与寄生虫病学术会议修订的诊断标准，年龄19-76(平均46.7岁)；男189例，女18例。其中乙型肝炎后肝硬化165例，丙型肝炎后肝硬化13例，乙型重叠丙型肝炎肝硬化6例，酒精性肝硬化20例，原发性胆汁性肝硬化3例。Child-Pugh A级64例，B级69例，C级74例。

1.2 方法 超声医师和胃镜医师均在未知彼此检查结果及Child-Pugh分级的情况下实施检查。入院后24 h内行常规体检，肝功能及凝血酶原活动度检查，按Child-Pugh评分分级。采用BioSound AU4彩色多普勒超声诊断仪，探头频率3.5-5.0 MHz，受检者禁食8 h以上，进行肝、胆囊、脾及腹水的检查，测量右肝最大斜径(RL_{OD})，脾长径(SP_L)，脾厚度(SP_T)及脾门到下缘角距离，计算脾指数(SPI)，脾指数=脾厚度×脾门到脾下缘角距离。门静脉内径(PV_D)、门静脉血流最大速度(PV_{max})和平均速度(PV_{mean})，脾静脉内径(SPV_D)，检查是否有脐旁静脉重新开放(PUV)，有脐旁静脉重新开放者，测量脐旁静脉内径及最大血流速度和平均血流速度。检查胆囊壁是否呈双边(GB_{BL})，并测量胆囊壁厚度(GB_T)。检测腹水量(AS)。在与超声检查同1wk内采用Olympus240型电子胃镜进行检查，食管静脉曲张程度分为3度，轻度：食管静脉向食管内隆起小于3 mm，外观呈条索状；中度：曲张静脉向腔内隆起3-6 mm；外观呈串珠状；重度：食管静脉向食管隆起大于6 mm，外观呈结节状或瘤状。

统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件进行Spearman

等级相关分析，及Logistic回归分析。计量资料均数的比较用t检验，计数资料率的比较用 χ^2 检验。

2 结果

胃镜检查207例，中度以上食管静脉曲张137例，轻度及无食管静脉曲张70例。经Spearman等级相关分析，筛选出与食管静脉曲张程度相关的B超检查指标(表1)，相关系数(r)的P值小于0.01的指标有 PV_D ， SP_L ， SPI ， SPV_D ，PUV， GB_{BL} ， GB_T ，P值等于0.01的指标有AS。Child-Pugh A级患者中度以上食管静脉曲张者占39.1%(25/64)，Child-Pugh B级患者中度以上食管静脉曲张者占60.9%(42/69)，Child-Pugh C级患者中度以上食管静脉曲张者占93.3%(69/74)。3组之间比较差异有显著性($P < 0.01$)。

与食管静脉曲张相关的8项指标Logistic回归分析显示，对Child-Pugh A级患者判断食管静脉曲张程度贡献较大的指标有PUV，Logistic回归方程： $P(A)=1/[1+e^{(-0.405+1.686PUV)}]$ ，其判断准确率为68.0%，敏感性为60.0%，特异性为78.3%。对Child-Pugh B级患者判断食管静脉曲张程度贡献较大的指标有 PV_D ，PUV， GB_{BL} 和AS，Logistic回归方程： $P(B)=1/[1+e^{(-19.554+9.295AS-2.757PUV-4.278GBBL+1.288PV_D)}]$ ，其判断准确率为92.7%，敏感性为96.8%，特异性为80.0%。以所得方程 $P(A)=1/[1+e^{(-0.405+1.686PUV)}]$ 分析另一组32例Child-Pugh A级肝硬化患者的资料：判断准确率为65.1%，敏感性为58.4%，特异性为74.3%。以所得方程 $P(B)=1/[1+e^{(-19.554+9.295AS-2.757PUV-4.278GBBL+1.288PV_D)}]$ ，分析另一组39例Child-Pugh B级肝硬化患者的资料：判断准确率为85.8%，敏感性为90.4%，特异性为76.2%。

表1 食管静脉曲张程度相关的B超检查指标(mean±SD, %)

食管静脉曲张	PV_D (mm)	GB_T (mm)	SP_L (mm)	SPI	SPV_D (mm)	PUV ^b		GB_{BL}^b		AS ^a			
						0	1	0	1	0	1	2	3
轻度及以下	12.3 ± 1.4	5.8 ± 2.3	131.9 ± 24.1	31.7 ± 13.4	8.1 ± 2.3	74.5	25.5	80.8	19.2	59.6	12.8	14.9	10.6
中度及以上	13.4 ± 2.0 ^b	7.4 ± 3.2 ^b	149.6 ± 29.0 ^b	39.9 ± 16.0 ^b	9.3 ± 2.7 ^b	41.6	58.4	46.1	53.9	33.7	36.0	15.7	13.5

^aP < 0.01, ^bP < 0.05

3 讨论

肝硬化Child-Pugh分级是国际上通用的肝硬化肝储备功能的分级标准，与肝硬化食管静脉曲张程度及上消化道出血关系密切^[23-24]，是严重食管静脉曲张的独立危险性指标^[17,25]。本组资料与此相符，食管静脉曲张程度与Child-Pugh分级呈正相关($r = 0.39$, $P < 0.01$)；A, B, C级患者中度以上食管静脉曲张分别占39.1%、60.9%和93.3%。经等级相关分析显示超声检测指标 PV_D ，PUV， GB_{BL} ， GB_T ， SP_L ， SPI ， SPV_D ，AS与食管静脉曲张程度呈正相关，其中， PV_D ，PUV， GB_{BL} 和AS对Child-Pugh B级患者判断食管静脉曲张程度贡献较大。肝硬化门静脉压力增高，直接导致门静脉扩张，并使肝和内脏微血管滤过增加，淋巴产生增加，加之

低蛋白血症使血浆胶体渗透压降低，导致腹水形成^[26]。胆囊壁增厚在肝硬化患者极为普遍。脐旁静脉重新开放是门静脉高压导致侧枝循环建立的结果，随着肝硬化程度的加重和门静脉高压的加剧脐旁静脉重开的比例增加，在Child-Pugh A, B, C级中分别占6.3%，25.9%和33.3%^[27-28]。因此，门静脉扩张，胆囊壁增厚，脐旁静脉重开以及腹水的出现与食管静脉曲张均基于门静脉压力升高的共同病理基础，有着内在的必然联系。以这些指标经Logistic回归分析所建立的回归方程对Child-Pugh B级肝硬化患者中度以上食管静脉曲张判断准确率达92.7%。以此方程预测另一组病例，判断的准确率可达85.8%。Imperiale et al^[28]对食管静脉曲张破裂出血进行内镜预防性套扎的Meta分析显示，预防性套

扎能减少首次出血的发生率和死亡率. Lo et al [29] 报道在 Child-Pugh B 级患者中对食管静脉曲张高危患者进行预防性套扎效果更好. 本研究提示, 通过对 Child-Pugh B 级肝硬化患者进行超声检查, 以简单的指标对食管静脉曲张程度进行预测准确性高, 经此筛选高危患者再行胃镜检查及预防性套扎会具有更好的针对性, 既能节省医疗费用又可以避免部分患者进行胃镜检查的痛苦, 本方法简便、安全, 切实可行, 具有临床应用价值.

Child-Pugh C 级肝硬化患者绝大部分(93.3%)有中度以上的食管静脉曲张. 因此, Child-Pugh C 级肝硬化患者无需进行筛选, 均应进行胃镜检查, 以便及时对食管静脉曲张进行诊断和治疗, 预防其破裂出血. 对 Child-Pugh A 级患者判断食管静脉曲张程度贡献较大的指标是 PUV, 既往研究认为 Child-Pugh A 级肝硬化患者中脐旁静脉重开占 6.3%[28], 本组资料显示用 PUV 判断 Child-Pugh A 级肝硬化患者中度以上食管静脉曲张的准确率为 68.0%. 仍然可以作为胃镜检查前一个较好的筛选指标.

4 参考文献

- 1 王吉耀. 食管静脉曲张破裂出血的预防. 世界华人消化杂志 2000; 8(特刊 8):66
- 2 姚希贤. 肝病上消化道出血的研究现状与进展. 华人消化杂志 1998;6(特刊 8):36-38
- 3 Li H, Li RC, Liao SS, Gong J, Zeng XJ, Li YP. Long-term effectiveness of infant low-dose hepatitis B vaccine immunization in Zhuang Minority Area in China. *World J Gastroenterol* 1999; 5:122-124
- 4 Wu J, Cheng ML, Zhang GH, Zhai RW, Huang NH, Li CX, Luo TY, Lu S, Yu ZQ, Yao YM, Zhang YY, Ren LZ, Ye L, Li L, Zhang HN. Epidemiological and histopathological study of relevance of Guizhou Maotai liquor and liver diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:571-574
- 5 黄正明, 杨新波, 于仁变. 肝硬化的药物治疗. 世界华人消化杂志 2002;10:957-958
- 6 付铁娟. 肝硬变所致上消化道出血的药物治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:907-908
- 7 诸琦, 吴云林. 超声内镜对食管胃底静脉曲张的诊断及治疗疗效判断. 世界华人消化杂志 2000;8:1137-1138
- 8 赵超, 陈少波, 周建平, 肖文, 范汉恭, 吴学威, 冯干忻, 何维雄. 影响肝硬变食管胃底静脉曲张破裂出血预后的分析. 世界华人消化杂志 2000;8:466-467
- 9 Zhu JY, Leng XS, Wang D, Du RY. Effects of somatostatin on splanchnic hemodynamics in cirrhotic patients with portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2000;6:143-144
- 10 Saitoh O, Sugi K, Kojima K, Matsumoto H, Nakagawa K, Kayazawa M, Tanaka S, Teranishi T, Hirata I, Katsu KI. Increased prevalence of intestinal inflammation in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:391-396
- 11 殷晓煜, 吕明德, 黄洁夫, 梁力建. 肝硬化门脉高压症门脉血流动力学变化及其与食管静脉曲张出血的关系. 中华超声影像学杂志 2000;9:325-328
- 12 李孝生, 沈鼎明, 邹建忠, 刘长安, 张炼. 小剂量心得安加川芎嗪预防食管静脉曲张破裂出血的实验与临床研究. 世界华人消化杂志 2000;8:135-138
- 13 彭林, 王卫东, 区金锐, 陈盛, 孙建. 门静脉高压症患者断流术前后的胃镜观察. 世界华人消化杂志 2002;10:107-108
- 14 El Atti EA, Nevens F, Bogaerts K, Verbeke G, Fevery J. Variceal pressure is a strong predictor of variceal haemorrhage in patients with cirrhosis as well as in patients with non-cirrhotic portal hypertension. *Gut* 1999;45:618-621
- 15 Longstreth GF, Feitelberg SP. Successful outpatient management of acute upper gastrointestinal hemorrhage: use of practice guidelines in a large patient series. *World J Gastroenterol* 1998;4:230
- 16 孙晓滨, 赵聪, 史维, 邱雄, 吴立平, 李慧, 周耀霞, 农春燕. 肝硬变患者肝静脉血流频谱的变化. 世界华人消化杂志 2001;9:356-357
- 17 Merkel C, Zoli M, Siringo S, van Buuren H, Magalotti D, Angelini P, Sacerdoti D, Bolondi L, Gatta A. Prognostic indicators of risk for first variceal bleeding in cirrhosis: a multicenter study in 711 patients to validate and improve the North Italian Endoscopic Club (NIEC) index. *Am J Gastroenterol* 2000;95: 2915-2920
- 18 张荣, 郭昭友, 郭进兰. 门脉高压时内镜检查所见与出血危险因素探讨. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):19
- 19 Ohta M, Hashizume M, Kawanaka H, Akazawa K, Tomikawa M, Higashi H, Kishihara F, Tanoue K, Sugimachi K. Prognostic significance of hepatic vein waveform by Doppler ultrasonography in cirrhotic patients with portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1853-1857
- 20 Zhu JA, Hu B. Ultrasonography in predicting and screening liver cirrhosis in children: A preliminary study. *World J Gastroenterol* 2003;9:2348-2349
- 21 施玉湘. 肝硬变患者 B 超与内镜检查对预测门脉高压性上消化道出血的临床价值. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):75
- 22 Gorg C, Riera-Knorrenzchild J, Dietrich J. Pictorial review: Colour Doppler ultrasound flow patterns in the portal venous system. *Br J Radiol* 2002;75:919-929
- 23 Merli M, Nicolini G, Angeloni S, Rinaldi V, De Santis A, Merkel C, Attili AF, Riggio O. Incidence and natural history of small esophageal varices in cirrhotic patients. *J Hepatol* 2003;38: 266-272
- 24 吴凤婷, 李玉生. 肝硬化患者食道静脉曲张程度与门静脉脾静脉内径、肝硬化分级的相关性研究. 中西医结合肝病杂志 2001; 11:84-85
- 25 Zaman A, Becker T, Lapidus J, Benner K. Risk factors for the presence of varices in cirrhotic patients without a history of variceal hemorrhage. *Arch Intern Med* 2001;161:2564-2570
- 26 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:550-551
- 27 Domland M, Gebel M, Caselitz M, Bleck J, Manns MP. Comparison of portal venous flow in cirrhotic patients with and without paraumbilical vein patency using duplex-sonography. *Ultraschall Med* 2000;21:165-169
- 28 Imperiale TF, Chalasani N. A meta-analysis of endoscopic variceal ligation for primary prophylaxis of esophageal variceal bleeding. *Hepatology* 2001;33:802-807
- 29 Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Lin CK, Hsu PI, Chiang HT. Prophylactic banding ligation of high-risk esophageal varices in patients with cirrhosis: a prospective, randomized trial. *J Hepatol* 1999;31:451-456

高脂血症表型与脂肪肝的关系

陈其奎, 陈海英, 王凌云, 陈为宪, 黄志清

陈其奎, 王凌云, 陈为宪, 黄志清, 中山大学附属第二医院消化内科
广东省广州市 510120
陈海英, 广东省中山市人民医院消化内科工作 广东省中山市 528400
陈其奎, 男, 1963-07-01生, 安徽省怀宁人, 汉族, 1997年中山医科大学博士。中山大学附属第二医院消化内科副主任, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师。主要从事肝、胰疾病的基础和临床研究工作。已发表研究论文40篇, 参与编写专著4部, 研究成果曾获国家教委和广东省医药卫生科技进步二等奖。项目负责人: 陈其奎, 510120, 广东省广州市沿江西路107号, 中山大学附属第二医院消化内科。qkchen@21cn.com
电话: 020-81332598 传真: 020-81332244
收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-01-08

Association between fatty liver and hyperlipidemia

Qi-Kui Chen, Hai-Ying Chen, Ling-Yun Wang, Wei-Xian Chen, Zhi-Qing Huang

Qi-Kui Chen, Ling-Yun Wang, Wei-Xian Chen, Zhi-Qing Huang, Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University. Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Hai-Ying Chen, Department of Gastroenterology, Zhongshan People Hospital, Zhongshan 528400, Guangdong Province, China
Correspondence to: Qi-Kui Chen, Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, 107 West Yanjiang Road, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China.
qkchen@21cn.com

Received: 2003-12-29 Accepted: 2004-01-08

Abstract

AIM: To investigate the association between the formation of fatty liver and the phenotypes of hyperlipidemia.

METHODS: A total of 258 patients with hyperlipidemia were found in 413 patients with fatty liver, and 61 cases of hyperlipidemia in non-fatty liver patients were selected randomly as controls. The complications and liver function abnormalities were compared between two groups.

RESULTS: The proportion of hypertriglyceridemia and mixed hyperlipidemia was higher in the patients with fatty liver than non-fatty liver. Odds ratios (OR) of finding fatty liver in the patients with mixed hyperlipidemia and hypertriglyceridemia were 5.966 and 2.960 respectively, relative to hypercholesterolemia. The percentage of complications of type II diabetes mellitus, obesity, hypertension, hyperuricemia and the elevation of serum alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyltransferase (GGT) were higher in patients with fatty liver than non-fatty liver. But, there were no differences in coincidence of diabetes mellitus, obesity, hypertension, hyperuricemia, coronary heart disease, cholelithiasis among various phenotypes of hyperlipidemia.

CONCLUSION: The pathogenesis of fatty liver can be related to mixed hyperlipidemia and hypertriglyceridemia. The complications of patients with fatty liver may be more common than those with non-fatty liver, but have no dif-

ferences of complications among various phenotypes of hyperlipidemia.

Chen QK, Chen HY, Wang LY, Chen WX, Huang ZQ. Association between fatty liver and hyperlipidemia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004; 12(4):914-916

摘要

目的: 探讨高脂血症表型与脂肪肝形成之间的关系及临床特点。

方法: 收集脂肪肝病例413例, 伴高脂血症的脂肪肝患者258例, 为高脂血症脂肪肝组; 随机抽取上述时间段非脂肪肝患者200例, 作为对照组, 其中高脂血症的61例, 为高脂血症非脂肪肝组。Logistic回归方程分析高脂血症表型与脂肪肝形成的关系。比较各型高脂血症脂肪肝的临床并发症及肝功能的差异。

结果: 413例脂肪肝中, 高甘油三酯(TG)血症和混合性高脂血症的比例明显高于对照组。混合性高脂血症和高TG血症与高胆固醇(CHO)血症相比, 其发生脂肪肝的优势比(OR)分别为5.966和2.960。高脂血症脂肪肝组合并II型糖尿病、肥胖、高血压、高尿酸血症、以及ALT和GGT升高的比例显著高于高脂血症非脂肪肝组。脂肪肝患者各型高脂血症之间合并II型糖尿病、肥胖、高血压、冠心病、高尿酸血症和胆石症的比例无显著差异。

结论: 脂肪肝的形成与患者合并混合性高脂血症和高TG血症有关。高脂血症脂肪肝组相关并发症发生的比例较高脂血症非脂肪肝组高, 且肝功能损害较明显, 但与高脂血症的表型无关。

陈其奎, 陈海英, 王凌云, 陈为宪, 黄志清. 高脂血症表型与脂肪肝的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(4):914-916

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/914.asp>

0 引言

高脂血症作为脂肪肝发病的危险因素已为大多数研究证实^[1-6], 但不同表型高脂血症引起脂肪肝的临床特点及差异, 国内少见报道^[7-9]。我们对各型高脂血症与脂肪肝的关系, 以及不同高脂血症表型脂肪肝的临床并发症、肝功能进行比较, 探讨其差异及特点。

1 材料和方法

1.1 材料 我院1998-01/2002-05诊断为脂肪肝的患者

413例. 其中, 伴高脂血症的脂肪肝患者258例[(慢性胃炎、消化性溃疡、功能性胃肠病等), 为高脂血症脂肪肝组; 随机抽取上述时间段存非脂肪肝患者200例], 作为对照组, 其中并发高脂血症的61例, 为高脂血症非脂肪肝组. 脂肪肝的诊断按照2002年中华医学会肝脏病学分会的标准^[10]. 血脂异常按2001年美国ATP III(Adult Treatment Panel III)标准^[11].

1.2 方法 分别收集各组的初诊年龄、性别、Ⅱ型糖尿病、肥胖、高血压、冠心病、高尿酸血症、胆石症以及血清甘油三酯(TG)、胆固醇(CHO)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、γ谷氨酰转移酶(GGT)和总胆红素(TB)等肝功能指标. 所有生化指标均在日立7170A生化全自动分析仪进行检测.

统计学处理 用统计学SPSS10.0软件包进行统计. P<0.05为显著性差异. 率的比较用χ²检验. Logistic回归方程分析高脂血症表型与脂肪肝的关系.

2 结果

2.1 脂肪肝伴发各型高脂血症比较 在413例脂肪肝中, 男女比例为: 1:1.11, 平均年龄54.4±8.9岁. 与200例非脂肪肝组相比, 性别(1:1.19)和年龄(55.6±7.8岁)的差异无统计学意义. 脂肪肝组混合性高脂血症的比例最高, 占27.4%, 其次分别为高TG血症(20.1%)和高CHO血症(15.0%), 三者间分别有显著性差异(P<0.05). 伴发高TG血症和混合性高脂血症的比例明显高于200例非脂肪肝对照组(表1).

表1 脂肪肝组和非脂肪肝组血脂异常率的比较 n (%)

血脂表型	脂肪肝组	非脂肪肝组	P值
高TG血症	83(20.1)	16(8.0)	0.000
高CHO血症	62(15.0) ^a	34(17.0)	0.525
混合性高脂血症	113(27.4)	11(5.5)	0.000

^aP<0.05, vs 高TG血症和混合性高脂血症.

2.2 高脂血症表型与脂肪肝形成之间的关系 Logistic回归分析表明, 三种高脂血症表型中, 混合性高脂血症和高TG血症与脂肪肝的形成密切相关. 与高CHO血症相比, 混合性高脂血症和高TG血症患者发生脂肪肝的优势比(OR)分别为5.966和2.960(表2).

表2 高脂血脂表型与脂肪肝关系的logistic回归分析*

变量	β	SE	OR	χ ²	P值
高TG血症	1.085	0.337	2.960	10.337	0.001
混合性高脂血症	1.786	0.379	5.966	22.239	0.000

* 与高CHO血症组比较.

2.3 高脂血症脂肪肝与高脂血症非脂肪肝比较 在413例

脂肪肝患者中, 伴高脂血症者258例, 占62.5%. 200例非脂肪肝组, 伴高脂血症者61例, 占30.5%. 经χ²检验, 高脂血症脂肪肝组合并Ⅱ型糖尿病、肥胖、高血压、高尿酸血症的比例和ALT, GGT升高的比例显著高于高脂血症非脂肪肝组(表3).

表3 高脂血症脂肪肝与高脂血症非脂肪肝组的合并症及肝功能n(%)

指标	高脂血症脂肪肝组	高脂血症非脂肪肝组	P值
Ⅱ型糖尿病	145(56.2)	3(4.9)	0.000
肥胖	158(61.2)	5(8.2)	0.000
高血压	125(48.5)	4(6.6)	0.000
冠心病	49(19.0)	7(11.5)	0.165
高尿酸血症	78(30.2)	8(13.1)	0.007
胆石症	13(5.0)	1(1.6)	0.244
AST(>40 U/L)	45(17.4)	11(18.0)	0.913
ALT(>40 U/L)	85(32.9)	6(9.8)	0.000
GGT(≥50 U/L)	97(37.6)	14(22.9)	0.031
TB(≥17.1 μmol/L)	40(15.5)	10(16.4)	0.864

2.4 脂肪肝各型高脂血症之间临床合并症的比较 经χ²检验, 各型高脂血症之间伴发Ⅱ型糖尿病、肥胖、高血压、冠心病、高尿酸血症和胆石症的比例无显著差异(表4).

表4 各型高脂血症脂肪肝临床合并症的比较n(%)

指标	高TG血症组 n=83	高CHO血症组 n=62	混合高脂血症组 n=113	P值
糖尿病	49(59.4)	33(53.2)	75(66.4)	0.215
Ⅱ型糖尿病	43(51.8)	31(50.0)	71(62.8)	0.162
肥胖	49(59.0)	37(59.7)	72(63.7)	0.769
高血压	33(39.8)	33(53.2)	59(52.2)	0.156
冠心病	12(14.5)	16(25.8)	21(18.6)	0.224
高尿酸血症	26(31.3)	18(29.0)	34(30.1)	0.956
胆石症	4(4.8)	5(8.1)	4(3.5)	0.422

3 讨论

高脂血症好发于各类人群, 是多种慢性疾病的发病基础^[12-15]. 各型高脂血症均可伴发脂肪肝, 而脂肪肝可能演变为非酒精性脂肪肝炎、肝纤维化、甚至肝硬化^[16-17]. 本资料表明, 混合性高脂血症和高TG血症患者较高CHO血症患者更容易发生脂肪肝. 国外学者也认为, 高TG血症, 而不是高CHO血症, 可增加脂肪肝发生的危险性^[5]. 对于脂肪肝患者合并高脂血症的比例, 国外学者的报道有所差异. Harrison et al^[17]报道22例脂肪肝病例中, 合并高脂血症14例, 占63.6%. 而Bacon et al^[18]报道33例脂肪肝病例, 合并高脂血症者只占21%. 我们发现, 413例脂肪肝病例, 伴高脂血症的脂肪肝258例, 占62.5%, 与国内的报道基本类似^[9], 其中伴发混合性高脂血症比例最高, 占总脂肪肝病例的27.4%, 其次分别为高TG血症(20.1%)和高CHO血

症(15.0%)。

国外一组46例糖耐量正常的非酒精性脂肪肝患者进行病例-对照研究，发现TG为脂肪肝发病的危险因素。Omagari et al^[6]对3432例门诊患者进行调查，也认为TG为脂肪肝发病的独立危险因素之一。尽管如此，也有学者提出，高脂血症发生脂肪肝的作用是复杂的，并很难从肥胖和糖尿病的作用中独立出来^[19]。我们发现，高TG血症和混合性高脂血症与脂肪肝的发病关系密切。

由于脂肪肝发病因素的多样性及各种危险因素复杂的相互作用，使得脂肪肝的病因尚未完全明确。除与高脂血症外，还可能与糖尿病、肥胖、HCV感染、营养不良和快速减肥等危险因素有关^[1,6,20]。糖尿病尤其是Ⅱ型糖尿病与非酒精性脂肪肝之间有密切关系^[21-22]，许多研究提出，胰岛素抵抗可能是脂肪肝发生的一个重要机制^[23-24]，Ⅱ型糖尿病常伴有胰岛素抵抗和高胰岛素血症，可引起肝脏脂质代谢异常和氧应激并抑制线粒体β氧化，导致肝脏脂质沉积及脂肪肝的形成^[25]。而高尿酸血症为胰岛素抵抗的表现之一，因此可能与脂肪肝发病相关。高血压和冠心病是两种与胰岛素抵抗有关的疾病，与脂肪肝的发生存在相关性^[25-26]。脂肪肝也与肥胖关系密切，大多数研究表明，69-100%的非酒精性脂肪肝炎患者伴有肥胖^[27]。本研究发现高脂血症脂肪肝合并Ⅱ型糖尿病、肥胖、高血压、高尿酸血症显著高于高脂血症非脂肪肝组。提示在高脂血症基础上伴发上述疾病，可能使脂肪肝发病的危险性增加。但各表型高脂血症间合并Ⅱ型糖尿病、肥胖、高血压、冠心病、高尿酸血症和胆石症的比例无显著差异。

高脂血症发生脂肪肝的机制未明，可能与“二次打击”学说有关^[28]，高TG血症、肝内脂肪的动态平衡被破坏和游离脂肪酸(FFA)产生增多，FFA干扰胰岛素与受体结合，使胰岛素作用减弱并伴有胰岛素抵抗，导致脂肪在肝脏沉积^[29]。FFA毒性作用可造成细胞内膜性结构如线粒体的肿胀等，还能形成反应氧化类体(ROS)、激活并诱导产生细胞因子，加重对肝细胞的损害。

4 参考文献

- 1 Angelico F, Del Ben M, Conti R, Franciosi 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
- 2 Tacikowski T, Dzieniszewski J, Nowicka G, Ciok J. Comparative analysis of lipid profiles assessed by ultracentrifugation in patients with various hyperlipoproteinemia types in correlation with hepatic steatosis. *Med Sci Monit* 2002;8:CR697-701
- 3 Shimada M, Hashimoto E, Kaneda H, Noguchi S, Hayashi N. Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors for liver fibrosis. *Hepatol Res* 2002;24:429-438
- 4 Sharabi Y, Eldad A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with hyperlipidemia and obesity. *Am J Med* 2000;109:171
- 5 Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 2000;45:1929-1934
- 6 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
- 7 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
- 8 范建高. 中国脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:6-10
- 9 刘军, 陈影, 姚庆姑. 脂肪肝与体重、血脂、血糖、胰岛素抵抗的关系. 临床荟萃 2003;18:439-441
- 10 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准. 中华肝脏病杂志 2003;11:71
- 11 Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program(NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults(Adult Treatment Panel II). *JAMA* 2001;285:2486-2497
- 12 Misra A, Pandey RM, Devi JR, Sharma R, Vikram NK, Khanna N. High prevalence of diabetes, obesity and dyslipidaemia in urban slum population in northern India. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1722-1729
- 13 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组. 我国成人体重指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值:适宜体重指数和腰围切点的研究. 中华流行病学杂志 2002;23:5-10
- 14 蔡绍丽. 某军队医院医务人员甘油三酯升高及脂肪肝患病情况分析. 第三军医大学学报 2003;25:369-370
- 15 臧贵明, 张昭馥, 王苏苏, 曹悦鞍, 马小兵, 王春, 王洪瑛, 麻滨瑞. 中老年人脂肪肝与部分危险因素的相关性和控制现状. 北京医学 2002;24:262-263
- 16 Kichian K, McLean R, Gramlich LM, Bailey RJ, Bain VG. Non-alcoholic fatty liver disease in patients investigated for elevated liver enzymes. *Can J Gastroenterol* 2003;17:38-42
- 17 Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2042-2047
- 18 Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: An expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-1109
- 19 Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am* 1996;80:1147-1166
- 20 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
- 21 Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000;26:98-106
- 22 Saibara T, Onishi S, Ogawa Y, Yoshida S, Enzan H. Non-alcoholic steatohepatitis Noabstract available. *The Lancet* 1999;354:1298-1300
- 23 Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455
- 24 Comert B, Mas MR, Erdem H, Dinc A, Saglamkaya U, Cigerim M, Kuzhan O, Unal T, Kocabalkan F. Insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Liver Dis* 2001;33:353-358
- 25 Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2714-2724
- 26 Akahoshi M, Amasaki Y, Soda M, Tominaga T, Ichimaru S, Nakashima E, Seto S, Yano K. Correlation between fatty liver and coronary risk factors: a population study of elderly men and women in Nagasaki, Japan. *Hypertens Res* 2001;24:337-343
- 27 Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997;126:137-145
- 28 董菁, 成军. 脂肪肝形成分子机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1035-1036
- 29 Moro E, Gallina P, Pais M, Cazzolato G, Alessandrini P, Bittolo-Bon G. Hypertriglyceridemia is associated with increased insulin resistance in subjects with normal glucose tolerance: evaluation in a large cohort of subjects assessed with the 1999 World Health Organization criteria for the classification of diabetes. *Metabolism* 2003;52:616-619

吻合器痔上黏膜钉合术治疗重度痔疮 226 例

姚礼庆, 钟芸诗, 孙益红, 戈少云, 刘厚宝, 郑烈伟

姚礼庆, 钟芸诗, 孙益红, 戈少云, 刘厚宝, 郑烈伟, 复旦大学附属中山医院普外科 上海市 200032

姚礼庆, 男, 1951-03-01 生, 江苏省镇江市人, 汉族, 复旦大学附属中山医院内镜中心主任, 普外科教授, 中华消化内镜学会外科学组组长, 上海市消化内镜学会副主任委员。主要从事内镜外科的研究。

项目负责人: 姚礼庆, 200032, 上海市枫林路 180 号, 复旦大学附属中山医院内镜中心。zys2001@eastday.com

电话: 021-64041990-2537

收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-12-16

Effects of procedure for prolapse and haemorrhoids on severe hemorrhoids: a report of 226 cases

Li-Qing Yao, Yun-Shi Zhong, Yi-Hong Sun, Shao-Yun Ge, Hou-Bao Liu, Lie-Wei Zhen

Li-Qing Yao, Yun-Shi Zhong, Yi-Hong Sun, Shao-Yun Ge, Hou-Bao Liu, Lie-Wei Zhen, Department of General Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Li-Qing Yao, Endoscopy Center, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. zys2001@eastday.com

Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To assess the clinical value of procedure for prolapse and haemorrhoids (PPH).

METHODS: A total of 226 III- and IV-degree haemorrhoids were treated with PPH. The pain, bleeding, prolapse and edema in anal, before the procedure, 1, 6 and 30 days after the procedure, and in the end of the follow-up were analyzed.

RESULTS: Of the 226 patients, the mean operation time was 9 min. In the next day after the procedure, the pain rate was 20.5% and the bleeding rate was 5.7%, but 30 days later, pain and bleeding were cured. All the patients had the first stool 46.9±10.9 h after the procedure and the mean hospital time was 4.4±1.2 d. 8.0±1.7 d after the procedure, most of the patients came to the work. Retention of urine (10%) and bleeding (5.7%) were the main complications. The unusual complications included infection, stenosis and back ache. There were 2 severe patients who had twice of procedure. In 186 patients followed-up (89.6%), 4.5% had a little bleeding. The mean follow-up time was 22.4±7.4 mo.

CONCLUSION: PPH is effective, safe, and minimal invasive, and it is the first choice to deal with severe haemorrhoids.

Yao LQ, Zhong YS, Sun YH, Ge SY, Liu HB, Zhen LW. Effects of procedure for prolapse and haemorrhoids on severe hemorrhoids: a report of 226 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):917-919

摘要

目的: 探讨吻合器痔上黏膜钉合术(PPH)治疗重度痔疮的临床疗效。

方法: 对 226 例 III, IV 度痔疮患者行 PPH 术, 比较患者术前, 术后 1, 6, 30 d 和随访终点的疼痛、出血、坠胀和水肿情况。

结果: 226 例患者的平均手术时间为 9 min; 术后 1 d 疼痛的发生率为 20.5%、出血的发生率为 5.7%; 至术后 30 d 疼痛、出血情况明显改善; 术后 46.9 ± 10.8 h 出现首次排便; 平均住院天数为 4.4 ± 1.2 d; 恢复正常工作的平均时间 8.0 ± 1.7 d; 术后并发症发生率低, 以尿潴留(10%)和出血(5.7%)多见, 但少见的并发症(感染、吻合口狭窄、腰背部酸痛等)也需引起重视; 有 2 例严重的痔疮患者先后作了 2 次 PPH 术, 术后恢复良好; 随访了 186 例患者, 平均随访时间为 22.4 ± 7.4 mo, 随访率为 89.6%(186/208), 仅有 4.5% 的患者表现为少量的出血, 其余均恢复良好, 无复发。

结论: 吻合器痔上黏膜钉合术具有手术时间短, 创伤小, 恢复快, 并发症少等优点, 是治疗重度内痔的理想方法。

姚礼庆, 钟芸诗, 孙益红, 戈少云, 刘厚宝, 郑烈伟. 吻合器痔上黏膜钉合术治疗重度痔疮 226 例. 世界华人消化杂志 2004;12(4):917-919

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/917.asp>

0 引言

近代认为, 痔的发生是由于肛垫下移造成的。吻合器痔上黏膜钉合术(procedure for prolapse and haemorrhoids, PPH)是基于此理论建立起来的治疗重度痔疮的新术式, 我国 2000-07 至今已开展了近 7 000 例此类手术, 并修订了 PPH 术暂行规范^[1], 但是国内尚无对其长期疗效的评价, 我院作为国内最先开展 PPH 术的医院, 已治疗了 226 例患者, 现将其中长期疗效总结如下:

1 材料和方法

1.1 材料 2000-07/2002-12 我院普外科共收治行 PPH 术的患者 226 例, 男 108 例, 女 118 例, 年龄 22-85(平均 53.1 岁). III 度痔疮 84 例, 占 37.2%, IV 度痔疮 142 例, 占 62.8%. 病程 3-45(平均 16.7 a). 其中 43 例曾有内痔结扎手术史, 57 例曾有内痔手术切除史, 另有 79 例患者曾有内痔硬化剂治疗史。

1.2 方法 采用美国强生公司的痔黏膜环状切除吻合器。

术前肠道准备同一般肛门手术，腰麻下取膀胱截石位，会阴部常规消毒(女性患者同时作阴道消毒)铺巾。扩肛至能容纳4指1-2 min，用3把无创伤钳在3点夹住肛管环，放入肛管扩张器(CAD33)，在会阴部1, 5, 7, 11点各固定1针，取出内芯。通过CAD33将肛镜缝扎器(PSA33)置入，PSA33能遮盖直肠壁上270°范围内有脱垂的黏膜痔块，从肛镜腔内可见到90°的脱垂黏膜痔块，缝针较为容易。缝针的距离在齿状线上2-3 cm，通过PSA33转动将直肠黏膜下缝扎1圈，注意女性患者在作直肠黏膜下缝合时，左手食指伸入阴道内，防止将阴道后壁黏膜缝入。退出PSA33，将张大到最大限度的33 mm吻合器(HCS33)头端伸入到缝扎处上端，环扎缝线打结，用ST100带线器通过HCS33的孔道将线带出。向外用力牵引结扎线并顺时针方向旋转收紧HCS33的保险装置，关闭HCS33状态20 s左右(可加强止血作用)。将HCS33逆时针方向旋转1 wk，取出HCS33。通过肛镜检查结扎环有无出血，有活动性出血者可加缝1针止血。术后一般观察1-3 d出院，门诊定期随访。我们分别对患者术后1, 6, 30 d的疼痛程度，出血情况，肛门坠胀感和肛门周围水肿进行评价(表1)。另外还对手术的并发症，复发率，随访终点症状改善率等进行了统计。所有患者均在术后30 d进行门诊随访，以了解吻合口的情况。患者的远期随访则采用电话随访和书信随访相结合的方式，以期提高随访率。

统计学处理 所有资料通过SPSS 11.0进行统计，计数资料的统计采用 χ^2 检验，计量资料的统计采用t检验。

表1 手术后症状的恢复

	术后1 d	术后6 d	术后30 d
疼痛程度			
0分 无疼痛	29.7%	84.4%	100%
1分 轻微，无需使用止痛药	49.8%	15.6%	0
2分 疼痛，需口服止痛药	13.1%	0	0
3分 疼痛不能忍受，需用止痛剂肌肉注射	7.4%	0	0
出血程度			
0分 无出血	94.3%	100%	100%
1分 创面少量渗血，排便时无滴血	3.3%	0	0
2分 创面少量渗血，排便时有少量滴血	1.6%	0	0
3分 创面少量渗血，排便时出血量较大	0.8%	0	0
坠胀程度			
0分 无坠胀感	12.3%	95.9%	100%
1分 轻微，无需处理	78.7%	4.1%	0
2分 坠胀明显，但无需立即排便	9.0%	0	0
3分 肛门坠胀难以忍受，需立即排便	0	0	0
水肿程度			
0分 无水肿	9.0%	90.2%	100%
1分 肛缘及创面周围有轻度水肿	85.2%	9.8%	0
2分 肛缘及创面周围有中度水肿	5.7%	0	0
3分 肛缘及创面周围水肿明显	0	0	0

2 结果

2.1 近期疗效 全组手术均采用1 g/L布比卡因2 mL行腰麻或骶麻，平均手术时间为9.5 ± 2.3 (7-15 min)；而且前50例患者的平均手术时间为11.3 ± 2.2 min，此后的176例患者的平均手术时间为8.4 ± 3.2 min，二者相比的差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后1, 6和30 d患者的疼痛、出血、坠胀、水肿程度采用下述的标准进行评价(表1)。术后首次排便一般出现在46.9 ± 10.8 (12-72 h)后。50例以后的患者，术后给予鸦片酊15滴，tid，p.o. × 1 d，以延缓患者首次排便时间。平均住院时间为4.39 ± 1.22 d，最短者仅住院2 d。而术后住院天数平均为3.1 ± 1.1 d，最短者术后1 d出院。本组患者一般在术后4-30 d恢复工作，平均8.0 ± 1.7 d。一般术后1 wk患者即可回到自己的工作岗位，对于发生并发症的患者则会适当延迟。2例十分严重的痔疮患者通过1次PPH术无法达到根治的目的，在第1次手术后1 mo再次行PPH术才治愈，第2次手术的吻合口须做在前一次吻合口的上方1 cm。

2.2 中长期疗效 取2002-12-31为随访终点，大于或等于1 mo的患者208例。随访病例数186例，随访率为89.6%。随访时间为11/3-29(平均22.4 ± 7.4 mo)。患者症状改善情况(表2)。失访与随访患者相比，仅术前便污程度上有统计学差别($P < 0.05$)。

表2 患者症状的中远期改善

	术前		随访终点 (186例患者)	
	失访患者22例	随访患者186例		
疼痛		20.5%	29.5%	0
出血	无	0	0	95.5%
	纸染血	28.5%	32.8%	4.5%
	滴血	64.3%	59.8%	0
	无便时	7.2%	7.4%	0
瘙痒		0	0	0
脱垂	无	0	0	100%
	脱出，回纳慢	0	0	
	脱出，手回纳	32.6%	41.7% ^a	
	很难或不回纳	67.4%	58.3%	
术前便污	从不	45.0% ^a	62.3%	100%
	黏液排出	55% ^a	23.8% ^a	
	偶尔排污	0 ^a	13.9% ^a	
	大便失禁	0	0	

^aP < 0.05.

2.3 术后并发症 尿潴留发生率10%，由于我们对于60岁以上的老年男性患者均采用术后留置导尿1 d的方法，因此术后尿潴留的发生率较低；疼痛发生率70.3%，大多轻微，仅20.5%的患者需要术后给予口服或静脉止痛剂；出血发生率较低，仅为5.7%，大多无需特别处

理, 可自行好转, 只有 2 例患者术后出血较多, 需要予局部止血处理; 感染 1 例, 表现为术后顽固性的疼痛和低热, 给予度冷丁效果不佳, 给予静脉使用抗生素和局部使用柳氮磺胺吡啶栓剂后症状好转, 但并发单纯性肛瘘, 3 mo 后行肛瘘手术才恢复。国外有前瞻随机双盲试验证实^[6], 术前给予单剂广谱抗生素, 可显著减低术后感染的发生率。最近, Ripetti et al^[7]报道 PPH 术后直肠穿孔合并后腹膜气肿和纵隔气肿 1 例, 我们遇到的 1 例术后腰背部酸胀者, 可能也存在直肠小的穿孔, 合并后腹膜气肿。因此, 对于 PPH 术后存在较为严重腰背部酸痛的患者, 应考虑到后腹膜气肿可能。PPH 术后吻合口的狭窄, 主要原因是吻合口过高且荷包缝合时不在一个平面上, 我们采用肠镜下水囊扩张的方法, 经 3-4 次扩张, 患者的症状明显好转。随着时间的推移, 吻合口上的钉子脱落, 再加上大便的扩张作用, 症状将会有进一步的改善。

3 讨论

III、IV 度脱垂性内痔的治疗以外剥内扎术为主, 该手术方法简单, 根治效果好, 复发率较低, 但术后肛门部疼痛时间长, 创面愈合慢, 并且手术后肛门失禁以及肛管狭窄等并发症发生率较高。PPH 手术是将痔块(即“肛垫”)上方的直肠黏膜环形切除一圈, 使脱垂的肛垫回纳入肛管内, 恢复了局部正常的解剖, 而且同时切断了痔上动脉分支, 有利于异常增大的“肛垫”的恢复。PPH 术具有手术时间短, 创伤小, 恢复快, 无痛, 并发症发生率低等优点, 且手术恢复良好, 术后 1 mo 已完全恢复。自姚礼庆 et al^[2]首先报道其近期疗效以来, 国内报道的文献涉及的病例数较少, 我们总结了 226 例患者的临床资料, 希望能为科学评价 PPH 手术的近期疗效提供佐证。至今, 国内外进行的 PPH 例数已近 5 万, 对其远期疗效的总结, 仅见于较少量的报道^[3], 国内更是空白。本组对术后超过 1 mo 的 208 例患者随访 22.4 ± 7.4 mo, 仅有 8 例患者术后仍有少量出血, 其余均取得了满意的疗效, 但毕竟随访时间尚短, 最近 Sutherland et al^[4]总结 7 篇随机前瞻性对照临床试验, 指出 PPH 手术具有明显的优势, 但是尚需要更大样本量和更长期的报道, 以得出科学的报道。

傅传刚 et al^[5]认为 PPH 术的主要并发症包括尿潴留, 出血, 下腹痛, 肛门部疼痛和感染, 与本报道相似, 尿潴留仍为最常见的并发症, 我们体会女性患者术后大多可自行解尿, 可以不留置导尿, 而年龄超过 60 岁的男性患者, 术后常规留置 1 d 导尿, 对于防止尿潴留的发生大有裨益。术后出血多为在吻合器手术后未仔细检查吻合口, 吻合处有活动性出血。术中检查吻合口出血情况应成为常规^[1]。我们遇到 1 例术后局部感染的患

者, 以难治性的疼痛和低热为表现, 给予局部柳氮磺胺吡啶栓和静脉使用抗生素等处理后症状好转, 但并发单纯性肛瘘, 3 mo 后行肛瘘手术才恢复。国外有前瞻随机双盲试验证实^[6], 术前给予单剂广谱抗生素, 可显著减低术后感染的发生率。最近, Ripetti et al^[7]报道 PPH 术后直肠穿孔合并后腹膜气肿和纵隔气肿 1 例, 我们遇到的 1 例术后腰背部酸胀者, 可能也存在直肠小的穿孔, 合并后腹膜气肿。因此, 对于 PPH 术后存在较为严重腰背部酸痛的患者, 应考虑到后腹膜气肿可能。PPH 术后吻合口的狭窄, 主要原因是吻合口过高且荷包缝合时不在一个平面上。最初, 国内外的经验是将吻合口作在齿状线上 5 cm, 目前多数作者认为吻合口应作在距齿状线上 2-3 cm。这样效果好, 狹窄少。若发生狭窄, 我们采用肠镜下水囊扩张的方法, 经 3-4 次扩张, 症状会明显好转。随着时间的推移, 吻合口上的钉子脱落, 再加上大便的扩张作用, 症状将会有进一步的改善^[8-10]。

PPH 手术对于痔疮伴直肠黏膜脱垂的患者可能 1 次不能完全治愈, 在术前须向患者讲明并取得理解。国内外的文献和作者的实践证明, 先后进行 2 次 PPH 术是安全的, 未发生狭窄和再次复发。第 2 次手术的吻合口须做在前一次吻合口上方 1 cm 处。

4 参考文献

- 1 杨新庆. 吻合器痔上黏膜钉合术学术研讨会纪要. 中华外科杂志 2002;40:795-796
- 2 姚礼庆, 唐竟, 孙益红, 戈少云, 陆维琪, 刘厚宝, 张波. 经吻合器治疗重度痔的临床应用价值(附 36 例报告). 中国实用外科杂志 2001;21:288-290
- 3 Pernice LM, Bartalucci B, Bencini L, Borri A, Catarzi S, Kroning K. Early and late (ten years) experience with circular stapler hemorroidectomy. *Dis Colon Rectum* 2001;44:836-841
- 4 Sutherland LM, Burchard AK, Matsuda K, Sweeney JL, Bokey EL, Childs PA, Roberts AK, Waxman BP, Maddern GJ. A systematic review of stapled hemoroidectomy. *Arch Surg* 2002;137:1395-1406
- 5 傅传刚. 吻合器环形痔切除术. 中国肛肠病杂志 2002;22:32-33
- 6 Khalil KH, O' Bichere A, Sellu D. Randomized clinical trial of sutured versus stapled closed haemorrhoidectomy. *Br J Surg* 2000;87:1352-1356
- 7 Ripetti V, Caricato M, Arullani A. Rectal perforation, retropneumoperitoneum, and pneumomediastinum after stapling procedure for prolapsed hemorrhoids: report of a case and subsequent considerations. *Dis Colon Rectum* 2002;5:268-270
- 8 姚礼庆, 唐竟, 徐美东, 戈少云, 孙益红, 钟芸诗. 吻合器黏膜环切术治疗重度痔的临床价值. 中国肛肠病杂志 2002;22:7-9
- 9 冯国光, 郁宝铭, 张浩波, 赵任. 直肠黏膜保护剂治疗内痔的疗效观察. 中国实用外科杂志 2001;21:656-658
- 10 钟芸诗, 姚礼庆. 痔环切吻合器的临床应用. 外科理论和实践 2003;8:349-350

应用SF-36生活质量对肠易激综合征进行疗效评价

陈淑洁, 李耿心, 王良静, 孙蕾民, 姚健敏

陈淑洁, 李耿心, 王良静, 孙蕾民, 姚健敏, 浙江大学邵逸夫临床医学研究所胃肠病研究室 浙江省杭州市 310016
陈淑洁, 女, 1977-06-27 生, 浙江省乐清市人, 汉族。浙江大学医学院消化学硕士, 住院医师。研究方向: 功能性胃肠道疾病, 发表论文 7 篇。
项目负责人: 姚健敏, 310016, 浙江省杭州市, 浙江大学邵逸夫临床医学研究所胃肠病研究室, sjjm@163.net
电话 0571-86090073 - 2005
收稿日期: 2003-09-15 接受日期: 2003-10-22

SF-36 quality of life in effectiveness assessment for irritable bowel syndrome

Shu-Jie Chen, Geng-Xin Li, Liang-Jing Wang, Lei-Min Sun, Jian-Min Si

Shu-Jie Chen, Geng-Xin Li, Liang-Jing Wang, Lei-Min Sun, Jian-Min Si, Department of Gastroenterology, The Sir Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China
Correspondence to: Jian-Min Si, Department of Gastroenterology, The Sir Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China. sjjm@163.net
Received: 2003-09-15 Accepted: 2003-10-22

Abstract

AIM: To evaluate clinical symptoms, quality of life (QOL) outcomes in patients with irritable bowel syndrome (IBS) receiving different therapies.

METHODS: 172 Roma II positive-IBS patients were assigned to 8 weeks of different therapies with Group A: pinaverium bromide (100 mg three times daily), Group B: pinaverium bromide (100 mg three times daily) plus doxepin (25 mg once daily) or Group C: placebo. Main outcomes assessment included a Chinese version of the SF-36 Health Survey Scales and symptomatic scores at baseline and 8 weeks.

RESULTS: Symptom relief was achieved by 40.5%, 65.4% and 30.5% in groups A, B and C respectively. The total symptom improvement rate was 73.0%, 88.5% and 47.9% respectively. Compared with group C, the total symptom improvement rate in groups A and B had significant improvement ($P = 0.046$ and 0.002 respectively). More group B patients noted symptom relief than groups A and C ($P = 0.045$ and 0.015 respectively). Compared with group C, QOL in groups A and B had a striking improvement. Patients in group B noted more scales of SF-36 improvement. The scores of BP, GH, VT, SF and MH scales had significant improvement in group B, and the level of PF, RP, GH, VT, RE and MH were comparable with general population in Hangzhou ($P > 0.05$). There was no significant difference of symptoms relief rate in three subgroups of IBS ($P > 0.05$). There was not a significant correlation between symptomatic treatment and QOL improvement ($P > 0.05$).

CONCLUSION: SF-36 quality of life and symptom analysis should be recommended to evaluate the effectiveness of IBS. Pinaverium bromide combined with doxepin can significantly improve symptoms and QOL, which is effective in the treatment of IBS.

Chen SJ, Li GX, Wang LJ, Sun LM, Si JM. SF-36 quality of life in effectiveness assessment for irritable bowel syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):920-923

摘要

目的:采用SF-36生活质量综合评价不同疗法对肠易激综合征(IBS)患者的疗效。

方法: 2001-01/2002-01消化科门诊符合罗马II标准的IBS患者 172 例, 按排便习惯分为便秘为主型、腹泻为主型和腹泻便秘交替型, 分别接受一种方案治疗, 疗程为 8 wk. 方案A:匹维溴胺(100 mg, 3次/d); 方案B:匹维溴胺(100 mg, 3次/d)+多虑平(25 mg, 晚服); 方案C:安慰剂对照组. 分别记录治疗前后患者SF-36生活质量评分和症状积分.

结果: A方案症状显效率和总有效率分别为40.5%和73.0%; B方案分别为65.4%和88.5%; C方案分别为30.5%和47.9%. A, B方案总有效率均显著高于C方案 ($P = 0.046$ 和 0.002), B方案与A, C方案显效率均有显著差异($P = 0.045$ 和 0.015). A, B方案对生活质量的改善优于C方案, 以B方案对各个纬度的生活质量改善最为明显. B 方案治疗后, 躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(VT)、社会功能(SF)和精神健康(MH)维度的积分有显著提高($P < 0.05$), 且患者的生理功能(PF)、生理机能(RP)、总体健康(GH)、活力(VT)、情感机能(RE)和精神健康(MH)6个维度的生活质量甚至接近杭州市普通人群的生活质量($P > 0.05$). 三种不同亚型患者症状总有效率、显效率均无显著的统计学差异($P > 0.05$). 症状疗效和生活质量改善呈一定的相关性,但相关无统计学意义($P > 0.05$).

结论: 综合 SF-36 生活质量标准和症状疗效, 可全面评价 IBS 疗效. 联合匹维溴胺和抗抑郁药对改善患者的生活质量和 IBS 症状疗效最佳.

陈淑洁, 李耿心, 王良静, 孙蕾民, 姚健敏. 应用 SF-36 生活质量对肠易激综合征进行疗效评价. 世界华人消化杂志 2004;12(4):920-923

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/920.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是常见的慢性

功能性疾病^[1-10]. 在发达国家 IBS 发病率高达 15-20%, IBS 患者约占消化科门诊的 30% 左右. 目前 IBS 发病机制不明, 尚缺乏理想的治疗方法和统一的疗效评价手段. 由于单一的症状学不能全面评价 IBS 患者治疗前后生理、心理多方面的变化, 因此生活质量对 IBS 疗效的评价越来越受到重视. 我们采用匹维溴胺或匹维溴胺 + 多虑平不同治疗方案, 使用症状和生活质量双重标准, 全面评价疗效, 以优选 IBS 治疗方案.

1 材料和方法

1.1 材料 通过浙江省消化中心全省网络, 病例选择覆盖平原、山区、海岛、城市等不同地区共 10 所定点医院. 2001-01/2002-01 各医院消化科门诊就诊的符合 1999 年罗马 II 诊断标准的 IBS 患者. 在过去 12 mo 中, 腹部不适和疼痛的时间等于或超过 3 mo, 且具备以下 3 项中的 2 项: (1) 排便能使其缓解; (2) 伴有排便频率的改变; (3) 伴有与排便一致的改变^[11]. 排除怀疑或证实有与症状相关的器质性疾病患者, 2 wk 内服用过解痉剂、胃肠动力或抗精神病药物以及不能完成 8 wk 疗程或随访的患者. 按 IBS 患者排便习惯将 IBS 分为便秘为主型、腹泻为主型和腹泻便秘交替型. 标准如下^[12-13]: (1) 便秘为主型: 排便频率小于 3 次/wk 或超过 1/4 时间的排便用力或排便结块而无腹泻症状; (2) 腹泻为主型: 排便频率大于 3 次/d 或超过 1/4 时间的排便急迫、稀便或水样便而无便秘症状; (3) 腹泻便秘交替型: 上述腹泻和便秘症状交替发作.

1.2 方法 共有 172 例 IBS 患者按自愿接受一种方案治疗. 疗程为 8 wk. 方案 A: 匹维溴胺(100 mg 3 次/d); 方案 B: 匹维溴胺(100 mg 3 次/d) + 多虑平(25 mg 晚服); 方案 C: 安慰剂对照组. A 方案 74 例, 男 25 例, 女 49 例, 平均年龄 40±14 岁; B 方案 52 例, 男 17 例, 女 35 例, 平均年龄 43±11 岁; C 方案 46 例, 男 17 例, 女 35 例, 平均年龄 49±11 岁. 三组患者在性别、年龄、和症状分布上(包括腹痛频率、腹痛时间、大便形状异常、排便过程异常、腹胀和黏液便)都有可比性($P > 0.05$). 分别记录治疗前后症状积分和 SF-36 生活质量评分. 症状等级评分表包括腹痛时间(无, 小于 1 h/d, 1-8 h/d, 大于 8 h/d)、腹痛频率(无, 小于 2 d/wk, 2-5 d/wk, 大于 5 d/wk)、排便形状异常(无, 小于 1/4, 1/4-3/4, 大于 3/4 时间)、排便过程异常(无, 小于 1/4, 1/4-3/4, 大于 3/4 时间)、黏液便(无, 小于 1/4, 1/4-3/4, 大于 3/4 时间)和排便时腹胀(无, 小于 1/4, 1/4-3/4, 大于 3/4 时间) 6 项. 每项计为 0-3 分, 总分 0-18 分. 记录治疗前后症状积分变化.“显效”: 症状消失或症状积分减少 80% 以上;“有效”: 症状积分减少 50% 以上;“无效”: 症状积分减少少于 50%. 总有效包括显效和有效. 生活质量评价: 采用浙江大学李鲁教授提供的汉化版 SF-36 健康调查

量表^[14], 包括 36 个条目, 对生理功能(PF)、生理机能(RP)、躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(VT)、社会功能(SF)、情感职能(RE)、精神健康(MH)8 个维度进行评价. 各个维度的记分用李克累加法, 按最后题值计算原始分数, 再用标准公式计算转换分数^[15]. 最后各个维度得分为 0 分(最差)-100 分(最好).

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件包. 计数资料以频数和百分数表示, 计量资料以 $mean \pm SD$ 表示, 分别采用 χ^2 检验和 t 检验. 相关分析采用 Pearson 相关分析. $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 不同方案症状疗效 三种方案症状总有效率、显效率均有明显的统计学差异($P < 0.05$). A 方案总有效率均显著高于 C 方案($P < 0.05$), B 方案总有效率高于 A 方案, 但无显著差异($P > 0.05$). B 方案与 A、C 方案显效率均有显著差异($P < 0.05$), A 方案显效率高于 C 方案, 但无统计学差异($P > 0.05$). 见表 1. 便秘型 IBS 总有效率和显效率分别为 61.1% 和 33.3%; 腹泻型 IBS 分别为 79.3% 和 41.4%; 便秘腹泻交替型 IBS 分别为 69.2% 和 53.9%. 三种不同亚型症状总有效率、显效率均无明显的统计学差异($P > 0.05$).

表 1 IBS 三种方案症状疗效比较

疗效	A 方案	B 方案	C 方案	
总有效	54	73.0 ^c	46	88.5 ^{a,d}
显效	30	40.5	34	65.4 ^b
有效	24	32.5	12	23.1
无效	20	27.0	6	11.5
合计	74	100.0	52	100.0
	46		47.9	
		14		30.5
		8		17.4
		24		52.1
		100.0		100.0

^aP < 0.01, ^bP < 0.05 vs A, C 方案. ^cP < 0.05 vs C 方案, ^dP < 0.01 vs C 方案.

2.2 不同方案 SF-36 生活质量评价 三种方案治疗后 IBS 患者的生活质量均得到不同程度的改善. A 方案治疗后, 总体健康(GH)、活力(VT) 和 精神健康(MH) 维度积分显著提高($P < 0.05$). C 方案治疗后, 仅活力维度的生活质量得到显著改善($P < 0.05$). 联合疗法(B 方案)对生活质量的改善最明显. 其中躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(VT)、社会功能(SF) 和 精神健康(MH) 维度的积分提高有统计学意义($P < 0.05$). 联合疗法治疗后, IBS 患者的生理功能(PF)、生理机能(RP)、总体健康(GH)、活力(VT)、情感职能(RE) 和 精神健康(MH) 6 个维度的生活质量甚至接近杭州市普通人群的生活质量(表 2).

2.3 症状疗效 - 生活质量相关性分析 症状疗效和生活质量改善呈一定的相关性, 但相关无统计学意义($P > 0.05$). 见表 3.

表2 IBS三种不同方案治疗前后SF-36生活质量积分比较(mean±SD)

SF-36	A 方案			C 方案			B 方案				
	治疗前	治疗后	P 值	治疗前	治疗后	P 值	治疗前	治疗后	P 值 ^a	普通人	P 值 ^b
PF	81.5(18.2)	85.2(12.6)	0.389	80.1(8.6)	86.7(2.9)	0.554	76.0(22.7)	89.5(10.9)	0.112	82.2(19.8)	0.570
RP	50.0(39.2)	58.3(41.6)	0.376	68.8(31.5)	81.2(23.9)	0.495	47.5(26.3)	62.5(24.5)	0.217	81.2(33.6)	0.144
BP	32.1(27.6)	42.0(27.6)	0.312	55.6(15.7)	38.9(6.4)	0.592	32.5(20.8)	52.1(25.3)	0.008	81.5(20.5)	0.000
GH	37.7(17.6)	56.5(8.9)	0.000	46.3(19.7)	52.5(5.0)	0.600	30.0(14.1)	58.8(11.3)	0.006	56.7(20.2)	0.893
VT	34.0(15.9)	54.2(15.0)	0.000	37.5(13.2)	57.5(10.4)	0.045	24.4(11.8)	51.3(17.3)	0.006	52.0(20.9)	0.509
SF	34.7(18.5)	58.3(23.3)	0.078	46.9(15.7)	84.4(18.8)	0.103	43.0(16.6)	68.5(23.4)	0.001	83.0(17.8)	0.000
RE	61.7(43.0)	67.9(38.7)	0.525	58.3(41.9)	58.3(50.0)	1.000	53.3(27.6)	63.3(22.8)	0.560	84.4(32.4)	0.098
MH	34.3(42.4)	57.0(13.2)	0.030	39.0(8.2)	51.0(15.1)	0.319	34.0(16.4)	58.0(16.3)	0.038	59.7(22.7)	0.752

^aP 为 B 方案治疗前后的比较值 ; ^bP 为 B 方案治疗后与普通人群的比较值.

表3 IBS 症状改善 - 生活质量提高相关分析表

SF-36	生活质量提高	症状积分改善	P 值	相关系数(r)
PF	3.6 (21.2)	-4.3 (2.4)	0.229	-0.274
RP	8.3 (41.1)	-4.3 (2.4)	0.738	-0.078
BP	27.6 (48.0)	-4.3 (2.4)	0.497	-0.161
GH	19.6 (34.4)	-4.3 (2.4)	0.227	-0.291
VT	20.2 (22.6)	-4.3 (2.4)	0.900	-0.031
SF	39.0 (15.6)	-4.3 (2.4)	0.053	-0.399
RE	6.1 (49.8)	-4.3 (2.4)	0.081	-0.390
MH	22.6 (47.9)	-4.3 (2.4)	0.375	-0.216

3 讨论

肠易激综合征是消化系统疾病中常见的慢性疾病, 至今尚无治疗IBS的理想药物^[16]. 我们的研究使用症状和QOL双重标准, 以期全面评价疗效. SF-36健康调查量表中文版, 经过文化调试, 符合我国国情, 能比较全面的反映IBS患者的生活质量情况. 在国内SF-36量表用于IBS人群疗效评价尚属首次.

胃肠动力学的异常被认为是IBS最基本的病理生理学基础, 由此学者提出解痉剂可作为常规用药或一种必须的基础用药. 匹维溴胺是一种高选择性的钙离子通道阻滞剂. 主要通过消除肠平滑肌的高反应性, 从而缓解IBS患者的腹部症状. 最近一项研究^[17]以匹维溴胺50 mg, 3次/d, 共2 wk治疗24例IBS, 患者腹痛、腹胀、黏液便和大便习惯各项症状均有显著改善. 我们研究发现, 单用匹维溴胺100 mg, 3次/d治疗IBS的显效率、总有效率可达40.5%和73.0%, 总有效率明显高于对照组($P < 0.05$), 且生活质量的总体健康(GH)、活力(VT)和精神健康(MH)维度积分显著提高($P < 0.05$).

IBS已被心身医学家描述为七种经典的心身疾病之一. 国外学者发现40-50%的IBS患者有心理障碍表现, 包括抑郁、焦虑、精神症状躯体化等, 80% IBS患者的病情发作和加重与心理因素密切相关^[9]. 对这些患者使用抗抑郁药物, 能提高心理情绪, 不仅如此, 有研究

显示抗抑郁药物能调节胃肠道的生理, 或许对胃肠道神经系统有某些直接的作用. Clouse et al^[18]认为小剂量三环类抗抑郁药(25-125 mg/d)对IBS有一定的治疗作用, 对138例患者的5 a随访结果显示至少85%患者对抗抑郁药有中度以上的治疗反应. 研究表明高选择性的钙离子通道阻滞剂联合抗精神药物治疗疗效优于单药治疗. 我们研究显示, 匹维溴胺和多虑平的联合治疗, 其症状显效率、总有效率分别为65.4%和88.5%, 均明显高于对照组的30.5%和47.9%. 与单用匹维溴胺治疗相比, 联合疗法显效率和总有效率较高. 从生活质量的改善来看, 联合疗法患者的躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(VT)、社会功能(SF)和精神健康(MH)维度的积分显著提高($P < 0.05$).

应用SF-36量表不仅能反映患者治疗前后的生活质量变化, 并能比较不同疗法对IBS患者生活质量的差异. 同时, 通过症状疗效和生活质量相关性分析, 发现临床症状的改善并不一定意味着生活质量的提高, 生活质量的提高也不一定伴随症状的改善. 因此, 在评价疗效时, 不能单一的以症状疗效作为标准, 尤其对功能性胃肠疾病. 从IBS患者症状疗效和生活质量改善来看, 以匹维溴胺为主的联合治疗疗效最佳. 临幊上需重视生活质量评价在IBS治疗中的应用, 不断寻求新的和更有效的治疗方法.

4 参考文献

- Barbezat G, Poulton R, Milne B, Howell S, Fawcett JP, Talley N. Prevalence and correlates of irritable bowel syndrome in a New Zealand birth cohort. *N Z Med J* 2002;115:U220
- Bommelaer G, Dorval E, Denis P, Czernichow P, Frexinos J, Pelc A, Slama A, El Hasnaoui A. Prevalence of irritable bowel syndrome in the French population according to the Rome I criteria. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:1118-1123
- Saito YA, Schoenfeld P, Locke GR 3rd. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1910-1915
- Muller Lissner SA, Bollani S, Brummer RJ, Coremans G, Dapoigny M, Marshall JK, Muris JW, Oberndorff Klein Wolthuis A, Pace F, Rodrigo L, Stockbrugger R, Vatn MH. Epidemiological aspects of irritable bowel syndrome in Eu-

- rope and North America. *Digestion* 2001;64:200-204
- 5 Masud MA, Hasan M, Khan AK. Irritable bowel syndrome in a rural community in Bangladesh: prevalence, symptoms pattern, and health care seeking behavior. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1547-1552
- 6 Tan YM, Goh KL, Muhibayah R, Ooi CL, Salem O. Prevalence of irritable bowel syndrome in young adult Malaysians: A survey among medical students. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18:1412-1416
- 7 Pan G, Lu S, Ke M, Han S, Guo H, Fang X. Epidemiologic study of the irritable bowel syndrome in Beijing: stratified randomized study by cluster sampling. *Chin Med J* 2000; 113:35-39
- 8 Lau EM, Chan FK, Ziea ET, Chan CS, Wu JC, Sung JJ. Epidemiology of irritable bowel syndrome in Chinese. *Dig Dis Sci* 2002;47:2621-2624
- 9 陈仕珠. 肠易激综合征的流行病学和病因研究. 华人消化杂志 1998;6:913-914
- 10 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
- 11 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorder and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45(Suppl 2): II43-47
- 12 Mearin F, Baro E, Roset M, Badia X, Zarate N, Perez I. Clinical patterns over time in irritable bowel syndrome: symptom instability and severity variability. *Am J Gastroenterol* 2004;99: 113-121
- 13 Simren M, Abrahamsson H, Svedlund J, Bjornsson ES. Quality of life in patients with irritable bowel syndromes seen in referral centers versus primary care: the impact of gender and predominant bowel pattern. *Scand J Gastroenterol* 2001;36: 545-552
- 14 王红妹, 李鲁, 沈毅. 中文版 SF - 36 量表用于杭州市区居民生活质量研究. 中华预防医学杂志 2001;35:428-430
- 15 Ware JE, Snow KK, Kosinski M. SF-36 health Survey Manual and interpretation guide. Boston.MA: New England Medical center, The Health Institute, 1993:1-12
- 16 Talley NJ. Pharmacologic therapy for the irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003;98:750-758
- 17 詹丽杏, 李兆申, 邹多武, 许国铭, 尹宁. 匹维溴胺治疗肠易激综合征的临床疗效及改变肛门直肠动力及内脏敏感性研究. 华人消化杂志 2002;22:477-480
- 18 Clouse RE. Antidepressants for irritable bowel syndrome. *Gut* 2003;52:598-599

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

• 消息 •

国科技论文产出世界第五 医药卫生期刊竞争力强劲

健康报 记者张荔子 2003-12-10 报道: 这是一连串枯燥的数字, 却是大量科研人员辛勤一年的收获。12月9日, 中国科学技术信息研究所在京发布的2002年度中国科技论文统计结果显示, 我国科技论文产出由2001年全 世界第六位上升为第五位, 在世界论文总数中首次超过5%。论文数据统计取自3种在国际上颇具影响的检索工具:《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)。2002年我国科技论文产出比2001年增长19.9%, 达77395篇, 占世界论文总数的5.37%。排在前四位的国家依次是美国、日本、英国和德国。我国国际论文被引用数和被引用次数也分别增长31.6% 和33.3%, 其中临床医学国内论文数量和被引用次数居各学科第一, 基础医学论文在国内被引用次数排名第四。临床医学和基础医学论文较以前都显示出更多的国际合作。分类统计还排列出高等院校、科研机构、医疗机构各类机构论文产出和被引用情况前20位, 其中解放军总医院连续3年获国内科技论文被引用数量全国医疗机构第一名, 第四军医大学西京医院连续3年获国内科技论文数量全国医疗机构第一。10位国际论文高产作者和高引用作者中有3位是来自上海第二医科大学的沈志祥、陈国强和牛超, 他们因在《血液》发表的论文被广泛引用而分别名列第三、六、九。共有387种医药卫生类期刊进入今年的影响因子分类排序, 其中影响因子超过1的期刊有12种, 除《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》外, 其余10种均为“中华牌”期刊。此外, 刚选出的第二届中国百种杰出学术期刊中, 19种医药卫生类期刊及其主编榜上有名。纵观2002年中国科技论文各项统计, 可以看到中国科技论文数量和影响力水平继续保持上升趋势, 但中国与世界科技强国还有很大差距。据《国际竞争力度报告》评价, 中国科技竞争力在49个被评价的国家和地区中处于中等偏下的水平。据SCI统计, 中国论文平均被引用率低于世界平均水平。

乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶蛋白中 RNase H 研究进展

陈国凤, 成军, 李莉, 王琳, 张玲霞

陈国凤, 成军, 李莉, 王琳, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

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

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

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

陈国凤, 成军, 李莉, 王琳, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶蛋白中 RNase H 研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(4):925-927

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/925.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]. HBV DNA P基因在ORF中最长, 并且与C、S、X基因区有重叠, 其编码的P蛋白含有3个功能域和1个无意义的隔离片(spacer), 目前对聚合酶及其所编码的各个功能区域蛋白质的功能的认识虽然还不是很清楚, 但已经取得了一定的进展.

1 HBV DNA P RNase H 结构和功能

嗜肝病毒逆转录酶(聚合酶)含有的4个结构域, 排列顺序为N-末端蛋白(TP), 隔离片(spacer, SP), 逆转录酶(RT)/DNA多聚酶和RNase H. 各区段分别在2 307-2 840 nt、2 841-0-132 nt、133-1 128 nt、1 129-1 621 nt^[2]. TP和SP对嗜肝病毒聚合酶是独特的, TP内的第96位酪氨酸残基可引导DNA合成, 并使聚合酶与病毒DNA共价结合, SP无已知的功能, 只是将末端蛋白和其他分子连接起来, 逆转录酶(RT)和RNase H包含两个已知的酶活性位点, 后二者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^[3-14]. Kim et al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TP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, 单个DNA聚合酶或DNA聚合酶N-末端删除仍能保持酶活性, 说明就HBV多聚酶的聚合活性而言, 小的结构域的聚合活性要小于聚合酶结构域的活性^[15]. Lin et al研究两个自然发生的HBV

颗粒(isolates)56和2-18, 核酸序列有98.7%的同源性, 但是复制效率不同. 转染到HepG2细胞后, 从56转染细胞的细胞内病毒核心颗粒分离出的HBV DNA明显高于2-18. 用功能域基因替代法研究二者复制效率差异的结构基础. 将2-18中的完整P基因和TP、SP、RT和RNase H分别用56相应区域替代形成全长嵌合基因组. 细胞转染分析提示, 2-18的全部P基因组用56的P基因替代使病毒复制轻度增强. 惟一获得像56颗粒体的高复制效率的嵌合基因组是用56的RT替代2-18的RT的基因组. 在RT区域内, 2-18与56的氨基酸差异在617位(蛋氨酸对亮氨酸), 652位(丝氨酸对脯氨酸), 682位(缬氨酸对亮氨酸). 652位氨基酸上的点突变是这种复制效率差异的原因. HBV RT结构域的同源性模型研究提示652位氨基酸残基从脯氨酸到丝氨酸突变可能影响对模板-引物相互作用的HBV RT的构造, 导致多聚酶活性减弱^[16]. Kim et al将人的HBV聚合酶在兔网状细胞裂解系统中表达. 表达蛋白显示出DNA依赖性的DNA聚合酶活性, 在体外转录和翻译产生分子量大约100 kD的大蛋白. HBV DNA聚合酶可以被阿菲迪霉素(抗病毒抗生素)和NEM抑制, 在pH7.5和温度37℃时聚合反应最佳, 同时, 聚合酶活性需要有MgCl₂或MnCl₂(MnCl₂更佳). 在75 mM NaCl或100 mM KCl存在时活性较好(75 mM NaCl更佳)^[17]. 目前, 兔网织红细胞裂解液(RRL)是惟一能在体外试验条件下产生由病毒逆转录酶(P蛋白), pgRNA的RNA茎环结构(ϵ)和细胞蛋白共同组成的核蛋白复合物, 进行DHBV P蛋白的翻译的体系. 这一系统也能提供必要的因子. 然而, 他有限的翻译能力限制了对蛋白复合物的深入研究. 为克服这种限制, Beck et al先在大肠杆菌内表达产生大量的DHBV P蛋白, 然后再在RRL中的进行核蛋白复合物的重构. 因为以往在细菌中产生全长P蛋白的尝试没有成功, 于是单独在大肠杆菌中表达TP和逆转录酶-RNase H(RT-RH). 结果TP和C末端经微小修改后的RT-RH, 也能有相当量的表达, 当加入到RRL时, 能进行 ϵ -依赖性DNA引物合成, 证明翻译后的活化^[18]. Lott et al用昆虫细胞同时感染独立表达核心蛋白和多聚酶的杆状病毒. 结果发现核心蛋白与多聚酶相互作用的特征之一是核心蛋白与表达全长的多聚酶及多聚酶的TP、RT、RNase H每个区域共同沉淀. 其中构建了迷你RNase H(FRNH)质粒, 氨基酸范围在680-780 aa, 含有一个FLAG抗原决定基. 用抗-FLAG抗体与FRNH免疫沉淀, Western blot分析抗-FLAG和抗核心抗体, 证明核心蛋白与迷你RNase H多肽共沉淀^[19].

2 RNase H与细胞因子

嗜肝病毒逆转录酶与前基因组RNA模板上的RNA信号 ϵ 特异结合, 并且靠RT自身引导(蛋白引导). 蛋白引导不仅需要病毒逆转录酶和 ϵ RNA模板, 也需要特异的宿主细胞因子(细胞蛋白), 包括热休克蛋白

HSP90, 多种共陪伴(cochaperone)蛋白, 还有一些不清楚的成分共同组成的核蛋白复合物. 有功能的复合物催化合成短链DNA引物, 该引物又作为 ϵ 与 TP 共价结合的模板. Cho et al 认为 HSP90 及其相关产物在 DHBV 感染通过 RNA 信号 ϵ 与 DHBV 聚合酶结合对 DHBV 复制起重要作用. 同理, 用兔网状细胞裂解液中合成人 HBV 聚合酶蛋白在体外与 HSP90 形成联合体, HSP90 用 MBP 共纯化, 聚合酶蛋白在 HepG2 细胞中表达, 提示在体内人的 HBV 聚合酶与 HSP90 相关. 为了对 HSP90 的作用位点进行定位, HBV 聚合酶翻译的几个删除突变与抗 HSP90 抗体在体外共沉淀, 结果提示 TP 的 C-末端和 RT 单独与 HSP90 发生作用^[20]. HBV 聚合酶单独与 HSP90 的 N- 末端和 C- 末端相互作用, HSP90 的 N- 末端片段(1-302 aa)与 HBV 聚合酶的 TP 和 RP 都有相互作用, 而 C- 末端片段(438-723 aa)仅与 RT 相互作用, 其中间片段(327-438 aa)则与 HBV 聚合酶无相互作用^[21]. Hu et al 构建两个迷你 RT(miniRT)表达片段, pcDNA-miniRT1(miniRT1)将改建后的 DHBV RT 多肽的 N- 末端(1-17 aa), C- 末端(734-786 aa), 隔离片(245-352 aa)切除, 含 564 aa(野毒株 786 aa), pcDNA-miniRT2(miniRT2)在 miniRT1 基础上将 C- 末端进一步截短(575-786 aa), 含 394 aa. MiniRT1 与野毒株 RT 一样具有蛋白引导功能, MiniRT2 具有完整的 ϵ 结合的活性, 但是仅有极少的蛋白引导活性(为野毒株的 1-5%). 这两个 mini-RT 蛋白含有与 HSP90 和 p23 相关的结合域. 结果(1) HSP90 能识别 TP 和 RT 域上的两个特异区域, 含有两个陪伴结合区域的 mini-RT 蛋白保留了全部的 ϵ 结合活性, RT 和 RNase H 区域外的序列在蛋白引导时起作用, 很可能在催化 DNA 合成时需要. (2) 在体外用高浓度的盐和非离子洗涤液使 RT 和细胞因子(HSP90)解离, 单独表达 RT, 纯化的 RT 失去了 ϵ 结合和蛋白引导的功能. 但含有 HSP90 和 ATP 的网状细胞裂解液能恢复这种功能. HSP90 对 RT 与 RNA 的结合, 不仅起到建立的功能, 而且还有维护的功能. (3) 在 RT 合成过程中不需要 HSP90, 但 HSP90 可激活转译后的 RT^[22]. DHBV RT 需要宿主细胞因子的辅助进行 RT 与 ϵ 的特异结合和蛋白引导功能. RT 与 ϵ 交互作用和蛋白引导需要 HSP90. HSP90 的几个辅因子在体外足以保持重组 DHBV RT 的 ϵ 结合和蛋白引导活性, 重组 RT 活性需要 HSP90、HSP70、HSP40、Hop/p60 四种蛋白, 蛋白 p23 可进一步提高重组 RT 的动力学. RT 被陪伴蛋白激活是一个动力学过程, 需要 ATP 水解和 HSP90 ATP 酶活性. HSP90 和 HSP70 是 ATP 酶, 在 ATP 结合和水解时易于折叠, HSP40 能刺激 HSP70 的 ATP 酶活性和调节 HSP70 的伴护功能. p60 能与 HSP90 和 HSP70 结合, p23, 小的, 酸性磷蛋白, 与 HSP90 结合, 进一步提高重组动力学. 说明对 RT 活化来说, 宿主因子的最小补充是必要的和充分的. 两个截短的迷你型 DHBV RT 与谷胱苷肽 S- 转移酶(GST)形成融合蛋白 GST-

miniRT1 和 GST-miniRT2, 在大肠杆菌中表达并纯化, 另外还构建了有两个氨基酸替换而不能与 ϵ RNA 结合的突变型 MiniRT2/CA29 和在 RT 的活性位点两个氨基酸替换(YMDD 变成 YMHA), 使 RT 失去活性的 MiniRT1/YMHA. 在重构蛋白引导反应中, 显示在兔网织红细胞裂解液中, 依靠 HSP90 的存在, GST-miniRT1 在体外有强烈的蛋白引导活性. 用已知的 HSP90 陪伴联合体的组成成分代替兔的网状细胞裂解物, 刺激蛋白引导, 结果 HSP90、HSP70、Hop、Ydj1(HSP40), 在一起能重新组成蛋白引导反应, 单独或任何两个或三个蛋白组合是无效的, 偶尔 HSP70 加 Ydj1 能微弱刺激蛋白引导反应, 但比四种相加效力小得多. 同时, 这种蛋白引导反应与陪伴蛋白浓度呈正相关. 四种纯化的陪伴蛋白重新组成的蛋白引导活性较网状细胞裂解物要低, 可能是二者动力学差异所致. 适当延长作用时间, 可以使陪伴蛋白的引导活性提高. p23 可以提高蛋白引导的重新组成. 与 RT 的催化活性有关, 失去了活性位点的突变 RT 完全没有蛋白引导的作用^[23]. Park et al 研究证明 HSP90 可以被抗 -HSP90 抗体抑制; 在体外 HSP90 被含有 1% NP-40 的 1 M 氯化钠解吸后几乎完全失去了对在昆虫细胞内表达的 HBV 聚合酶的引导活性. 人 HBV 聚合酶与前基因组 RNA 结合与鸭 HBV 聚合酶不同, HSP90 不仅维持人 HBV 聚合酶与前基因组 RNA 结合的联合体, 而且使 HBV 聚合酶能胜任在体外引导作用. HSP70 是 HSP90 联合体组成成分, 但 HSP70 可能直接与 HBV 聚合酶结合不需要 HSP90 参与^[24]. 构建杆状病毒载体 pFPoIE, 编码人 HBV 聚合酶开放读码框架(ORF)和 3' - 非翻译区(NTR)含有 DR2、DR1 和 ϵ 茎环, ϵ 茎环对引导 HBV 复制起模板作用. 构建的含 HBV 聚合酶的重组质粒经 M2 琼脂珠纯化, SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染后, 可得一条约 60 kDa 的蛋白质带, 经 N- 末端氨基酸测序及 BLAST 程序进行同源性分析, 然后进行免疫斑点分析和体外引导试验, 结果提示陪伴蛋白(chaperonin)HSP60 与 HBV Pol 之间有特异性的相互作用关系. HSP60 与 HBV 聚合酶相互作用, 是使 HBV 聚合酶变成活性状态的重要阶段. HSP60 在体外强烈影响 HBV 聚合酶活性. (1) 通过蛋白特异性抗体封闭 HSP60, 可降低 HBV 聚合酶活性; (2) 在 ATP 存在的情况下增加 HSP60, 可提高聚合酶活性; (3) ATP 与 HSP60 共同激活 HBV 聚合酶. 体内试验显示, 通过 C Δ 540(变异的 HSP60)抑制细胞内的 HSP60, 可导致 HBV 聚合酶活性的降低. 因此, HSP60 与 HBV 聚合酶相互作用对激活 HBV 聚合酶是有明显意义的^[25]. 进一步在昆虫细胞中使用重组杆状病毒表达聚合酶的几个删除突变的蛋白, 然后用 M2 免疫共沉淀, 显示 HSP60 结合到 HBV P 需要两个在 Pol 上的最小位点: TP(1-199 aa) 和 RH(680-842 aa). 在人的 HBV 宿主细胞 HepG2 中显示 HBV Pol 也可以与 HSP60 结合; HSP60 通过与 TP 和 RH 位

点结合激活 HBV Pol，而 Pol 与 HSP60 结合不需要前基因组 RNA^[26]。

3 RNase H 与病毒复制

Walton et al 认为核糖核酸酶(RNase H) 在HBV复制过程中能识别并有效裂开 DNA-RNA 杂交的 RNA 链，但是缺乏序列选择性。然而，DNA-RNA 杂交链的构成又需要特异性的序列识别。在这种前提下，为了解与靶 RNA(共价连接到 RNase H)互补的反义寡核苷酸能否用于引导 RNase H 进行特异性杂交链的裂开。DNA 寡核苷酸与 RNase H 联合使得核糖核酸酶活性对HBV mRNA 具有特异性。一个改良的，对 HBV mRNA 的 DR1 是特异性的 13 碱基寡核苷酸，用水溶性交联剂与改良的大肠杆菌 RNase H 连接。含 1 200 碱基，包括 DR1 的 HBV RNA 片段被合成作为 T7 RNA 聚合酶的底物。RNase H- 寡核苷酸交联物与 HBV mRNA 裂开产生的 RNA 片段在不同浓度下发生反应，在最合适条件下 85% 的底物裂开，用于对照的包括单用 RNase H、寡核苷酸和无裂解活性的不相关的 mRNA 底物。RNase H 与 HBV 反义寡核苷酸连接能特异性裂解靶 HBV 片段^[27]。HBV 虽然是 DNA 病毒，但其复制需要 HBV 多聚酶基因编码的逆转录酶，而 HBV 多聚酶的生化结构不能从核壳体释放酶活性蛋白。Qadri et al 用酵母为基础的遗传学方法表达 HBV 逆转录酶。通过 HBV 逆转录酶基因替代酵母逆转座子 (retrotransposon) Ty1 成分的逆转录酶产生杂交的 Ty1/HBV。另外，构建了与杂交 Ty1/HBVRT 的转录物反义方向的指示基因 his3AI。his3AI 的拼接、Ty1/HBVRT RNA cDNA 的合成及整合都依赖于逆转录酶的活性，Ty1/HBVRTHis3AI 转录物被同源性重组或整合酶介导的插入和之后的 HIS3 基因的表达，由一系列的逆转录产生的组氨酸原养型微生物(prototrophs)产物。用这种方法成功地检测内源性 Ty1 表达缺陷的酵母菌中 HBV 逆转录酶活性，同负链 DNA 合成的具有蛋白引导活性的 HBV 多聚酶是一致的。HBV 逆转录酶或 RNase H 的删除，可以导致组氨酸原养型微生物的明显减少，在体外由逆转录酶刺激的病毒样颗粒内 HBV 编码的 HBx 蛋白成倍增加。再者，在拉米夫定存在条件下，没有观察到组氨酸原养型微生物(His prototrophs)的酵母组氨酸(yeast His⁺)生长。因此，这种在酵母中基因选择的方法，是安全、经济、可靠的方法，具有大量进行辅因子和 HBV 多聚酶功能抑制剂筛选的潜力^[28]。

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 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 2001:27-8
- 3 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus Assembly and Replication. *J Biol Chem* 2002; 277:24361-24367
- 4 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
- 5 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73: 4188-4196
- 6 Wang XT, Hu JM. Distinct requirement for two stages of protein-primed initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 7 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 8 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
- 9 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
- 10 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
- 11 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 40 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 12 董菁, 成军, 黄甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙肝病毒个体准种表现的初步研究. 解放军医学杂志 2002;27: 119-121
- 13 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. 慢性乙肝病毒感染患者乙肝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
- 14 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
- 15 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:301-308
- 16 Lin X, Yuan ZH, Wu L, Ding JP, Wen YM. A single amino acid in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus affects virus replication efficiency. *J Virol* 2001;75:11827-11833
- 17 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 18 Beck J, Nassal M. Reconstitution of a functional duck hepatitis B virus replication initiation complex from separate reverse transcriptase domains expressed in Escherichia coli. *J Virol* 2001;75:7410-7419
- 19 Lott L, Beames B, Notvall L, Lanford RE. Interaction between hepatitis B virus core protein and reverse transcriptase. *J Virol* 2000;74:11479-11489
- 20 Cho G, Park SG, Jung G. Localization of HSP90 binding sites in the human hepatitis B virus polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:191-196
- 21 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
- 22 Hu JM, Anselmo D. In vitro reconstitution of a functional duck hepatitis b virus reverse transcriptase: posttranslational activation by HSP90. *J Virol* 2000;74:11447-11448
- 23 Hu JM, Toft D, Anselmo D, Wang XT. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol* 2002;76:269-279
- 24 Park SG, Kyung RJ, Jung G. HSP90 makes the human HBV Pol competent for in vitro priming rather than maintaining the human HBV Pol/pregenomic RNA complex. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:99-107
- 25 Park SG, Jung GH. Human hepatitis b virus polymerase interacts with the molecular chaperonin HSP60. *J Virol* 2001;75: 6962-6968
- 26 Park SG, Lim SO, Jung G. Binding site analysis of human HBV pol for molecular chaperonin, HSP60. *Virology* 2002; 298:116-123
- 27 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
- 28 Qadri I, Siddiqui A. Expression of Hepatitis B Virus Polymerase in Ty1-his3AI Retroelement of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1999; 274: 31359-31365

乙型和丙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节作用

王春花,成军,郎振为,张黎颖,王建军,杨倩,纪冬,党晓燕

王春花,成军,张黎颖,王建军,杨倩,纪冬,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

郎振为,首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100054

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

项目负责人: 成军, 10039, 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 cji@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

王春花,成军,郎振为,张黎颖,王建军,杨倩,纪冬,党晓燕. 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节作用. 世界华人消化杂志 2004;12(4): 928-932

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/928.asp>

0 引言

细胞凋亡(apoptosis)又称细胞程序化死亡(programmed cell death, PCD), 是细胞死亡形式之一, 他以细胞DNA发生特异性的降解, 形态上表现为核固缩、胞膜发泡和凋亡小体形成为特征. PCD由天门冬氨酸(Asp)特异性半胱氨酸(Cys)蛋白酶(Caspase-specific cysteinyl proteinase), 即胱冬肽酶(Caspase或Casp)家族介导. 活化的胱冬肽酶触发酶级联效应, 引起染色体DNA的降解及细胞解体^[1]. 胱冬肽酶家族是PCD过程的关键元件, 他的激活与超常表达均引起细胞凋亡, 因此又称死亡蛋白酶, 他们通过与众多蛋白质因子的相互作用调控PCD. 近来大量的研究表明, 胱冬肽酶家族触发的细胞凋亡在肝细胞损伤过程中发挥重要作用, 例如有研究间接认为暴发性肝炎的发生与细胞凋亡有关^[2], 并且慢性乙型肝炎与慢性丙型肝炎患者肝活检标本中, 肝细胞凋亡率明显高于正常人, 前者在平均6%左右, 后者在1%以下, 两组在统计学上有显著差异. 慢性病毒性肝炎病理改变中常见嗜酸性小体, 局灶性死亡, 现在认为均是细胞凋亡的典型表现, 而且, 经干扰素 α (IFN α)治疗后, 肝脏的凋亡情况明显改善, 肝功能发生好转^[3]. 这些都提示细胞凋亡与慢性病毒性肝炎有关. 许多研究越来越显示肝炎病毒蛋白通过对胱冬肽酶家族基因表达的调节而参与了肝细胞的凋亡过程.

1 胱冬肽酶蛋白酶家族

1.1 胱冬肽酶蛋白酶家族的结构以及生物学特性 胱冬肽酶蛋白酶家族也称为ICE/CED-3家族^[4], 是一组与细胞因子成熟和细胞凋亡有关的蛋白酶, 是美丽隐杆线虫(*caenorhabditis elegans*)死亡基因CED-3的同源物. 胱冬肽酶蛋白酶家族是新一族细胞凋亡蛋白酶, 在细

胞凋亡过程中起“刽子手”的作用. 该家族的主要特征: 活性是由活性中心的半胱氨酸上的巯基发挥的, 所以属于半胱氨酸酶类. 这个家族的蛋白酶具有特异地在特定的氨基酸序列中将肽链从天门冬氨酸之后切断的活性; 与线虫主要死亡基因CED-3编码的蛋白CED-3的氨基酸序列有29%的同源性. 在含有半胱氨酸活性位点的氨基酸残基是保守的, 都为QACRG5肽.

未活化的胱冬肽酶家族蛋白酶是以酶原形式存在的, 酶原的氨基端有一段被称为“原结构域”(pro-domain)的序列. 酶原活化时不但要将原结构域切除, 并且要将剩余部分剪切成一大一小两个亚基, 分别称为p20和p10, 活性酶就是由这两种亚基以(p20/p10)2的形式组成的. 这种活化反应也是Asp特异的, 剪切发生在酶原中保守序列的Asp与其后的氨基酸残基之间, 一般是先切下羧基端的小亚基, 然后再从大亚基的氨基端切去原结构域. 这种剪切可以是酶原及中间活性酶自我催化, 也可以是其他白介素-1 β 转换酶(ICE)家族蛋白酶的作用, 还有其他酶类如颗粒酶B参与.

已命名的胱冬肽酶家族成员均已克隆成功, 他们不但在氨基酸序列上具有同源性, 而且在空间结构上也很相似. 目前已经获得了胱冬肽酶-1(ICE)和胱冬肽酶-3(CPP32)的X线结晶图像, 结果显示他们具有相似的空间结构, 在p20的C-端和p10的N-端有200多个氨基酸残基的序列尤为保守, 在空间结构上组成相似的 β 折叠中心和相邻的 α 螺旋, 保守的、对蛋白酶活性有特殊意义的氨基酸残基均位于这一段, 并形成特定的结构. 不同源的序列主要存在于p20的N-端和p20与p10交界处, 这两个部位的氨基酸残基在蛋白酶活化过程中一般被全部或部分切除.

所有的成员都保守性地包含有与底物P1Asp作用的氨基酸残基, 如在ICE中, 他们是催化中心的Cys285, 与酶/抑制剂复合物的巯基半缩醛以氢键结合的His237, 以及可以稳定反应中间物氧阴离子的Gly238. 另外, Arg179、Arg341、Gln383和Ser347形成容纳P1Asp的“口袋”, Ser339靠近Cys285的巯基, 以氢键结合P1位的酰胺. 与P2-P4作用的氨基酸残基则变异比较大, 这可能是各个成员识别不同底物的特异性之所在. 在活性Cys周围的氨基酸序列也很保守, 一般都有Gln-Ala-Cys-Arg-Gly(QACRG)五肽序列, 在胱冬肽酶-8、胱冬肽酶-10中为QACQG, 在胱冬肽酶-9中是QACGG, 这三个成员都有一个氨基酸残基的变异, 但这种变异不影响蛋白酶的剪切活性和特异性.

1.2 胱冬肽酶蛋白酶家族成员及其生物学效应 经过近几年的工作, 目前已经从人和动物细胞中克隆到10几种这样的蛋白酶. 1996年Alnemri et al^[4]提出将人源性的ICE/CED-3蛋白酶统一命名为“天门冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶”, 即胱冬肽酶, 将已经克隆出来的ICE蛋白酶依次命名为胱冬肽酶-1至胱冬肽酶-14, 其中

胱冬肽酶 11、12 鼠类同系物尚未在人类细胞中发现。胱冬肽酶 p 按功能为启动子胱冬肽酶(胱冬肽酶 - 2、8、9、10)和效应子胱冬肽酶 - 3、6、7)。效应子被启动子激活，执行最终的亡效应。而启动子胱冬肽酶则被特定的结合蛋白、其胱冬肽酶及本身激活^[5]。这些结合蛋白质将凋亡信号和胱冬肽酶联系起来，决定两种基本凋亡途径，即线体途径和死亡受体途径。按照结构同源性的大小，可以将胱冬肽酶蛋白酶分为3个组，即胱冬肽酶 - 1、4、5、11，胱冬肽酶 - 3、6、7、8、10 以及胱冬肽酶 - 2、9，分别以胱冬肽酶 - 1、胱冬肽酶 - 2 和胱冬肽酶 - 3 为代表。其中胱冬肽酶 - 1 即 ICE，ICE 基因定位于染色体 11q13-23，编码的 ICE 前体(pro-ICE)全长 404 aa，约 45 kD，蛋白酶活性中心是位于 283-287 aa 位置的 Gln-Ala-Cys-Arg-Gly (QACRG) 五肽序列，其中 Cys285 是发挥酶切活性的关键残基。ICE 最初是从人单核细胞 THP-1 中分离得到的，可以将 34 kD 的 IL-1 前体(pro-IL-1)剪切为 17 kD 的成熟 IL-1，这种剪切对于 IL-1 活性的发挥是必须的。不表达 ICE 的细胞系转化白介素 - 1(IL-1)基因后可以产生前 - IL-1，但不能分泌有活性的成熟 IL-1；ICE 特异性抑制剂可以阻断金黄色葡萄球菌刺激引起的 IL-1 的分泌。在小鼠成纤维细胞中过度表达引起细胞凋亡，而牛痘病毒基因 CrmA (cytokine response modified antigen)^[6] 和哺乳动物的原癌基因 Bcl-2 可特异地抑制 ICE 介导的细胞凋亡。胱冬肽酶 - 1 以前体形式存在于胞质，他的激活依赖胱冬肽酶 - 11。胱冬肽酶 - 11 过度表达同样诱导感染细胞凋亡，其凋亡诱导作用也被 CrmA 和 Bcl-2 对抗。胱冬肽酶 - 11 似乎特异地激活胱冬肽酶 - 1，实验表明，缺乏胱冬肽酶 - 11 时，胱冬肽酶 - 1 的作用消失^[7]。

胱冬肽酶 - 3 又分别命名为 CPP32(cysteine protease protein, 32kD)、pICE、凋亡素 (apopain) 和 Yama(印度传说中的死亡之神)，现在一般认为胱冬肽酶 - 3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶，也是细胞毒 T 淋巴细胞(CTL) 细胞杀伤机制的重要组成部分。前 - 胱冬肽酶 - 3 含有 277 aa，分子量约 32 kD，与 ICE 有 30% 同源性，与 CED-3 有 35% 同源，是胱冬肽酶家族中与 CED-3 同源性最高的，不论从结构同源性还是从底物特异性来看都与 CED-3 很相似，所以有人认为他是 CED-3 在哺乳动物中的同源蛋白。胱冬肽酶 - 3 的原结构域明显短于 ICE 只有 28 aa，但蛋白酶活性中心和与结合底物有关的保守的氨基酸均与 ICE 一致。胱冬肽酶 - 3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用，胱冬肽酶 - 3 基因转染昆虫 Sf9 细胞后引起细胞凋亡，这个过程可以被 Bcl-2 阻断；在发生凋亡的细胞提取液中去除胱冬肽酶 - 3 后，这些提取液就失去了诱导细胞凋亡的能力；再加入纯化的胱冬肽酶 - 3 后他就又恢复了致凋亡的功能。胱冬肽酶 - 3 可以被多种因素活化，在 CTL 细胞的杀伤作用中，他既可被 Fas/FasL 途径活化，也可以通

过颗粒酶 B 途径活化。胱冬肽酶 - 3 最主要的底物是多聚 (ADP - 核糖) 聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP)，该酶与 DNA 修复、基因完整性监护有关。

胱冬肽酶 - 8 曾分别命名为 FLICE(FADD-like ICE)、MACH(MORT1-associated CED-3 homolog) 和 Mch5 (mammalian ced homolog 5)。胱冬肽酶 - 8 前体共有 479 aa，分子量为 55 kD，其显著的特点是在 N - 端有 2 个 70 aa 左右的结构域，与 FADD 的 N - 端的死亡效应结构域 (death effector domain, DED) 同源，这种同源的结构域可以发生相互聚合，提供了胱冬肽酶 - 8 与 FADD 相互结合的一个部位^[8]。正由于胱冬肽酶 - 8 具有 FADD 样 DED 结构域，并且能够通过 DED 结构域与 FADD 结合，所以胱冬肽酶 - 8 可以在凋亡过程中间接与细胞膜受体发生联系，从而将细胞膜事件转化为细胞质事件。他们认为，在非活化情况下胱冬肽酶 - 8 的两个 FADD 样 DED 结构是互相结合在一起的。当细胞膜表面的 Fas 与其配体 FasL 或相应的单抗结合后，受体发生多聚化，引起 FADD 与受体胞质区死亡结构域互相结合。这种结合使 FADD 的 DED 结构域发生变构，变构后的 DED 可以与胞质中胱冬肽酶 - 8 的一个 DED 结构域结合，使胱冬肽酶 - 8 的两个 DED 结构域分开，同时使胱冬肽酶 - 8 的 ICE 同源区释放出来，恢复蛋白酶活性，通过自我催化生成活性形式的胱冬肽酶 - 8 蛋白酶，后者再作用于胞质中其他 ICE 家族蛋白酶，使他们发生逐级活化。

1.3 胱冬肽酶家族蛋白酶在细胞凋亡中的活化顺序 胱冬肽酶蛋白酶在死亡受体介导的细胞凋亡中起着中心的作用^[9]。Fas 与配体结合而活化后，首先引起 YVAD 和 zVAD 敏感的 ICE 家族蛋白酶活化，然后再活化 DEVD 敏感的蛋白酶。其中胱冬肽酶 - 8 是这一凋亡过程中首先被活化的 ICE 家族蛋白酶。胱冬肽酶 - 8 活化后，一方面他可以剪切活化胱冬肽酶 - 3、胱冬肽酶 - 7、胱冬肽酶 - 4、胱冬肽酶 - 9 和胱冬肽酶 - 10，通过这些蛋白酶剪切底物使凋亡得以进行；另一方面，他的活性可以被 CrmA 所抑制，藉此可作为细胞凋亡负调控因素作用的环节。胱冬肽酶 - 8 的活化可以是 Fas 与其配体结合引起的 FADD 蛋白与胱冬肽酶 - 8 结合的结果，也可能是颗粒酶 B、ICE 等作用的结果。所以其他能够引起细胞凋亡的因素也可以通过激活颗粒酶 B 或 ICE 来激活凋亡信号转导途径。胱冬肽酶 - 8 活化后引起胱冬肽酶 - 3 和胱冬肽酶 - 7 活化，这两种酶都可以剪切 PARP，引起 DNA 的降解。另外胱冬肽酶 - 3 还可以活化胱冬肽酶 - 6，后者可以降解层蛋白 B。此外，U1 核糖体蛋白的 70 kD 亚基(U1-70 K)、DNA 依赖的蛋白 (DNA-PK) 的催化亚基、微丝相关蛋白 Gas-2、β - 肌动蛋白、蛋白激酶 Cd(PKCd)、视网膜母细胞瘤蛋白、DNA 拓扑异构酶 I 和 II 等也都可能作为胱冬肽酶 - 3 和胱冬肽酶 - 6 的作用底物。在哺乳动物细胞的凋亡过程中胱冬肽酶 - 3、6、7 是与 CED-3 最相似的蛋白酶，他

们完成了大部分剪切底物的作用，发挥了CED-3在秀丽线虫中发挥的作用^[10]。

目前认为，能够将细胞膜事件与细胞质事件联系起来的蛋白质除了FADD/胱冬肽酶-8通路外还有其他形式，新发现的胞质蛋白CRADD可以将RIP与胱冬肽酶-2联系起来。另外，胱冬肽酶-10和胱冬肽酶-9都已被证明可以在凋亡信号传导过程中先于其他蛋白酶活化，并通过其酶活性将信号传给其他胱冬肽酶蛋白酶。其他ICE家族蛋白酶虽然也在不同程度上参与凋亡过程，但具体细节还不十分清楚，他们可能是在不同细胞和组织起作用，也有可能是作为后备机制辅助上述途径的进行。

2 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节

2.1 丙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节

丙型肝炎病毒(HCV)隶属于黄病毒科，是非甲非乙型肝炎的主要病原体。大约50%的感染患者转为慢性，最常见为慢性活动型肝炎，最终可以发展为肝硬化和肝细胞癌。在肝细胞受到损伤时，有些被称为死亡因子的细胞因子被激活，如Fas L/Fas抗体，肿瘤坏死因子α(TNFα)、转化生长因子β1(TGFβ1)、干扰素γ(IFNγ)等，通过与靶细胞上的受体结合，引起凋亡的发生。已有研究报道暴发性肝炎^[2]和慢性病毒性肝炎^[3]的发生均与细胞凋亡有关。无论是受体介导的传导，还是通过颗粒-排粒途径，细胞凋亡时，在引起DNA降解之前几乎都存在一个共同的通路，即靶细胞内的胱冬肽酶的激活，尤其是胱冬肽酶-3的激活最为重要^[11]。为了阐明作为凋亡关键执行者的胱冬肽酶蛋白酶家族是否参与了HCV感染的发病机制以及胱冬肽酶的活性如何作用导致肝损伤，Bantel et al^[12]运用免疫组织化学和Western blot检测了胱冬肽酶-3，胱冬肽酶-7和PARP三者截短型的活性形式，而非胱冬肽酶和PARP的非活化前体形式。作者发现对比正常对照，HCV患者的肝小叶中胱冬肽酶的活性是明显升高的。有趣的是这些免疫反应细胞还没有表现出明显的凋亡形态。胱冬肽酶的活性程度和疾病的分级显著相关，例如炎症坏死度。相反，与其他的一些常用的代表指标没有相关性，例如血清转氨酶和病毒载量。在炎症分度为0活检标本中只有7.7%的肝细胞检测出胱冬肽酶-3的活化，而炎症分度为3活检标本中有20.9%的细胞染色阳性。这些资料表明胱冬肽酶蛋白酶家族的活化参与了HCV相关的肝损伤。而且，对于胱冬肽酶的活性检测可作为早期肝损害的一种可靠的指示标签，这可能会开辟针对HCV感染的新诊断和治疗策略。

持续性的HCV感染经常进展为慢性肝炎，肝硬化和肝细胞肿瘤。现在普遍认为，抗肿瘤药的抗癌机制之一为抗肿瘤药诱导肿瘤细胞发生凋亡。也有文献报道抗肿瘤药也可诱导正常肝细胞凋亡，如Tsuki-date et al^[13]发现，经秋水仙碱与长春新碱处理后的体外培养的肝

细胞，出现细胞凋亡所具有的典型的生化学特征，即梯状DNA电泳图谱。联系到许多抗肿瘤药的肝毒性，不难推测肿瘤的发生与细胞凋亡的抑制有关。HCV抑制细胞凋亡的机制已报道有多种。

HCV可通过自身的病毒蛋白抑制Fas介导的凋亡而造成持续感染。Machida et al^[14]利用能表达核心蛋白、E1、E2和NS2蛋白的HCV转基因鼠来研究HCV蛋白对Fas信号的作用影响。HCV转基因鼠的转基因表达可导致对致死量的Fas抗体的耐受。在表达HCV蛋白的小鼠肝脏中凋亡细胞明显减少。病理组织学和DNA片断分析揭示了HCV蛋白抑制Fas介导的细胞凋亡。通过检测胱冬肽酶活性，发现HCV蛋白能抑制胱冬肽酶-9和-3/7而非胱冬肽酶-8的活性。在表达HCV蛋白的小鼠中细胞色素C从线粒体的释放受到抑制。这些资料表明HCV蛋白可通过压制细胞色素C从线粒体的释放因而抑制胱冬肽酶-9和-3/7的活性，而直接或间接抑制Fas介导的凋亡和死亡。

借助增强肝细胞自身的凋亡抑制剂的活性而逃避凋亡，造成持续感染。Otsuka et al^[15]采用瞬时转染了HCV核心蛋白的HepG2细胞系来研究核心蛋白对于细胞凋亡的作用机制。首先发现核心蛋白能抑制位于胱冬肽酶-8下游和胱冬肽酶-3上游的凋亡级联反应。其次在表达核心蛋白的细胞中，bcl-xL的mRNA水平是增高的，并进一步发现是由于核心蛋白通过细胞外调节激酶途径增强了bcl-xL启动子的活性。作者认为核心蛋白通过增强bcl-xL的表达从而抑制胱冬肽酶-3活性，可以在线粒体水平上抑制细胞凋亡。

在HCV感染期间，核心蛋白可通过促进免疫细胞的凋亡，减弱免疫细胞的免疫清除杀伤功能有利于HCV的持续感染。Hahn et al^[16]将核心蛋白瞬时稳定转染到人类T淋巴细胞系Jurkat中，研究发现对比转染空载体DNA的对照细胞，表达核心蛋白的Jurkat细胞对Fas介导的凋亡敏感性增加。并证实核心蛋白结合到胞质中的Fas结构域可以增强Fas介导的凋亡下游信号。核心蛋白的表达不改变细胞表面Fas的表达，这表明表达核心蛋白的细胞对Fas配体敏感性增加并不是由于Fas的表达上调。而且，作者还观察到表达核心蛋白的细胞中胱冬肽酶-3的活性增强。

HCV可保护肝细胞逃避机体细胞因子介导的凋亡。Ghosh et al^[17]研究发现表达NS5A的HepG2细胞表现出对TNFα介导的凋亡过程的抑制作用。NS5A蛋白可阻断胱冬肽酶-3的激活，抑制对凋亡作用底物PARP的蛋白水解作用。作者认为NS5A蛋白可保护细胞免于TNFα介导的凋亡。HCV肝炎病毒蛋白之间可借助胱冬肽酶家族蛋白酶相互作用，传达调控信号完成发病机制的一系列级联反应。Goh et al^[18]利用酵母双杂交系统筛选发现HCV核心蛋白和NS5A间存在着一种新的相互作用，并在体外通过结合试验和免疫共沉淀加以证实。有趣的是，当核心蛋白和NS5A共表达于哺乳动物细胞中时，

NS5A被剪切成特定大小的片断. 核心蛋白的过度表达产生了许多濒临死亡的圆形细胞, 可见到诸如DNA阶梯和截短型PARP1(poly ADP-ribose polymerase 1), 而二者都是凋亡的指示信号. 进一步发现NS5A的蛋白水解和这些凋亡事件能被胱冬肽酶抑制剂Z-VAD所抑制, 这暗示着核心蛋白诱导凋亡, NS5A能被胱冬肽酶剪切. 作者认为在HCV感染细胞中, 核心蛋白可能提供了内部的凋亡信号, 产生截短型的NS5A. 核心蛋白-NS5A这种相互作用以及NS5A剪切体下游的生物学功能, Satoh et al^[19]进行了更深入的研究, 发现这种截短型的NS5A与核定位有关, 并参与了宿主细胞的转录调节.

2.2 乙型肝炎病毒蛋白对胱冬肽酶基因表达的调节 乙型肝炎病毒的慢性感染是引发人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要危险因子. HCC的发生似乎与凋亡密切相关, 凋亡过程的中断可能导致HCC的发生. 已有相关多种报道HBV可通过干预肝细胞的凋亡机制, 造成肝炎病毒的持续性感染而诱发HCC. 例如, TNF相关性凋亡的配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)在多种癌症中能继续诱导凋亡. TRAIL也是一种临床癌症治疗药物. Yano et al^[20]研究发现在HBV相关性HCC中, 肿瘤组织中胱冬肽酶-3的活性和TRAIL-R1、-R2的表达明显低于邻近的非肿瘤组织. HBV相关性HCC揭示了能显著性抑制胱冬肽酶-3的活性, 抑制凋亡. TRAIL-R1、-R2表现出与胱冬肽酶-3的活性协调一致的相关性, 均与HCC的凋亡机制紧密相连. 生存素(survivin)作为一种抗凋亡蛋白在绝大多数人类肿瘤中是过度表达的. Marusawa et al^[21]发现其能与细胞内HBxAg结合蛋白(hepatitis B X-interacting protein, HBXIP)形成复合物, HBXIP最初被发现是因为其能与HBX蛋白相互作用. 生存素-HBXIP复合物, 而并非单独的生存素或HBXIP, 能结合到前-胱冬肽酶-9阻止其募集到APAF1上, 从而选择性抑制线粒体/细胞色素C介导的凋亡过程. 病毒的HBxAg蛋白也能与生存素-HBXIP复合物结合, 通过生存素依赖途径从而抑制胱冬肽酶的活化. 这样HBXIP作为生存素的协同因子, 在细胞凋亡机制和病毒病原体所致的肝细胞致癌作用间充当了桥梁连接作用. Yeh et al^[22]筛选鉴定出台湾肝癌患者中普遍存在着新型突变体HBx-A31, 并且发现在HepG2细胞中这种突变体增强TNF α 诱导升高的CPP32/胱冬肽酶-3活性的作用是减弱的. 作者认为这种突变体是病毒逃避免疫监督的一种策略, 并有助于多步肝细胞致癌过程.

除了通过抑制凋亡致病外, 调控肝细胞对凋亡机制超敏也是HBV造成肝细胞损伤的发病机制之一. Kim et al^[23]发现HBX蛋白表达能针对TNF α 和抗-Fas的治疗产生胱冬肽酶-8和胱冬肽酶-3的过度激活, 这种激活导致对凋亡机制敏感. 作者报道HBX与c-FLIP(cellular FLICE inhibitory protein)共定位于胞质并能直接

相互作用, 而c-FLIP是死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC)的一个关键调节因子. c-FLIP的过度表达能保护细胞免于HBX介导的凋亡. 并且, c-FLIP以及胱冬肽酶-8抑制剂也能保护细胞免于HBX介导的凋亡. 这些资料表明HBX能废止c-FLIP的凋亡抑制功能, 从而导致细胞即使在阈值浓度以下也对TNF α 凋亡信号产生超敏反应. 该研究为HBV感染者出现肝内细胞生长下调现象提供了一个新的发病机制, 并为干预HBV相关的肝脏肿瘤和疾病的治疗策略提供了新的靶位.

近来的研究多认为肝炎病毒引起的肝细胞损伤与细胞凋亡有密切的关系, 抑制或促进肝细胞凋亡都可以是肝炎病毒的致病机制. 作为凋亡信号传递途径中特殊的死亡信号分子胱冬肽酶家族, 其与肝炎病毒蛋白间的相互作用也日益受到人们的关注. 阐明肝炎病毒蛋白调节胱冬肽酶家族基因表达的机制, 可望为研制凋亡干预剂提供方向. 虽然在这一方面研究仍处在体外实验及动物实验水平, 但是随着研究的深入各种凋亡干预剂的运用可望为临幊上各种病毒性肝病的防治提供新的思路, 探索新的路径.

3 参考文献

- 1 欧阳植庭. 上皮细胞钙粘素及其与肿瘤的关系. 中国现代医学杂志 1999;9:32-34
- 2 Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis* 1998;18:105-114
- 3 Lau JY, Xie X, Lai MM, Wu PC. Apoptosis and viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1998;18:169-176
- 4 Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171
- 5 李志英, 向阳, 杨秀玉. 表皮生长因子受体及mm23-H1在滋养细胞肿瘤中表达的相关性及临床意义. 中华肿瘤杂志 2000;6:500-501
- 6 Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14486-14491
- 7 Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E, Yuan J. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 1998;92:501-509
- 8 Srinivasula SM, Ahmad M, Ottlie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFRI-induced apoptosis. *J Bio Chem* 1997;272:18542-18545
- 9 Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95-and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 1997;186:25-37
- 10 Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239-2244
- 11 Jeon BS, Kholodilov NG, Oo TF, Kim SY, Tomaselli KJ, Srinivasan A, Stefanis L, Burke RE. Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem* 1999;73:322-333
- 12 Bantel H, Lugering A, Poremba C, Lugering N, Held J, Domschke W, Schulze-Osthoff K. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:758-767

- 13 Tsuki-date K, Yamamoto K, Snyder JW, Farber JL. Microtubule antagonists activate programmed cell death (apoptosis) in cultured rat hepatocytes. *Am J Pathol* 1993;143:918-925
- 14 Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E, Tone S, Shibasaki F, Shimizu M, Takahashi H, Hayashi Y, Funata N, Taya C, Yonekawa H, Kohara M. Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem* 2001;276:12140-12146
- 15 Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002;296:84-93
- 16 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
- 17 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death. *Virus Res* 2000;67:173-178
- 18 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
- 19 Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270:476-487
- 20 Yano Y, Hayashi Y, Nakaji M, Nagano H, Seo Y, Ninomiya T, Yoon S, Wada A, Hirai M, Kim SR, Yokozaki H, Kasuga M. Different apoptotic regulation of TRAIL-caspase pathway in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2003;11:499-504
- 21 Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003;22:2729-2740
- 22 Yeh CT, Shen CH, Tai DI, Chu CM, Liaw YF. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:5213-5220
- 23 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003;22:2104-2116

乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒蛋白对亮氨酸拉链蛋白 LZIP 的调节

刘妍,成军

刘妍,成军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心,全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金项目, No. 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, 10039, 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: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

刘妍,成军. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒蛋白对亮氨酸拉链蛋白 LZIP 的调节. 世界华人消化杂志 2004;12(4):932-935

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/932.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生密切相关。虽然 HBV、HCV 感染与肝细胞癌之间的关系已经得到确定, 但是具体的分子生物学机制还有许多工作要做。其中肝炎病毒编码蛋白对于肝细胞基因组表达的反式调节作用, 即肝炎病毒蛋白与肝细胞基因组启动子 DNA 结合, 对于肝细胞基因表达谱产生影响, 从而调节肝细胞的生长、代谢、凋亡及恶性转化, 在病毒感染致病机制中起着重要作用^[1-5]。人碱性亮氨酸拉链蛋白 LZIP 是碱性亮氨酸拉链蛋白家族重要成员之一, 在肝炎病毒致肝细胞癌发生过程中发挥重要作用。

1 LZIP 蛋白的基本结构及其功能调节

1.1 碱性亮氨酸拉链蛋白家族 碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP), 即 bZip 结构, 就是在许多细胞调控蛋白中发现的一段富含亮氨酸的序列, 这个区域易形成两亲性 α 螺旋或卷曲构象。最早发现于 CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP), C/EBP 家族的羧基端 35 个氨基酸残基具有能够形成 α 融合结构的特点, 每隔 6 个氨基酸残基即出现一个亮氨酸残基, 这就导致第 7 个亮氨酸残基都在螺旋的同一个方向出现。由于这类蛋白质都以二聚体形式与 DNA 结合, 两个分子 α 融合的亮氨酸一侧是形成二聚体的基础, 形同拉链。然而亮氨酸拉链并非直接结合 DNA, 而是以肽链氨基端富含碱性氨基酸的 20-30 个 N- 端结构域与 DNA 结合, 若不形成二聚体则这个碱性区对 DNA 的亲和力明显降低, 因此这类蛋白质的 DNA 结合结构域实际是以碱性区和亮氨酸拉链结构的整体作为基础。与 C/EBP 氨基酸序列类似, 许多转录调控蛋白如 Jun、Fos 和 myc 蛋白等, 均含有 bZip 结构, 统称为碱性亮氨酸拉链家族蛋白, bZIPs 蛋白是真核生物最大、最保守的一类转录因子^[6]。

1.2 LZIP 蛋白的基本结构 人 LZIP 蛋白是碱性亮氨酸拉链家族蛋白成员之一, 对 bZIPs 蛋白家族遗传树分析显示, LZIP 蛋白是独立的一个分支, 而不与其他 bZIPs 蛋白如 Jun、Fos、ATF1、ATF6、CREB、CREM 等形成同簇。LZIP 蛋白由 371 个氨基酸残基(aa)组成, N- 末端(1-151 aa 组成)含有宿主细胞因子 HCF-1 结合基序(host cell factor-binding motifs, HBM), HBM 由 4 个氨基酸残基组成(DHTY), 富含酸性氨基酸, Glu 或 Asp 比例约占 20.5%; 位于 LZIP 蛋白中间的是碱性亮氨酸拉链 DNA 结合区, 富含赖氨酸和精氨酸(152-171 aa 组成), 此区的作用是与 DNA 结合并可形成 α 融合; 178-220 aa 组成螺旋的螺旋功能域(coiled-coil domains), 是 LZIP 蛋白质同二聚体或异二聚体形成区域; C- 末端(221-371 aa 组成)富含脯氨酸, Pro 比例约 11%。大量的疏水氨基酸残基(亮氨酸)分散存在于两个末

- 13 Tsuki-date K, Yamamoto K, Snyder JW, Farber JL. Microtubule antagonists activate programmed cell death (apoptosis) in cultured rat hepatocytes. *Am J Pathol* 1993;143:918-925
- 14 Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E, Tone S, Shibasaki F, Shimizu M, Takahashi H, Hayashi Y, Funata N, Taya C, Yonekawa H, Kohara M. Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem* 2001;276:12140-12146
- 15 Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002;296:84-93
- 16 Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester IM, Hahn YS. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* 2000;276:127-137
- 17 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death. *Virus Res* 2000;67:173-178
- 18 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
- 19 Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 2000;270:476-487
- 20 Yano Y, Hayashi Y, Nakaji M, Nagano H, Seo Y, Ninomiya T, Yoon S, Wada A, Hirai M, Kim SR, Yokozaki H, Kasuga M. Different apoptotic regulation of TRAIL-caspase pathway in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2003;11:499-504
- 21 Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003;22:2729-2740
- 22 Yeh CT, Shen CH, Tai DI, Chu CM, Liaw YF. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000;19:5213-5220
- 23 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003;22:2104-2116

乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒蛋白对亮氨酸拉链蛋白 LZIP 的调节

刘妍,成军

刘妍,成军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心,全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
国家自然科学基金项目, No. 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, 10039, 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: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

刘妍,成军. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒蛋白对亮氨酸拉链蛋白 LZIP 的调节. 世界华人消化杂志 2004;12(4):932-935

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/932.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)的感染, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生密切相关。虽然 HBV、HCV 感染与肝细胞癌之间的关系已经得到确定, 但是具体的分子生物学机制还有许多工作要做。其中肝炎病毒编码蛋白对于肝细胞基因组表达的反式调节作用, 即肝炎病毒蛋白与肝细胞基因组启动子 DNA 结合, 对于肝细胞基因表达谱产生影响, 从而调节肝细胞的生长、代谢、凋亡及恶性转化, 在病毒感染致病机制中起着重要作用^[1-5]。人碱性亮氨酸拉链蛋白 LZIP 是碱性亮氨酸拉链蛋白家族重要成员之一, 在肝炎病毒致肝细胞癌发生过程中发挥重要作用。

1 LZIP 蛋白的基本结构及其功能调节

1.1 碱性亮氨酸拉链蛋白家族 碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP), 即 bZip 结构, 就是在许多细胞调控蛋白中发现的一段富含亮氨酸的序列, 这个区域易形成两亲性 α 螺旋或卷曲构象。最早发现于 CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP), C/EBP 家族的羧基端 35 个氨基酸残基具有能够形成 α 融合结构的特点, 每隔 6 个氨基酸残基即出现一个亮氨酸残基, 这就导致第 7 个亮氨酸残基都在螺旋的同一个方向出现。由于这类蛋白质都以二聚体形式与 DNA 结合, 两个分子 α 融合的亮氨酸一侧是形成二聚体的基础, 形同拉链。然而亮氨酸拉链并非直接结合 DNA, 而是以肽链氨基端富含碱性氨基酸的 20-30 个 N- 端结构域与 DNA 结合, 若不形成二聚体则这个碱性区对 DNA 的亲和力明显降低, 因此这类蛋白质的 DNA 结合结构域实际是以碱性区和亮氨酸拉链结构的整体作为基础。与 C/EBP 氨基酸序列类似, 许多转录调控蛋白如 Jun、Fos 和 myc 蛋白等, 均含有 bZip 结构, 统称为碱性亮氨酸拉链家族蛋白, bZIPs 蛋白是真核生物最大、最保守的一类转录因子^[6]。

1.2 LZIP 蛋白的基本结构 人 LZIP 蛋白是碱性亮氨酸拉链家族蛋白成员之一, 对 bZIPs 蛋白家族遗传树分析显示, LZIP 蛋白是独立的一个分支, 而不与其他 bZIPs 蛋白如 Jun、Fos、ATF1、ATF6、CREB、CREM 等形成同簇。LZIP 蛋白由 371 个氨基酸残基(aa)组成, N- 末端(1-151 aa 组成)含有宿主细胞因子 HCF-1 结合基序(host cell factor-binding motifs, HBM), HBM 由 4 个氨基酸残基组成(DHTY), 富含酸性氨基酸, Glu 或 Asp 比例约占 20.5%; 位于 LZIP 蛋白中间的是碱性亮氨酸拉链 DNA 结合区, 富含赖氨酸和精氨酸(152-171 aa 组成), 此区的作用是与 DNA 结合并可形成 α 融合; 178-220 aa 组成螺旋了的螺旋功能域(coiled-coil domains), 是 LZIP 蛋白质同二聚体或异二聚体形成区域; C- 末端(221-371 aa 组成)富含脯氨酸, Pro 比例约 11%。大量的疏水氨基酸残基(亮氨酸)分散存在于两个末

端序列内，与许多反式激活功能域类似。分别将 LZIP 的 N- 末端 1-154 aa 和 C- 末端 244-371 aa 与酵母 GAL4 DNA 结合域融合，在瞬时转染细胞中通过检测 GAL4 应答报告基因萤光素酶(Luc)的活性，对 LZIP 两端是否存在反式激活功能域进行研究，发现 GAL4-LZIP_{N154} 和 GAL4-LZIP_{C244-371} 均增强了下游报告基因的表达，并且 N- 末端的激活活性是 C- 末端的 2.7 倍，结果提示 LZIP 蛋白含有 2 个潜在的反式激活功能域，N- 末端的反式激活功能更强^[7]。

全长的 LZIP 蛋白定位于内质网(ER)，LZIP 蛋白 229 和 243 aa 的强疏水序列是单次跨膜功能域，将碱性亮氨酸拉链区与 C- 末端分离。另一个 bZIPs 家族成员 ATF-6 也是 ER 膜定位的转录因子，具有单一跨膜结构。DTT 是一种很强的还原剂，处理细胞后能够诱导 ER 应激(stress)应答，ATF-6 在疏水序列或近疏水序列被裂解，从而使 N- 末端和 bZIP 功能域易位到细胞核中，与 ATF-6 基因结构相似性说明 LZIP 蛋白 C- 末端也可能滞留在 ER 腔，并不参与转录激活。羧基末端截短的 LZIP(1-280 aa，含有 LZIP 完整的胞质区、跨膜功能域及 ER 腔的 31 aa)在 DTT 刺激后，仍定位于 ER 膜而不发生转位。其他 bZIPs 蛋白如 Jun、Fos、CREB、CREM、ATF1、ATF6 等 4-6 个含有亮氨酸拉链功能域，而 LZIP 的亮氨酸拉链螺旋区更长，含有 7 个亮氨酸拉链结构。LZIP 蛋白在真核细胞及组织中广泛存在，在原核中也有所发现，正常肝细胞、肝癌细胞 HepG2 以及 HCV 阳性血清患者肝组织中均表达 LZIP 蛋白^[8]。

LZIP 的碱性区域和亮氨酸拉链部分与 bZIPs 蛋白 ATF-6/CREB 亚家族的其他成员高度同源，尽管 LZIP 激活细胞的靶基因不是十分清楚，LZIP 能够与经典的 cAMP 应答元件 CRE(cAMP response elements)同源二聚体结合，激活含有 CRE 的报告基因的转录。cAMP 对基因表达调节的信号传导途径：胞外配体与其受体结合后，G 蛋白与活化 cAMP 环化酶产生胞内信使 cAMP，cAMP 继而活化 PKA，使异四聚体的 PKA 解离，催化亚基从而由细胞质进入细胞核内，然后使转录因子 cAMP 应答元件结合蛋白 CREB(cAMP response element binding protein, CREB)在 N- 端转录活性区附近的 Ser133 磷酸化活化，磷酸化的 CREB 即可与 DNA 分子上 cAMP 调节靶基因附近的异端称为 CRE(cAMP response element)的回文序列(TGACGTCA)结合，从而起调节靶基因的作用。此外，磷酸化的 CREB 可被蛋白磷酸酶 PP-1 脱去 Ser133 的磷酸基团，从而终止 CREB 的活化，即终止 cAMP 对基因转录调节信号。受 cAMP 调节的转录因子还有 CREM I 和 II，ATF1、3、4、6 等，他们都能与 CRE 结合，都属于具有亮氨酸拉链基本结构的转录因子家族^[9]。

人 LZIP 蛋白与小鼠 LZIP2 蛋白、果蝇 BBF2/dCREB-A 蛋白以及 CREB-H 蛋白高度同源，也含有 HCF1 结合基序，即^{D/E}HXYY 四肽序列，提示 LZIP 与 HCF1 之

间的相互作用在物种进化过程中是高度保守的。BBF2/dCREB-A 蛋白能够激活果蝇脂肪体特异性增强子元件及哺乳动物肝特异性增强子元件的转录。人 LZIP 蛋白可以与 CRE 一致序列及 AP1 应答基序结合，同时加入 80 倍过剩的未标记 CRE 或 AP1 寡核苷酸后这种结合作用消失，实验还发现 LZIP 与 SP1、NF-κB、AP2 应答序列不发生结合。

1.3 细胞内 LZIP 的转录活性调节 宿主细胞因子(host cell factor-1, HCF-1)是细胞增生过程中必需的染色质相关蛋白，是单纯疱疹病毒(HSV)转录激活因子 VP16 的反式激活细胞靶基因，作用结果是刺激 HSV 病毒立即早期基因转录的一种多蛋白增强子复合物的组装，HCF-1 在所有类型细胞中表达，是细胞周期通过 G1 期向前进展的必需因子。HCF-1 还可与细胞广泛表达的碱性亮氨酸拉链蛋白 LZIP 相互作用。研究发现，HSV 的 VP16 蛋白以病毒模拟细胞转录因子 LZIP 的方式与 HCF1 相互作用，调控细胞周期进展。LZIP 和 VP16 均含有 4 个氨基酸(^{D/E} HXY，X 可以为任意氨基酸残基)的 HCF-1 结合基序(HBM)，被 HCF-1 的 N- 末端 β 螺旋桨结构功能域识别，HBM 对于 LZIP 发挥正常的反式激活功能是必需的。LZIP 蛋白的 N- 末端 1-92 个氨基酸残基含有潜在的转录激活功能域，该功能域由 3 个功能性元件组成，即 HCF-1 结合基序 HBM 和 2 个富含亮氨酸的 LxxLL 基序(11-DLLAFLL-17, 52-DLLCSLL-58)。已知 LxxLL 基序是众多转录共激活因子中共有的序列，在介导蛋白 - 蛋白相互作用，尤其是核内激素受体的识别过程中起重要作用。LZIP 是典型的序列特异性的 DNA 结合蛋白，在其 DNA 激活功能域内含有 LxxLL 基序，能够刺激基因转录活性。研究发现，LxxLL 基序突变显著降低 LZIP 的反式激活作用，但是并不影响 LZIP 与 HCF-1β 螺旋桨结构之间相互作用，表明 LxxLL 基序并不是 LZIP 与 HCF-1β 螺旋桨结构相互作用所必需，LxxLL 基序可能通过与 HCF-1 的其他区域相互作用或者募集转录激活必需的另外的细胞辅因子^[10-15]。

HCLP-1 是新近鉴定的含有 Kelch 重复结构的 HCF 样蛋白，HCLP-1 是细胞普遍表达的核蛋白，与 HCF-1 不同的是，HCLP-1 并不与 VP16 蛋白作用而是选择性的与 LZIP 相互作用，这种物理作用的结果是抑制了 LZIP 依赖的基因转录。LZIP 与 HCLP-1 优先定位于细胞核内，缺失突变分析显示，HCLP-1 蛋白结合 LZIP 蛋白的靶位位于 109-315 aa，此区含有碱性亮氨酸拉链 DNA 结合功能域。电泳泳动迁移率实验(EMSA)显示，HCLP-1 蛋白干扰了转录因子 LZIP 与其 DNA 靶点即 CRE 寡核苷酸的结合活性，并且呈剂量依赖的方式。可见 HCLP-1 是 LZIP 蛋白特异性的转录抑制因子。HCLP-1 蛋白的分子量比 HCF-1 蛋白小的多，完整的分子结构由一个 6 片 β 螺旋结构组成。在分子结构上，HCLP-1 与 HCF-1 蛋白裂解产物 HCFp50 及其相似，HCFp50 存在于 G0 期细胞的胞质中，含有完整的 β 螺

旋结构，保留了与 VP16 结合的能力。内源性的 HCLP-1 定位于间期 HeLa 细胞的胞核中，虽然不能推断在细胞周期的特定时相 HCLP-1 可能会定位于细胞质，但是从 HCLP-1 与 HCFp50 的结构相似性考虑，推测 HCLP-1 也可能在细胞周期特定时相将 LZIP 滞留于细胞质中，从而抑制 LZIP 的转录活性^[16]。

2 LZIP 与乙型肝炎病毒 X 蛋白

长度为 3.2 kb 的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因组含有 4 个开放读码框架(ORF)，前 3 个 ORF 编码病毒结构蛋白，即表面抗原、核心抗原及病毒多聚酶抗原，第 4 个 ORF 在所有哺乳动物嗜肝病毒中高度保守，编码 16.5 kD 的 X 蛋白，HBV 感染过程中 X 基因产生 1 kb 的 mRNA。X 蛋白能够直接或间接地激活各种转录因子和肿瘤基因，是慢性 HBV 感染导致 HCC 发生的重要协同因子，X 蛋白转基因鼠发生 HCC 的事实更加支持上述论点。研究发现，X 蛋白能与大多数含有 bZIP 结构的转录因子结合，如 CREB/ATF、C/EBP、ATF1/ATF2、NF-IL6 结合，增加他们的 DNA 亲和力，参与细胞转录的调控^[23-27]。

X 蛋白能与 CREB/ATF 家族的碱性亮氨酸拉链功能域相结合，这种结合增加了 CREB/ATF 与 CRE 位点的亲和性，但并不能改变 CREB/ATF 形成二聚体的速率，甲基化干扰足迹实验证实 CREB DNA 复合物与 CREB-X 蛋白复合物之间的差异，表明 CREB 的碱性亮氨酸拉链结构是 X 蛋白作用的靶点。X 蛋白也能够激活其他的 bZIPs 家族蛋白质 AP1、c-myc 等的转录活性，在病毒感染细胞信号转导及致 HCC 发生过程中具有重要意义。X 蛋白是否与人 LZIP 蛋白相互作用，对内源性 LZIP 的表达是上调还是下调，对 LZIP 蛋白的功能影响等还有待深入研究^[28-30]。

3 LZIP 与 HCV 核心蛋白

丙型肝炎病毒是 RNA 病毒，能够引起肝炎、肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌。约 10% 的 HCV 感染患者发生 HCC，全球 HCV 感染者超过 1.7 亿，也就是说约有 1 千万 HCV 感染患者具有发生 HCC 的风险。因此，阐明该病毒的恶性转化机制对于理解 HCV 感染强大的致癌潜能具有重要意义。已知，HCV 病毒基因组编码一个 3 010-3 033 aa 的大开放读码框架，多肽前体至少被加工为 10 种结构蛋白和非结构蛋白，在参与 HCV 感染相关的 HCC 发生过程的众多因素中，HCV 核心蛋白是最具有推动力的肿瘤蛋白^[17-20]。目前尚没有直接的证据证明 HCV 核心蛋白能够与 RNA 聚合酶 II 启动子直接相互作用，推测其对基因表达的调控作用间接来自与某些细胞辅助因子的相互作用。应用酵母双杂交实验在人肝 cDNA 文库中筛选 HCV 核心蛋白的结合蛋白，研究发现，HCV 核心蛋白与 LZIP 特异性相互结合，而并不与其他 bZIPs 蛋白如 CREB、ATF4、c-Jun、c-Fos

发生相互结合作用。HCV 核心蛋白 C-末端 91-191 aa 对于与 LZIP 结合是必需的，而 3 个不同截短的突变子(分别含有 1-123 aa、1-100 aa、1-75 aa)表现为微弱的甚至完全失去与 LZIP 结合的活性^[21]。

细胞 LZIP 蛋白是 HCV 核心蛋白结合蛋白，是细胞恶性转化的辅助因子。LZIP 是 cAMP 调节途径中的转录因子，在 HCV 核心蛋白存在时，LZIP 展示细胞肿瘤抑制蛋白的活性，大量实验证实 HCV 核心蛋白与 LZIP 相互作用，LZIP 是核内的 CRE 活化因子，其转录活性受 HCV 核心蛋白抑制，与 HCV 核心蛋白的特异性相互作用对 LZIP 的转录活性具有很大影响，首先，HCV 核心蛋白抑制核内活化的 LZIP 同源二聚体的形成；其次，研究显示，在 HepG2 和 HeLa 细胞中内源性 LZIP 蛋白及通过细胞转染外源性过表达的 LZIP 均优先定位于细胞核内，在表达 HCV 核心蛋白的细胞中发现，大量的核内 LZIP 重新定位于细胞质中；此外，反式显性负突变形式的 LZIP(transdominant negative form of LZIP, LZIPm2)的表达能够抑制内源性 LZIP 蛋白依赖的激活，HCV 核心蛋白对 LZIPm2 的增生活性有促进作用，上述实验表明，HCV 核心蛋白与 LZIP 结合后，由于亚细胞定位隔绝而使 LZIP 的核内转录功能失活，这种内源性 LZIP 蛋白功能缺失的结果是细胞异常增生效应，表现为 NIH3T3 细胞集落形成，非锚着依赖性生长。可见，LZIP 与已知的 2 个抑瘤蛋白 p53 和 Rb 相似，也执行肿瘤抑制蛋白的功能，在 HCV 核心蛋白致肝细胞发生恶性转化过程中具有至关重要的作用，然而，在 HCV 核心蛋白不存在的情况下，LZIP 是否发挥肿瘤抑制蛋白的功能还有待进一步研究^[21]。

研究发现，LZIP 还与人 luman 蛋白密切相关，不同的是，LZIP 是 HCV 核心蛋白在细胞内直接作用的靶位，而 luman 蛋白是单纯疱疹病毒(HSV)VP16 蛋白相关的细胞增生因子(VP16-associated cell proliferation factor, HCF)间接作用的靶位，HCF 是调控细胞增生的重要细胞因子，推测 HCF 与 LZIP 共享同样的信号途径干扰不同病毒感染的宿主细胞生长调节，导致细胞恶性增生。

我们应用基因表达谱芯片技术对 HCV 核心蛋白表达质粒 pcDNA3.1(-)-core 转染的 HepG2 细胞和空载体处理的相同细胞差异表达的 mRNA 进行检测，研究 HCV 核心蛋白上调及下调基因的表达，结果显示，HCV 核心蛋白能够下调亮氨酸拉链蛋白 LZIP 的表达，LZIP 是推定的抑癌因子，提示这种内源性 LZIP 表达水平降低，可能会导致 LZIP 肿瘤抑制功能的缺失，对阐明 HCV 核心蛋白的致瘤机制提供有力的证据^[22]。

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 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

- 3 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:33-36
- 4 Waris G. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 2003;28:311-321
- 5 Idilman R, De Maria N, Colantoni A, Van Thiel DH. Pathogenesis of hepatitis B and hepatitis C-induced hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepatitis* 1998;5:285-299
- 6 Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, Watanabe S, Tanigami A, Sugano S. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2154-2162
- 7 Luciano RL, Wilson AC. N-terminal transcriptional activation domain of LZIP comprises two LxxLL motifs and the host cell factor-1 binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:10757-10762
- 8 Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 2002;277: 13045-13052
- 9 Andrisani OM. CREB-mediated transcriptional control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999;9:19-32
- 10 Luciano RL, Wilson AC. An activation domain in the C-terminal subunit of HCF-1 is important for transactivation by VP16 and LZIP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13403-13408
- 11 Lu R, Yang P, O'Hare P, Misra V. Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor. *Mol Cell Biol* 1997;17:5117-5126
- 12 Mahajan SS, Wilson AC. Mutations in host cell factor 1 separate its role in cell proliferation from recruitment of VP16 and LZIP. *Mol Cell Biol* 2000;20:919-928
- 13 Freiman RN, Herr W. Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev* 1997;11:3122-3127
- 14 Lu R, Yang P, Padmakumar S, Misra V. The herpesvirus transactivator VP16 mimics a human basic domain leucine zipper protein, luman, in its interaction with HCF. *J Virol* 1998;72:6291-9297
- 15 Raggio C, Rapin N, Stirling J, Gobeil P, Smith-Windsor E, O'Hare P, Misra V. Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol Cell Biol* 2002;22:5639-5649
- 16 Zhou HJ, Wong CM, Chen JH, Qiang BQ, Yuan JG, Jin DY. Inhibition of LZIP-mediated transcription through direct interaction with a novel host cell factor-like protein. *J Biol Chem* 2001;276:28933-28938
- 17 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32: 405-412
- 18 Moriya K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med* 1998;4: 1065-1067
- 19 Barba G. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1200-1205
- 20 Chang SC, Yen JH, Kang HY, Jang MH, Chang MF. Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1284-1290
- 21 Jin DY, Wang HL, Zhou Y, Chun AC, Kibler KV, Hou YD, Kung H, Jeang KT. Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J* 2000;19:729-740
- 22 刘妍, 成军, 王建军, 陆荫英, 杨倩. 应用基因表达谱芯片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
- 23 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟劲松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因的克隆化研究. *中华肝脏病杂志* 2003;11:1
- 24 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 25 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. *中华肝脏病杂志* 2002;10:354-357
- 26 Mahe Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama M, Ikeda N, Matsushima K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J Biol Chem* 1991;266:13759-13763
- 27 Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- 28 Schneider TL, Schepartz A. Hepatitis B virus protein pX enhances the monomer assembly pathway of bZIP-DNA complexes. *Biochemistry* 2001;40:2835-2843
- 29 Pflum MK, Schneider TL, Hall D, Schepartz A. Hepatitis B virus X protein activates transcription by bypassing CREB phosphorylation, not by stabilizing bZIP-DNA complexes. *Biochemistry* 2001;40:693-703
- 30 Williams JS, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3819-3823

乙型和丙型肝炎病毒对c-jun基因表达调节的影响

党晓燕, 成军, 邓红

党晓燕, 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 北京市 100039

邓红, 西安交通大学第二医院传染科 陕西省西安市 710004

国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, No. C03011402

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

cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

党晓燕, 成军, 邓红. 乙型和丙型肝炎病毒对 c-jun 基因表达调节的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(4):935-937

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/935.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)不仅可引起急慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化和肝细胞癌(HCC)的发生及发展密切相关. HCC是严重危害人民健康的疾病之一, 在对 HCC 的致病机制的探索中, 原癌基因也成为研究的重点. 研究发现, HBV 和 HCV 均能调节原癌基因 c-jun 的激活与表达, 从而导致肝细胞异常增生、分化, 进而引起肝细胞癌变. 通过对肝炎病毒和癌基因 c-jun 之间关系的阐述, 有助于我们掌握肝细胞癌变的分子机制.

1 c-jun 的结构和功能

c-jun 原癌基因如同其他的癌基因, 在正常情况下不表达或只有极少水平的表达. 当受到细胞外理化因素或细胞内信号级联刺激后, c-jun 基因可被激活, 激活

- 3 陆荫英, 刘妍, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:33-36
- 4 Waris G. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 2003;28:311-321
- 5 Idilman R, De Maria N, Colantoni A, Van Thiel DH. Pathogenesis of hepatitis B and hepatitis C-induced hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepatitis* 1998;5:285-299
- 6 Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, Watanabe S, Tanigami A, Sugano S. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2154-2162
- 7 Luciano RL, Wilson AC. N-terminal transcriptional activation domain of LZIP comprises two LxxLL motifs and the host cell factor-1 binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:10757-10762
- 8 Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 2002;277: 13045-13052
- 9 Andrisani OM. CREB-mediated transcriptional control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999;9:19-32
- 10 Luciano RL, Wilson AC. An activation domain in the C-terminal subunit of HCF-1 is important for transactivation by VP16 and LZIP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13403-13408
- 11 Lu R, Yang P, O'Hare P, Misra V. Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor. *Mol Cell Biol* 1997;17:5117-5126
- 12 Mahajan SS, Wilson AC. Mutations in host cell factor 1 separate its role in cell proliferation from recruitment of VP16 and LZIP. *Mol Cell Biol* 2000;20:919-928
- 13 Freiman RN, Herr W. Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev* 1997;11:3122-3127
- 14 Lu R, Yang P, Padmakumar S, Misra V. The herpesvirus transactivator VP16 mimics a human basic domain leucine zipper protein, luman, in its interaction with HCF. *J Virol* 1998;72:6291-9297
- 15 Raggio C, Rapin N, Stirling J, Gobeil P, Smith-Windsor E, O'Hare P, Misra V. Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol Cell Biol* 2002;22:5639-5649
- 16 Zhou HJ, Wong CM, Chen JH, Qiang BQ, Yuan JG, Jin DY. Inhibition of LZIP-mediated transcription through direct interaction with a novel host cell factor-like protein. *J Biol Chem* 2001;276:28933-28938
- 17 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32: 405-412
- 18 Moriya K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med* 1998;4: 1065-1067
- 19 Barba G. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1200-1205
- 20 Chang SC, Yen JH, Kang HY, Jang MH, Chang MF. Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1284-1290
- 21 Jin DY, Wang HL, Zhou Y, Chun AC, Kibler KV, Hou YD, Kung H, Jeang KT. Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J* 2000;19:729-740
- 22 刘妍, 成军, 王建军, 陆荫英, 杨倩. 应用基因表达谱芯片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
- 23 刘妍, 成军, 陆荫英, 王刚, 牟劲松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因的克隆化研究. *中华肝脏病杂志* 2003;11:1
- 24 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 25 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV 核心蛋白与截短型 HBV 表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. *中华肝脏病杂志* 2002;10:354-357
- 26 Mahe Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama M, Ikeda N, Matsushima K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J Biol Chem* 1991;266:13759-13763
- 27 Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- 28 Schneider TL, Schepartz A. Hepatitis B virus protein pX enhances the monomer assembly pathway of bZIP-DNA complexes. *Biochemistry* 2001;40:2835-2843
- 29 Pflum MK, Schneider TL, Hall D, Schepartz A. Hepatitis B virus X protein activates transcription by bypassing CREB phosphorylation, not by stabilizing bZIP-DNA complexes. *Biochemistry* 2001;40:693-703
- 30 Williams JS, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3819-3823

乙型和丙型肝炎病毒对c-jun基因表达调节的影响

党晓燕, 成军, 邓红

党晓燕, 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 北京市 100039

邓红, 西安交通大学第二医院传染科 陕西省西安市 710004

国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, No. C03011402

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

cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

党晓燕, 成军, 邓红. 乙型和丙型肝炎病毒对 c-jun 基因表达调节的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(4):935-937

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/935.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)不仅可引起急慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化和肝细胞癌(HCC)的发生及发展密切相关. HCC是严重危害人民健康的疾病之一, 在对 HCC 的致病机制的探索中, 原癌基因也成为研究的重点. 研究发现, HBV 和 HCV 均能调节原癌基因 c-jun 的激活与表达, 从而导致肝细胞异常增生、分化, 进而引起肝细胞癌变. 通过对肝炎病毒和癌基因 c-jun 之间关系的阐述, 有助于我们掌握肝细胞癌变的分子机制.

1 c-jun 的结构和功能

c-jun 原癌基因如同其他的癌基因, 在正常情况下不表达或只有极少水平的表达. 当受到细胞外理化因素或细胞内信号级联刺激后, c-jun 基因可被激活, 激活

的c-jun基因的蛋白表达产物有3种:c-jun、junB和junD,分子量大约为40 kDa.c-jun属于碱性亮氨酸拉链蛋白质家族,他能形成同源二聚体,或者与转录因子Fos家族的成员形成异源二聚体,即转录因子AP-1.可结合DNA链上的共同序列5'-TGA(C/G)TCA-3'.c-fos和c-jun mRNA强烈诱导可导致AP-1结合的增加.c-jun在形成fos/jun或jun/jun复合物时转录活性增加.c-jun可调节数个对细胞增生、分化和凋亡重要的基因表达,从而表明AP-1在致癌机制中发挥重要作用^[1].c-jun通过抑制抑癌基因p53的作用对肿瘤细胞的凋亡进行抑制.c-jun的磷酸化在凋亡诱导的过程中发挥重要作用.c-jun近端的顺式元件AP-1位点涉及他的启动子自激活^[2].1993年Karin et al研究小组发现,一种蛋白激酶能够磷酸化c-jun,其磷酸化位点位于c-jun氨基末端活性区丝氨酸残基63和73(Ser63和Ser73),该蛋白激酶被称为c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase,JNK).紫外光、热休克及细胞因子可导致JNK的激活^[3-5],而JNK又可激活下游靶基c-jun^[6],从而有效激活下游AP-1结合活动和增加c-jun表达.表达的核蛋白c-jun能提高细胞周期蛋白的表达和细胞周期的进展^[7].

2 c-jun的激活及调控特点

c-jun的功能性激活触发了JNK信号路径导致氨基末端的磷酸化^[8].磷酸化的c-jun蛋白的活动可被翻译后调节^[9-10].原癌基因Ras的激活与氨基末端c-jun位点增加的磷酸化相关.c-jun氨基末端位点刺激新c-jun的合成^[9, 11],且c-jun氨基末端磷酸化对c-jun蛋白合成的自动刺激是重要的^[2, 12],对c-jun和Ras的转化也是重要的^[11, 13-14].JNK的激活和c-jun氨基末端磷酸化建立了一个正向调节环路促进c-jun的合成^[2, 12].新的c-jun的合成涉及活化的c-jun同源二聚体或c-jun-ATF2与c-jun启动子的结合^[15].c-jun启动子的转录反应主要由2个元素介导:Jun1与Jun2.翻译后c-jun的氨基末端磷酸化可形成c-jun-AP-1 DNA结合复合体的延伸形式.激活的c-jun蛋白的持续积累可由c-jun的转录刺激和翻译后磷酸化调控.

Nishizuka et al早在1988年就提出第二信使系列激活c-jun的途径.细胞因子、激素等刺激物作为第一信使作用于胞膜上的受体,激活膜内第二信使三磷酸肌醇、血清中性1,2-酰基甘油和Ca²⁺,进而激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC),PKC通过调节jun磷酸化水平而增强活性AP-1在转录时的活性诱导c-jun的表达,进而调节靶基因表达和转录速率,发生信使作用.由于JNKs是有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)组分之一,MAPK家族都为丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)蛋白激酶,其激活需要分子中的酪氨酸(Tyr)和Thr同时磷酸化.MAPK被激活后,也可催化c-jun磷酸化,以调节基因的转录和

mRNA的翻译.Henkler et al^[16]认为c-jun氨基末端在体内并不是细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERKs)ERK/MAPK作用的底物,ERK/MAPK路径被认为触发了Jun的磷酸化.

3 HBV对原癌基因c-jun的表达调节

HBV是嗜肝DNA病毒的一种,HBV DNA长度为3.2 kb.HBV含有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,X蛋白以及HBV DNA聚合酶.其中HBV的X蛋白能通过各种途径反式激活原癌基因,因此慢性HBV感染与肝癌的形成具有十分密切的联系.

HBV X蛋白的分子量为16.5 kDa,是一个中等而不是广泛作用的转录反式激活子.他能激活大量的细胞和病毒的基因,包括原癌基因,例如c-myc、c-Fos、c-Jun,因此调节许多宿主基因的功能,例如转录、细胞周期进展、增生、凋亡、DNA修复^[17-19].虽然HBx不直接结合于双链DNA,但核内的HBx可由结合于数个转录因子而被激活^[20],而胞质内的成分触发了细胞间的信号路径^[21].HBx的激活定位于与特异的转录因子AP-1的结合位点.Benn et al报道X序列即使切去了顶端,仍保留他的反式激活功能,表明了HBx介导的反式激活作用的重要性^[22].HBx在缺乏相应激活子的情况下不能激活DNA元件,他需要有力的激活域以共转录.一系列微弱的酸性激活域,包括c-Jun激活域,c-fos激活域的两个亚区域对HBx的作用是不起作用的,表明了HBx的效果不依赖于酸性激活域的酸性序列.Haviv et al^[23]研究表明HBx能够刺激大量增强子-启动子单位的转录,比如c-fos、c-Jun.在X蛋白存在的情况下,c-fos、c-Jun基因可更好的表达.重要的是AP-1复合体的构成在HBx的诱导过程中发生了变化,从c-fos-c-Jun异源二聚体的暂时积累转变为c-Jun同源二聚体的长期积累.

有报道表明正常肝组织中c-jun为低水平表达,但在整合HBV DNA的HCC组织中呈高水平表达^[24].有人发现c-jun对于肝癌的发展来说并不是必需的,c-jun对肝癌的促进作用只出现在HCC的发生早期.还有报道原癌基因c-jun的过度表达在HCC变的机制中发挥重要作用.HBx作为反式激活因子能激活原癌基因c-jun启动子,c-jun的调节序列可在转录水平上被HBx蛋白激活.Zhou et al^[25]研究证实HBx蛋白能显著的反式激活定位于c-jun癌基因的5'-上游的调节序列,且报道X基因的激活需要c-jun基因的AP-1序列.HBx触发了Jun氨基末端的磷酸化,HBx通过JNK信号转导级联的激活诱导c-jun基因.且仅仅野生型的HBx能诱导Jun的磷酸化,再次表明了JNK反应信号激活的激发仅仅由胞质内的HBx诱导.c-jun氨基末端的磷酸化提高了HBx的反式激活功能^[9],表明了c-jun的氨基末端转录激活域是HBx活动中的主要位点.HBx作用于

c-jun 的转录激活域不影响 c-jun 同源二聚体或 c-jun/c-fos 异源二聚体的结合. HBx 能决定 c-jun 的翻译后调节致使这个蛋白在转录激活过程更加有效. Choi et al^[26] 研究发现胰岛素刺激细胞肿瘤激活子例如 c-jun、c-fos 和 c-myc. 胰岛素可通过 HBV 增强子 I (EnI) 的 AP-1 结合位点提高 HBx 蛋白的表达. 胰岛素能提高 HBx 在 HBV 感染的 HCC 发展中的作用, 或许通过 HBx 与其他细胞原癌基因相互作用. 在 c-jun 的激活中 HBx 与癌基因 Raf-1 共同协作. Natoli et al^[27] 报道 Raf-1 的共转染决定 HBx 诱导的 c-jun 的转录活动的强烈增加. 在 HepG2 细胞系中 HBx 诱导的 AP1 的激活作用与在 c-Jun/c-Fos 异型二聚体的 DNA 结合活动中的增加相关联, 不依赖细胞系中 c-Fos 和 c-Jun 蛋白全部数量的增加, 也不依赖与 HBx 与两个蛋白之间二聚体的形成, 表明涉及了转录因子的翻译后调节.

4 HCV 对原癌基因 c-jun 的表达调节

HCV 核心蛋白是一种多功能蛋白, 不仅仅作为一种病毒结构蛋白, 而且能够影响多种细胞信号转导途径, 激活多种病毒及细胞基因启动子, 具有广泛的反式激活作用. Kim et al^[28] 报道原始的 22 kDa 的核心蛋白定位在转染细胞的细胞质, 其抑制了在所有检测的启动因子中的表达, 相反的, 截短的 HCV 核心蛋白定位在核内并不显示抑制活动. 他或许作为细胞基因表达抑制子. Soo et al^[29] 报道全长 HCV 分离株全基因组克隆的转染上调 AP-1 的结合活动和 c-jun 转录. HCV 核心蛋白在 AP-1 转录活动上的效果部分的归因于 c-Jun 氨基末端激活域的磷酸化, 也归因于 Fos 和 Jun 基因转录的诱导. Erhardt et al^[30] 研究表明 HCV 核心蛋白的表达可激活细胞外信号调节的激酶(ERK), c-jun N- 末端激酶(JNK). 这些与 c-Jun 的激活相伴随.

5 参考文献

- 1 Hartl M, Bader AG, Bister K. Molecular targets of the oncogenic transcription factor jun. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3:41-55
- 2 Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 1988;55:875-885
- 3 Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:16483-16486
- 4 Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994;76:1025-1037
- 5 Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 1996;271:24313-24316
- 6 Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000;103:239-252
- 7 Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J* 2000;19:2056-2068
- 8 Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994;369:156-160
- 9 Binetruy B, Smeal T, Karin M. Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 1991;351:122-127
- 10 Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 1991;64:573-584
- 11 Smeal T, Binetruy B, Mercola DA, Birrer M, Karin M. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 1991;354:494-496
- 12 Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129-157
- 13 Alani R, Brown P, Binetruy B, Dosaka H, Rosenberg RK, Angel P, Karin M, Birrer MJ. The transactivating domain of the c-Jun proto-oncoprotein is required for cotransformation of rat embryo cells. *Mol Cell Biol* 1991;11:6286-6295
- 14 Westwick JK, Cox AD, Der CJ, Cobb MH, Hibi M, Karin M, Brenner DA. Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6030-6034
- 15 van Dam H, Duyndam M, Rottier R, Bosch A, de Vries-Smits L, Herrlich P, Zantema A, Angel P, van der Eb AJ. Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J* 1993;12:479-487
- 16 Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshy R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 11):2737-2742
- 17 Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- 18 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
- 19 Koike K, Takada S. Biochemistry and functions of hepatitis B virus X protein. *Intervirology* 1995;38:89-99
- 20 Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- 21 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10350-10354
- 22 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- 23 Haviv I, Vaizel D, Shaul Y. The X protein of hepatitis B virus coactivates potent activation domains. *Mol Cell Biol* 1995;15:1079-1085
- 24 Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;2:1129-1133
- 25 Zhou MX, Watabe M, Watabe K. The X-gene of human hepatitis B virus transactivates the c-jun and alpha-fetoprotein genes. *Arch Virol* 1994;134:369-378
- 26 Choi BH, Park CJ, Rho HM. Insulin activates the hepatitis B virus X gene through the activating protein-1 binding site in HepG2 cells. *DNA Cell Biol* 1998;17:951-956
- 27 Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, De Marzio E, Collepardo D, Falco M, Balsano C, Leviero M. Modulation of intracellular signal transduction pathways by the hepatitis B virus transactivator Px. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 1):14-20
- 28 Kim DW, Suzuki R, Harada T, Saito I, Miyamura T. Trans-suppression of gene expression by hepatitis C viral core protein. *Jpn J Med Sci Biol* 1994;47:211-220
- 29 Soo HM, Garzino-Demo A, Hong W, Hwee Tan Y, Joo Tan Y, Goh PY, Gee Lim S, Pheng Lim S. Expression of a full-length hepatitis C virus cDNA up-regulates the expression of CC chemokines MCP-1 and RANTES. *Virology* 2002;303:253-277
- 30 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

乙型肝炎病毒对c-fos基因表达调节的影响

党晓燕, 成军, 邓红

党晓燕, 成军, 中中国人民解放军第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
 邓红, 西安交通大学第二医院传染科 陕西省西安市 710004
 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, No. C03011402
 项目负责人: 成军, 10039, 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.
 cjl@genetherapy.com.cn
 电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
 收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

党晓燕, 成军, 邓红. 乙型肝炎病毒对c-fos基因表达调节的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(4):938-940
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/938.asp>

0 引言

癌基因(oncogene)是一类编码关键性调控蛋白的正常细胞基因, 在正常情况下, 不表达或只有有限表达, 又称原癌基因(proto-oncogene). 当受到理化等因素刺激时, 他们可以异常表达, 导致细胞的增生、分化或癌变。众所周知, 乙型肝炎病毒(HBV)不仅可引起急慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化和肝细胞癌(HCC)的发生及发展密切相关。许多实验已证实肝细胞癌变过程涉及多种原癌基因的激活和突变, 其中HBV对原癌基因c-fos的激活及表达调节也越来越受到关注。通过对HBV与c-fos之间表达调节的阐述, 有助于进一步了解HBV导致HCC的分子学机制。

1 c-fos结构、功能及激活过程

c-fos原癌基因是最主要的即刻早期癌基因家族成员之一, 包括fra-1、fra-2、fosB的多基因家族中的一种。单独的c-fos基因对细胞的生长、分化可能不起主要作用。当细胞受到外界刺激时, 数十分钟即开始表达产物为55 kDa的c-Fos蛋白, 数十小时恢复至正常, 其存在于胎肝及中枢神经系统中, 半衰期短, 只有2 h。表达的c-Fos蛋白立即转位至核内, 与另一种原癌基因c-jun的表达产物c-Jun核蛋白通过亮氨酸拉链形式形成Fos-Jun异源二聚体, 即构成特异的RNA多聚酶II转录因子激活蛋白-1(activation protein-1, AP-1)^[1-7], 他可存在于不同细胞类型中, 许多不同基因的调节区域都存在AP-1的结合位点。但c-Fos蛋白自身不能形成同源二聚体, 也不能单独与AP-1结合位点结合。AP-1参与大量的生物过程包括细胞分化、增生、凋亡和致癌性转化。AP-1与DNA结合作为转录活化因子参与转录机制, 进一步激活目的基因的表达。因此c-fos具有信号系统的特征, 可能参与胞质与胞核的信息传递。

c-fos基因能否参与转录和表达受多种因素制约, 不但受细胞内环境的影响, 还要受细胞外传递信号的

刺激, 从而引起c-fos表达的增强或抑制。c-fos基因启动子区有3个主要转录调控元素:cAMP反应元素(cAMP-response element, CRE)、血清反应元素(serum response element, SRE)及sis诱导元素(sis-inducible element, SRE)。上述元素的协同作用, 对c-fos基因在体内的正确表达起重要的调控作用。

c-Fos蛋白作为AP-1的成分, 被认为是参与细胞分裂、分化以及转化的一种重要分子。除了正常的促进细胞发育和生长外, c-Fos蛋白还通过抗增生而参与细胞的凋亡及细胞损伤的反应。在c-fos和c-Jun的DNA结合域涉及额外的转录后调节, 即为半胱氨酸残基氧化作用的减少, 后者可能对DNA的连接有利。在AP-1的功能调节过程中c-fos和c-Jun的磷酸化和去磷酸化作为翻译后调节具有重要的作用。而且c-fos的C末端的磷酸化对负向自动调节和转化是重要的^[8-9]。

c-fos基因可作为第三信使, 将外界刺激引起的第二信使介导的短时程信号, 在基因表达上转换为长时程信号。研究证实至少有3种明确的第二信使能激活c-fos, 即甘油二酯(DG)依赖的蛋白激酶C(PKC), cAMP和钙调蛋白复合物(Ca²⁺-CaM)。报道称细胞因子、激素等刺激物作为第一信使作用于胞膜上的受体, 激活膜内第二信使, 后者在转而激活即刻早期基因(IEG)的转录, 该转录生成的mRNA逸出胞核至胞质, 翻译成fos、jun等核磷蛋白, 二者结合形成异源二聚体AP-1重新转位至核内, 结合到靶基因的DNA调节区, 进而调节靶基因表达和转录速率, 发生信使作用。另有数据表明Stat3的磷酸化在HCC发生机制中可能是一个早期事件, 其激活了c-fos和c-jun基因, 或许有助于肝细胞的恶性变。

2 乙型肝炎病毒对c-fos基因表达的调节

原癌基因的表达与整合的DNA在肝细胞癌中要比正常肝脏中高的多。由于HBV并非致癌病毒, 在感染肝细胞中无直接致癌作用, 甚至无致细胞病变效应, HBV的具有反式激活作用的蛋白可能参与转录的激活和调节过程, 刺激癌基因的激活和肝细胞的转化。

2.1 HBx对c-fos基因表达的调节 HBV编码一个16.5 kDa的蛋白称为X抗原^[10], 主要定位于胞质内, 且仅仅在胞质内发挥反式调节作用。他可调节转录、细胞周期、增生、凋亡和DNA修复等多种宿主功能^[11-13]。虽然HBx不直接结合于双链DNA, 但核内的HBx可由结合于数个转录因子而被激活^[14], 而胞质内的成分触发了细胞间的信号路径^[15]。HBx的激活定位于与特异的转录因子AP-1的结合位点。Murakami et al 报道X序列即使切去了顶端, 仍保留他的反式激活功能, 表明了HBx介导的反式激活作用的重要性^[16]。HBx在缺乏相应激活子的情况下不能激活DNA元件, 他需要有力的激活域以共转录。一系列微弱的酸性激活域, 包括c-Jun激活域、c-fos激活域的两个亚区域对HBx的作用是不起作用的,

表明了HBx的效果不依赖于酸性激活域的酸性序列。研究表明HBx能够刺激大量增强子-启动子单位的转录，比如c-fos、c-Jun。在X蛋白存在的情况下，c-fos、c-Jun基因可更好的表达。

转基因鼠实验表明HBx与HCC的发生机制直接相关^[17]。HBx单独并不导致肿瘤形成，但可以下调细胞进程而最终导致肝癌。Murakami et al报道HBx通过细胞间调节信号转导路径，尤其是蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)^[6]，Janus激酶(janus kinase)、JAK/转录信号转导子与激活子(signal transducters and activators of transcription, STAT)^[18]、Src^[19]及Ras信号^[20-22]来间接激活c-fos转录。胞质内HBx激活了Ras导致了Raf和丝分裂素激活蛋白激酶(MAPK)^[15]，引起Ras-Raf-MAPK级联反应，介导c-fos的重新合成。而且，Raf的接触突变体可阻止HBx的诱导基因c-fos。MAPK家族为丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶，他的激活需要分子中的酪氨酸(Tyr)和苏氨酸(Thr)同时磷酸化。MAPK被激活后致c-fos磷酸化，以调节基因的转录和mRNA的翻译，使细胞由G0期进入到G1期。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERKs)属于MAPK的一组成员，研究表明ERKs在Ras依赖的路径中介导c-fos基因的激活^[23-24]。在分化的和分化差的肝细胞系中HBx均能快速激活丝分裂素激活蛋白激酶(MAPK)的ERK成分。各种各样的Ras/MAPK信号级联激活ERK，进一步触发了AP-1的诱导。Henkler et al^[25]同样报道ERK/MAPK对c-fos的表达是重要的，ERK/MAPK的永久性阻滞可导致AP-1活动的降低。然而ERK/MAPK暂时的抑制并不丧失AP-1的激活，表明了HBx能通过另一种机制激活AP-1。另有报道称HBx或作用于线粒体或作用于内质网或结合于二者触发Ca²⁺进入胞质。Ca²⁺短暂释放导致了脯氨酸富集的酪氨酸激酶2(Pyk2)的激活，Pyk2激酶结合且激活Src家族激酶。激活的Src激酶通过促进与Shc和生长因子结合蛋白(Grb2)相关联而刺激Ras，激活的Ras通过Raf有丝分裂原激活的蛋白激酶途径导致核内转录因子的激活，如激活c-fos，最终导致AP-1的激活。Balsano et al通过发现HBV X蛋白反式激活内源性c-fos和染色体外转染的c-fos调节序列^[26]而证实c-fos在致癌机制的可能作用。

2.2 HBs对c-fos基因表达的调节 前-S2/S和前-S1均是潜在的反式激活子。HBV前-S/S区对c-fos具有反式激活作用。Beasley et al^[27]报道HBsAg血清阳性的患者比HBsAg血清阴性的患者发生HCC要高100倍的风险。在HCC组织中原癌基因的表达比正常肝脏显示出较高水平且与HBV DNA整合。整合S蛋白的表达在HCC中或许激活了c-fos。Lauer et al^[28]研究表明HBs的反式激活需要羧基末端截断而产生反式激活功能结合AP-1，HBs基因的截断发生在219-645核苷酸，HBV截短的S蛋白直接结合于转录因子结合位点而激活数个细胞和病毒启动子。共转染实验证实HBV主要表面抗原的

3'-末端(S区域的426-855核苷酸)是X启动子-增强子调节元件的反式激活子。以前实验发现HBV主要表面基因的3'-末端，即636-746核苷酸在HCC组织中频繁的发现。Lauer et al^[29]发现3'-端缺失羧基端的中等表面基因(前-S2/St)具有反式激活功能，前-S2/St能够激活人癌基因c-fos的启动子。

3 参考文献

- 1 Twu JS, Schloemer RH. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol* 1987;61:3448-3453
- 2 Spandau DF, Lee CH. Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988;62:427-434
- 3 Zahm P, Hofschneider PH, Koshy R. The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 1988;3:169-177
- 4 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
- 5 Twu JS, Lai MY, Chen DS, Robinson WS. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 1993;192:346-350
- 6 Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 1993;361:742-745
- 7 Natoli G, Avantaggiati ML, Chirillo P, Costanzo A, Artini M, Balsano C, Levrero M. Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. *Mol Cell Biol* 1994;14:989-998
- 8 Ofir R, Dwarki VJ, Rashid D, Verma IM. Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature* 1990;348:80-82
- 9 Tratner I, Ofir R, Verma IM. Alteration of a cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the c-Fos protein augments its transforming potential. *Mol Cell Biol* 1992;12:998-1006
- 10 Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985;317:489-495
- 11 Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- 12 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
- 13 Koike K, Takada S. Biochemistry and functions of hepatitis B virus X protein. *Intervirology* 1995;38:89-99
- 14 Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- 15 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10350-10354
- 16 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- 17 Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317-320
- 18 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273:25510-25515
- 19 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997;17:6427-6436
- 20 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11215-11219
- 21 Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996;70:4978-4985

- 22 Krajcsi P, Wold WS. Viral proteins that regulate cellular signaling. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 6):1323-1335
- 23 Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 1993; 7:2135-2148
- 24 Westwick JK, Cox AD, Der CJ, Cobb MH, Hibi M, Karin M, Brenner DA. Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6030-6034
- 25 Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshy R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 11):2737-2742
- 26 Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:985-992
- 27 Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988;61:1942-1956
- 28 Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 1992;66: 5284-5289
- 29 Lauer U, Weiss L, Lipp M, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus preS2/St transactivator utilizes AP-1 and other transcription factors for transactivation. *Hepatology* 1994;19:23-31

丙型肝炎病毒核心蛋白与白介素-2启动子的调节

刘敏, 成军, 张树林

刘敏, 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
 国家自然科学基金项目, No. C03011402, No.C39900130, 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, 10039, 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: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

刘敏, 成军, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白与白介素-2启动子的调节. 世界华人消化杂志 2004;12(4):940-943

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/940.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)持续感染, 增加了肝纤维化和肝细胞癌(HCC)的危险性, 其机制与HCV引起机体免疫调节障碍有关. HCV基因表达产物中, 高度保守的HCV核心(core)蛋白具有免疫调节功能. 辅助性T细胞产生白介素(IL-2), HCV患者IL-2表达分泌异常, 与痊愈有明显相关性. 研究表明HCV核心蛋白具有转录激活IL-2启动子的作用, 本文对此方面的研究作一综述.

1 HCV核心蛋白具有免疫调节功能

HCV感染是一个严重的影响人类健康的世界性问题. 80%的HCV感染慢性化, 且容易进展为肝硬化、HCC^[1]. HCV不但感染肝细胞还能感染免疫细胞, 如巨噬细胞, B细胞和T细胞, 且具有改变免疫细胞功能的作用^[2-4]. HCV RNA基因大约9.5 kb长, 编码一个长的多聚蛋白. 通过蛋白分解过程这个多聚蛋白可产生10个不同的结构和非结构蛋白. 结构蛋白核心蛋白和包膜蛋白E1、E2糖蛋白位于多聚蛋白的N-端部分, 在RNA复制中非结构(NS)蛋白在多聚蛋白的剩余部分. HCV基因产物中, 高度保守的HCV核心蛋白具有免疫调节功能^[5-6].

由于HCV仅感染人和黑猩猩, 且在细胞培养不能有效复制, 评价各个HCV编码蛋白在HCV感染过程中调节宿主免疫反应的能力比较困难. 因此, 许多的调控研究都是应用分子生物学技术, 在细胞系水平上进行的. 将重组痘苗病毒感染鼠表达HCV基因可作为一种方法评价特有的HCV多肽可能的免疫调节作用^[7-8]. Large et al^[9]运用此方法研究认为HCV感染早期阶段首先产生HCV核心蛋白, HCV核心蛋白通过抑制抗病毒的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)抑制宿主免疫反应. 核心蛋白的转基因鼠研究显示, T淋巴细胞反应, 包括干扰素γ(IFNγ)和IL-2分泌表达, 与对照比较明显被抑制. HCV核心蛋白转基因鼠肝门束可见与血清谷丙转氨酶(ALT)升高相关的明显的淋巴细胞浸润. HCV核心蛋白编码转基因鼠的肝组织改变与慢性HCV感染的患者相似, 转基因鼠病灶也聚集在肝门和小叶. 非转基因同窝出生鼠和HCV核心蛋白转基因鼠生育的Fas缺陷lpr鼠未见肝内淋巴细胞或肝损害. 推测T淋巴细胞的抑制也许增加外周血T淋巴细胞对Fas介导的凋亡的敏感性, T淋巴细胞核心蛋白表达对引起免疫调节障碍, 凋亡淋巴细胞在肝脏积聚和随后的肝脏损害起关键性作用^[10].

尽管中和性抗体提供保护性免疫, 大多数病毒感染通过CTL介导的免疫反应清除^[11-12]. 但推测除了CTL的溶解, 抗病毒的细胞因子对于HCV感染的清除也很重要^[13]. 抗病毒的细胞因子与I型免疫反应相关. HCV感染患者有明显的细胞因子增生. 急性HCV感染I型细胞因子IFNγ和IL-2分泌与痊愈有明显相关性^[14]. 1型细胞因子见于HCV阳性健康人, 而2型细胞因子增生见于慢性HCV患者^[15]. 体液免疫和细胞免疫的平衡由多种细胞因子调节. 辅助性T细胞产生的IL-2是一种T细胞特有的丝分裂素和分化因子^[16]. 细胞因子反应的改变与HCV持续感染有关, 增加了肝纤维化和HCC的危险性. 研究HCV引起机体免疫调节障碍是有效的HCV治疗的关键.

2 IL-2启动子的转录调节机制

休眠状态的T细胞活化需要两种不同的信号. 第一种信号来自于T细胞抗原受体(TCR)识别抗原多肽和抗原呈

- 22 Krajcsi P, Wold WS. Viral proteins that regulate cellular signaling. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 6):1323-1335
- 23 Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 1993; 7:2135-2148
- 24 Westwick JK, Cox AD, Der CJ, Cobb MH, Hibi M, Karin M, Brenner DA. Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6030-6034
- 25 Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshy R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 11):2737-2742
- 26 Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:985-992
- 27 Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988;61:1942-1956
- 28 Lauer U, Weiss L, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol* 1992;66: 5284-5289
- 29 Lauer U, Weiss L, Lipp M, Hofschneider PH, Kekule AS. The hepatitis B virus preS2/St transactivator utilizes AP-1 and other transcription factors for transactivation. *Hepatology* 1994;19:23-31

丙型肝炎病毒核心蛋白与白介素-2启动子的调节

刘敏, 成军, 张树林

刘敏, 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
 国家自然科学基金项目, No. C03011402, No.C39900130, 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, 10039, 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: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

刘敏, 成军, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白与白介素-2启动子的调节. 世界华人消化杂志 2004;12(4):940-943

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/940.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)持续感染, 增加了肝纤维化和肝细胞癌(HCC)的危险性, 其机制与HCV引起机体免疫调节障碍有关. HCV基因表达产物中, 高度保守的HCV核心(core)蛋白具有免疫调节功能. 辅助性T细胞产生白介素(IL-2), HCV患者IL-2表达分泌异常, 与痊愈有明显相关性. 研究表明HCV核心蛋白具有转录激活IL-2启动子的作用, 本文对此方面的研究作一综述.

1 HCV核心蛋白具有免疫调节功能

HCV感染是一个严重的影响人类健康的世界性问题. 80%的HCV感染慢性化, 且容易进展为肝硬化、HCC^[1]. HCV不但感染肝细胞还能感染免疫细胞, 如巨噬细胞, B细胞和T细胞, 且具有改变免疫细胞功能的作用^[2-4]. HCV RNA基因大约9.5 kb长, 编码一个长的多聚蛋白. 通过蛋白分解过程这个多聚蛋白可产生10个不同的结构和非结构蛋白. 结构蛋白核心蛋白和包膜蛋白E1、E2糖蛋白位于多聚蛋白的N-端部分, 在RNA复制中非结构(NS)蛋白在多聚蛋白的剩余部分. HCV基因产物中, 高度保守的HCV核心蛋白具有免疫调节功能^[5-6].

由于HCV仅感染人和黑猩猩, 且在细胞培养不能有效复制, 评价各个HCV编码蛋白在HCV感染过程中调节宿主免疫反应的能力比较困难. 因此, 许多的调控研究都是应用分子生物学技术, 在细胞系水平上进行的. 将重组痘苗病毒感染鼠表达HCV基因可作为一种方法评价特有的HCV多肽可能的免疫调节作用^[7-8]. Large et al^[9]运用此方法研究认为HCV感染早期阶段首先产生HCV核心蛋白, HCV核心蛋白通过抑制抗病毒的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)抑制宿主免疫反应. 核心蛋白的转基因鼠研究显示, T淋巴细胞反应, 包括干扰素γ(IFNγ)和IL-2分泌表达, 与对照比较明显被抑制. HCV核心蛋白转基因鼠肝门束可见与血清谷丙转氨酶(ALT)升高相关的明显的淋巴细胞浸润. HCV核心蛋白编码转基因鼠的肝组织改变与慢性HCV感染的患者相似, 转基因鼠病灶也聚集在肝门和小叶. 非转基因同窝出生鼠和HCV核心蛋白转基因鼠生育的Fas缺陷lpr鼠未见肝内淋巴细胞或肝损害. 推测T淋巴细胞的抑制也许增加外周血T淋巴细胞对Fas介导的凋亡的敏感性, T淋巴细胞核心蛋白表达对引起免疫调节障碍, 凋亡淋巴细胞在肝脏积聚和随后的肝脏损害起关键性作用^[10].

尽管中和性抗体提供保护性免疫, 大多数病毒感染通过CTL介导的免疫反应清除^[11-12]. 但推测除了CTL的溶解, 抗病毒的细胞因子对于HCV感染的清除也很重要^[13]. 抗病毒的细胞因子与I型免疫反应相关. HCV感染患者有明显的细胞因子增生. 急性HCV感染I型细胞因子IFNγ和IL-2分泌与痊愈有明显相关性^[14]. 1型细胞因子见于HCV阳性健康人, 而2型细胞因子增生见于慢性HCV患者^[15]. 体液免疫和细胞免疫的平衡由多种细胞因子调节. 辅助性T细胞产生的IL-2是一种T细胞特有的丝分裂素和分化因子^[16]. 细胞因子反应的改变与HCV持续感染有关, 增加了肝纤维化和HCC的危险性. 研究HCV引起机体免疫调节障碍是有效的HCV治疗的关键.

2 IL-2启动子的转录调节机制

休眠状态的T细胞活化需要两种不同的信号. 第一种信号来自于T细胞抗原受体(TCR)识别抗原多肽和抗原呈

现细胞(APC)上 MHC 分子。这个信号导致 T 细胞对二次由 APC 提供的协同刺激信号的有效反应^[17]。CD28 分子作为基本的受体在 T 细胞产生协同刺激信号, CD28 结合抗 -CD28 单克隆抗体或与 TCR 相伴的配体引起 T 细胞完全活化^[18]。除了 CD28 外, T 细胞有多个协同刺激分子, 包括 CD5、CD2、CD44、CD9^[19]。CD28 具有协同刺激 IL-2 启动子基因表达的作用。还有许多 IL-2 启动子基因元素涉及调节 IL-2 基因转录活性, 包括 T 细胞活化核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT), NF-κB 结合位点和 CD28 反应元素(CD28RE)。NFAT 是转录因子的一个家族, 调节诱导活化许多重要的免疫基因的转录。NFAT 是胞质中固有的, 以潜在的磷酸化形式存在。以钙调素依赖的钙调磷酸酶激活方式增加胞质中钙水平, 通过磷酸化作用激活 NFAT^[20]。尽管 NFAT 家族的所有蛋白均具有高度保守的 DNA 结合区而且与 AP-1 蛋白协同结合 IL-2 启动子的 NFAT 位点, 但每一个成员又有特殊的优先结合其他启动子的位点。瞬时转染突变型 NFAT 蛋白表明靶启动子的转录激活与突变型 NFAT 特有的 DNA 结合相关。不同的 NFAT 蛋白优先和有效的结合位点可能程序性暂时表达不同细胞因子基因^[21]。NFAT/AP-1 是第一个发现的关键的 IL-2 基因转录调节因子。但是, 更多证据表明由 CD28 协同刺激的 NF-κB 在 T 细胞活化中扮演了更重要的角色。

NF-κB 家族成员由几个不同的亚单位组成, 包括 c-Rel、RelB、p52, 和家族中的遍在蛋白 Rel-A(p65) 和 p50。c-Rel 在 NF-κB 刺激激活时被诱导合成。NF-κB 是这些亚单位的二聚体复合物以游离状态与相关连的抑制性家族分子 IκB 存在于细胞质中^[22]。不同的二聚体复合物被各种能够磷酸化 / 降解 IκB 的刺激激活易位到细胞核区。这些刺激包括来自 TCR/CD28^[23] 和肿瘤坏死因子(TNF)受体的信号^[24]。

CD28 协同刺激以时间依赖的方式上调 NF-AT/AP-1 和 NF-κB^[25], 介导上调 IL-2 转录, 增加 mRNA 稳定性, 延长 mRNA 半衰期^[26]。CD28 结合转录因子 NFAT 和 NF-κB 结合位点及 IL-2 启动子的 CD28 反应元件呈时间依赖性增加。非 CD28 协同刺激时由于缺乏 IκB 灭活使 NF-κB 的重要成员 c-Rel 不能易位到细胞核区而降低了 NF-κB 的活性。非 CD28 协同刺激不能活化 c-Rel/NF-κB 故不能维持 IL-2 启动子活性^[27]。

诱导 NF-κB 要求来自连接 CD28 受体的协同刺激信号。NF-κB 调节不仅仅是 NF-κB 增强元素的作用, 而且还有 IL-2 启动子的 CD28RE 的作用。CD28RE 与 NF-κB 家族的许多成员和 NFAT 相互作用, 是 CD28 协同刺激信号形成的基础^[28]。

IL-2 基因转录的出现依赖于 T 细胞活化的方式。重要的引起 IL-2 转录增加的原因是改变核结构中包括 300 bp 启动子区的基因。IL-2 基因主要在 CD4(+)T 细胞以依赖 NF-κB 家族成员 c-Rel 的方式转录。c-Rel 是核结构包括 300 bp 的 IL-2 启动子对主要在 CD4(+)T 细胞

的 CD3/CD28 反应发生球形改变的基础^[29]。来自 c-Rel 缺陷鼠的 T 细胞不能产生 IL-2, 说明 c-Rel 在调节 IL-2 基因表达中起关键性作用^[30]。

3 HCV 核心蛋白转录激活 IL-2 启动子的机制

信号肽酶介导从 HCV 多聚蛋白 191 残基下游 E1 糖蛋白分离核心蛋白^[31]。核心蛋白在 172 残基附近位点通过微球蛋白相关活性进一步加工^[32]。这些 HCV 核心蛋白位于核周内质网^[33]。HCV 核心蛋白前 122 aa 可有效调节 c-myc 和异性肝炎病毒(HBV)的基因启动子, 缺失 1-152 aa 的截断残基无活性, 推测羧基端部分对于激活 IL-2 启动子是必须的。HCV 核心蛋白的羧基端部分对于他在核周内质网的定位是十分重要的。这意味着核心蛋白的亚细胞定位或羧基端疏水性残基可能对于他刺激 IL-2 启动子转录是重要的^[34]。Bergqvist et al^[35]用 Jurkat 细胞结果显示, 自然感染过程中存在的 HCV 核心蛋白在其他刺激因子存在的情况下有促进 IL-2 启动子转录的作用。核心蛋白在转录水平调节宿主和病毒启动子。HCV 核心蛋白全长而不是部分表达可激活 NFAT 介导的 IL-2 启动子在 Jurkat 细胞的表达。

T 细胞中 IL-2 的合成是在转录水平调节的。通过衔接细胞表面受体引起信号转导级联启动, 随后结合 IL-2 启动子特有元素的转录因子诱导 IL-2 基因的转录^[36]。交联 TCR 启始信号涉及酪氨酸激酶依赖激活的磷脂酶 C-γ(PLC-γ)和生成的甘油二酯及 1, 4, 5-三磷酸肌醇(IP₃)^[37]。下游信号激活包括 p21ras 细胞分裂素(丝裂原)活化蛋白激酶^[38]和钙依赖途径^[39]。IP₃ 受体存在内质网膜, 细胞内储存的钙通过 IP₃ 受体激活介导的 TCR 刺激释放^[40]。一种可能的方式是 HCV 核心蛋白定位于内质网刺激钙信号, 通过增加内质网钙的浓度或通过促进钙释放引起对刺激更大的反应。

Bergqvist et al^[41]报道 HCV 核心蛋白作用于 NFAT 活化的基础 Ca²⁺ 信号。HCV 核心蛋白作用 Ca²⁺ 信号不依赖于 PLC-γ 活性或增加 IP₃ 产物且不需要功能性 IP₃ 受体, 推测病毒蛋白插入内质网膜可有效促进 Ca²⁺ 漏出引起一系列后果。感染的 T 淋巴细胞表达 HCV 核心蛋白通过诱导 Ca²⁺ 浓度的震荡改变 Ca²⁺ 信号的信息内容和强度, 最终诱导基因表达和功能分化, 有助于建立持续感染。相反, 当细胞用钙离子载体或抗 -TCR 协同刺激时 HCV 核心蛋白仅有很少的转录激活功能。HCV 核心蛋白对于转录无普遍作用, 因为仅在 NFAT 结合位点存在于报告质粒时可观察到活性。HCV 核心蛋白替代诱导因子触发钙释放进一步支持了 NFAT 活化的要求。正如加入 ECTA 耗竭细胞外钙一样通过加入环孢菌素 A 可抑制 HCV 核心蛋白激活 IL-2 启动子。环孢菌素 A 通过抑制钙调磷酸酶依赖的 NFAT 去磷酸化抑制 NFAT 依赖的转录。由此推测, HCV 核心蛋白的作用由转录因子 NFAT 介导且 HCV 核心蛋白的活化作用要有 NFAT 激活钙调磷酸酶。核心蛋白激活转录要有钙释放进入细胞质^[35]。

HCV核心蛋白存在时，仅有佛波乙酯(TPA)刺激就可诱导IL-2启动子在细胞中转录，当细胞有抗-CD28或弗司扣林(forskolin)协同刺激时IL-2表达明显增加。HCV核心蛋白和TPA诱导高水平的IL-2启动子转录需要有抗-CD28和弗司扣林的协同刺激^[42]。交联CD28信号包括由压力激活蛋白激酶(stress-activated protein kinases)去磷酸化的c-Jun、IκB-α，转录激活通过c-Rel或RelA/p65结合IL-2启动子的一个κB类似位点CD28RE介导。蛋白激酶A(PKA)在细胞中有许多有效靶位且可能存在多种功能。体外，HCV核心蛋白可通过PKA和蛋白激酶C(PKC)磷酸化。腺苷酸环化酶激活因子弗司扣林作为环磷腺苷诱导剂(蛋白激酶A)被广泛应用。HCV核心蛋白在转录激活的作用时通过PKA或CD28协同刺激呈现相似作用。推测是单一因子启动两种不同的途径^[43]。

c-Rel是有效的因子，可通过弗司扣林和抗-CD28诱导。但是，弗司扣林的作用不是单一的引起核心蛋白磷酸化，因为结果还依赖于启动子类型。刺激Jurkat细胞，由弗司扣林激活PKA引起核易位和DNA结合RelA/p65减少，IL-2基因转录降低。但是，这种情况下c-Rel的表达和DNA结合增加^[44]。刺激TCR诱导IL-2合成必须有T细胞特有的酪氨酸激酶p56lck。因此，在p56lck缺陷J.CaM.1细胞系TCR交联既不能诱导钙释放，也不能诱导IL-2合成。但在这些细胞，HCV核心蛋白能够诱导IL-2启动子的转录。p56lck对于HCV核心蛋白基因的转录激活作用是可有可无的，推测核心蛋白的作用在p56lck信号转导级联的下游^[35]。

4 参考文献

- 1 Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6547-6549
- 2 Chang TT, Young KC, Yang YJ, Lei HY, Wu HL. Hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: comparing acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1996; 23:977-981
- 3 Lerat H, Berby F, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspe G. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996;97:845-851
- 4 Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993;74:669-676
- 5 Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbalenya AE, Lo SY, Ou JH, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:1301-1309
- 6 Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 1997;71:9417-9426
- 7 Blanden RV. Mechanisms of recovery from a generalized viral infection: mousepox. II. Passive transfer of recovery mechanisms with immune lymphoid cells. *J Exp Med* 1971;133:1074-1089
- 8 Blanden RV. Mechanisms of recovery from a generalized viral infection: mousepox. 3. Regression infectious foci. *J Exp Med* 1971;133:1090-1104
- 9 Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 1999;162:931-938
- 10 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
- 11 Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3764-3768
- 12 Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:25-36
- 13 Chang KM, Rehermann B, Chisari FV. Immunopathology of hepatitis C. *Springer Semin Immunopathol* 1997;19:57-68
- 14 Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997;25:449-458
- 15 Woitas RP, Lechmann M, Jung G, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U. CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* 1997;159:1012-1018
- 16 Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:742-780
- 17 Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;11:191-212
- 18 Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991;147:2461-2566
- 19 Watts TH, DeBenedette MA. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* 1999;11:286-293
- 20 Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 1999;96:611-614
- 21 Oum JH, Han J, Myung H, Hleb M, Sharma S, Park J. Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF-alpha promoters. *Mol Cells* 2002;13:77-84
- 22 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260
- 23 Maggirwar SB, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the interleukin-2 CD28-responsive element by NF-ATp and various NF-kappaB/Rel transcription factors. *Mol Cell Biol* 1997; 17:2605-2014
- 24 May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998;19:80-88
- 25 Zhou XY, Yashiro-Ohtani Y, Nakahira M, Park WR, Abe R, Hamaoka T, Naramura M, Gu H, Fujiwara H. Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J Immunol* 2002;168:3847-3854
- 26 Powell JD, Ragheb JA, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz RH. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol Rev* 1998;165:287-300
- 27 Zhou XY, Yashiro-Ohtani Y, Nakahira M, Park WR, Abe R, Hamaoka T, Naramura M, Gu H, Fujiwara H. Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J Immunol* 2002;168:3847-3854
- 28 Maggirwar SB, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the interleukin-2 CD28-responsive element by NF-ATp and various NF-kappaB/Rel transcription factors. *Mol Cell Biol* 1997;17:2605-2614
- 29 Rao S, Gerondakis S, Woltring D, Shannon MF. c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter. *J Immunol* 2003;170:3724-3731
- 30 Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, Gerondakis S. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* 1995;9:1965-1977
- 31 Hussy P, Langen H, Mous J, Jacobsen H. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 1996;224:93-104

- 32 Schlesinger JJ, Chapman S, Nestorowicz A, Rice CM, Ginocchio TE, Chambers TJ. Replication of yellow fever virus in the mouse central nervous system: comparison of neuroadapted and non-neuroadapted virus and partial sequence analysis of the neuroadapted strain. *J Gen Virol* 1996;77:1277-1285
- 33 Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-6055
- 34 Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, Chiba J, Harada S, Saito I, Miyamura T. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol* 1995;76:53-61
- 35 Bergqvist A, Rice CM. Transcriptional activation of the interleukin-2 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2001;75:772-781
- 36 Serfling E, Avots A, Neumann M. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* 1995;1263:181-200
- 37 Crabtree GR, Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 1994;63:1045-1083
- 38 Izquierdo M, Leevers SJ, Marshall CJ, Cantrell D. p21ras couples the T cell antigen receptor to extracellular signal-regulated kinase 2 in T lymphocytes. *J Exp Med* 1993;178:1199-1208
- 39 Imboden JB, Weiss A, Stobo JD. The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *J Immunol* 1985;134:663-665
- 40 Putney JW Jr. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium* 1997;21:257-261
- 41 Bergqvist A, Sundstrom S, Dimberg LY, Gylfe E, Masucci MG. The hepatitis C virus core protein modulates T cell responses by inducing spontaneous and altering T-cell receptor-triggered Ca²⁺ oscillations. *J Biol Chem* 2003;278:18877-18883
- 42 Ward SG. CD28: a signalling perspective. *Biochem J* 1996; 318:361-377
- 43 Shih CM, Chen CM, Chen SY, Lee YH. Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J Virol* 1995;69:1160-1171
- 44 Shapiro VS, Truitt KE, Imboden JB, Weiss A. CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol Cell Biol* 1997;17:4051-4058

富含脯氨酸的酪氨酸激酶 -2与肝炎病毒关系的研究进展

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕

王春花, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 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

郎振为, 首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100054
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No.C39900130, 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, 10039, 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: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕. 富含脯氨酸的酪氨酸激酶 -2与肝炎病毒关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(4): 943-947

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/943.asp>

0 引言

富含脯氨酸的酪氨酸激酶-2 (proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk-2)是一种属于局灶黏附激酶(FAK)家族的细胞质中的酪氨酸激酶^[1-2]. Pyk-2在多种组织中表达丰富, 包括大脑、肺、肠、肾、脾^[3-4]和血管平滑肌细胞^[5-7]. Pyk-2能被多种细胞外刺激物激活, 例如G蛋白耦合受体(G protein-coupled receptor, GPCR)激动剂, 蛋白激酶C (PKC)的活化, 细胞内钙离子浓度的升高, 紫外线(UV)辐射和细胞外摩尔渗透压浓度^[1-2]. 此外, Eguchi et al^[8]等还证明在小鼠血管平滑肌细胞血管紧张素II可通过提高细胞内钙离子浓度而激活Pyk-2. Pyk-2当酪氨酸残基自身磷酸化后就能为包括Src酪氨酸激酶家族的其他包含SH2 (src homology)结构域的蛋白提供结合位点^[9-10]. 例如Pyk-2与c-Scr的结合导致接头蛋白转位到质膜和随后的依赖p21ras的细胞外信号调节激酶(ERK)1/2激活^[10-11]. 越来越多的研究资料表明Pyk-2参与了许多细胞生命活动的代谢过程, 其与病毒性肝病的关系也引起人们的关注. 本文就近几年Pyk-2的研究状况作一简要综述.

1 Pyk-2的结构和功能

1.1 FAK 非受体型酪氨酸激酶家族 Pyk-2具有多种命名, 比如相关黏附局灶酪氨酸激酶(related adhesion focal tyrosine kinase, RAFTK)、细胞黏附激酶-β(cell adhesion kinase β, CAK-β)、细胞黏附依赖性酪氨酸激酶 (cell adhesion-dependent tyrosine kinase, CADTK)、或者局灶黏附激酶-2 (focal adhesion kinase-2, FAK2), 属于FAK非受体型酪氨酸激酶家族中的一员, 可以表达于不同的细胞类型中, 包括神经细胞和造血细胞^[4, 12-15]. Pyk-2与FAK具有明显的序列同源性(中心催化结构域具有60%相似性, 羧基端与氨基端都有40%相似性). 这两种激酶呈现出45%氨基酸同源性并且都缺少SH2或SH3结构域, 而在许多其他的胞质酪氨酸激酶中都具有此结构, 虽不包含SH2和SH3结构域却具有几个结合位点能与含有SH2/SH3的信号蛋白作用^[4, 13]. Pyk-2和FAK都具有长的氨基端和羧基端末端结构域中间夹杂有中心激酶结构域. 并且Pyk-2和FAK在高度保守的中央催化区具有同样全面的结构, 例如包含SH2结构域蛋白的磷酸化/停泊位点^[16-17], 包含SH3结构域蛋白的富含脯氨酸结合位点^[18-19], 以及有关的氨基末端带4.1(NH2-terminal band 4.1), 埃兹蛋白(ezrin)等蛋白的同源结构域^[20]. 二者主要的自身磷酸化位点也是保守的. Pyk-2和FAK中这一位点已被证实可充当Src家族激酶的结合位点^[9]. 其他几个与FAK相互作用的蛋白也被证实能与Pyk-2结合, 这种结合作用的生物学意义还没能完全阐明^[9, 18, 21-23]. 例如与FAK相似, Pyk-2也具有大的氨基端和羧基端末端结构域借助他们Pyk-2能与几种信号分子和细胞骨架蛋白相互作用^[9, 18, 21-22]. Ueda et al^[24]利用酵母双杂交系统筛选鉴定出一种新型

- 32 Schlesinger JJ, Chapman S, Nestorowicz A, Rice CM, Ginocchio TE, Chambers TJ. Replication of yellow fever virus in the mouse central nervous system: comparison of neuroadapted and non-neuroadapted virus and partial sequence analysis of the neuroadapted strain. *J Gen Virol* 1996;77:1277-1285
- 33 Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-6055
- 34 Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, Chiba J, Harada S, Saito I, Miyamura T. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol* 1995;76:53-61
- 35 Bergqvist A, Rice CM. Transcriptional activation of the interleukin-2 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2001;75:772-781
- 36 Serfling E, Avots A, Neumann M. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* 1995;1263:181-200
- 37 Crabtree GR, Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 1994;63:1045-1083
- 38 Izquierdo M, Leevers SJ, Marshall CJ, Cantrell D. p21ras couples the T cell antigen receptor to extracellular signal-regulated kinase 2 in T lymphocytes. *J Exp Med* 1993;178:1199-1208
- 39 Imboden JB, Weiss A, Stobo JD. The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *J Immunol* 1985;134:663-665
- 40 Putney JW Jr. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium* 1997;21:257-261
- 41 Bergqvist A, Sundstrom S, Dimberg LY, Gylfe E, Masucci MG. The hepatitis C virus core protein modulates T cell responses by inducing spontaneous and altering T-cell receptor-triggered Ca²⁺ oscillations. *J Biol Chem* 2003;278:18877-18883
- 42 Ward SG. CD28: a signalling perspective. *Biochem J* 1996; 318:361-377
- 43 Shih CM, Chen CM, Chen SY, Lee YH. Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J Virol* 1995;69:1160-1171
- 44 Shapiro VS, Truitt KE, Imboden JB, Weiss A. CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol Cell Biol* 1997;17:4051-4058

富含脯氨酸的酪氨酸激酶 -2与肝炎病毒关系的研究进展

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕

王春花, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 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

郎振为, 首都医科大学佑安医院病理科 北京市 100054
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No.C39900130, 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, 10039, 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: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕. 富含脯氨酸的酪氨酸激酶 -2与肝炎病毒关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(4): 943-947

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/943.asp>

0 引言

富含脯氨酸的酪氨酸激酶-2 (proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk-2)是一种属于局灶黏附激酶(FAK)家族的细胞质中的酪氨酸激酶^[1-2]. Pyk-2在多种组织中表达丰富, 包括大脑、肺、肠、肾、脾^[3-4]和血管平滑肌细胞^[5-7]. Pyk-2能被多种细胞外刺激物激活, 例如G蛋白耦合受体(G protein-coupled receptor, GPCR)激动剂, 蛋白激酶C (PKC)的活化, 细胞内钙离子浓度的升高, 紫外线(UV)辐射和细胞外摩尔渗透压浓度^[1-2]. 此外, Eguchi et al^[8]等还证明在小鼠血管平滑肌细胞血管紧张素II可通过提高细胞内钙离子浓度而激活Pyk-2. Pyk-2当酪氨酸残基自身磷酸化后就能为包括Src酪氨酸激酶家族的其他包含SH2 (src homology)结构域的蛋白提供结合位点^[9-10]. 例如Pyk-2与c-Scr的结合导致接头蛋白转位到质膜和随后的依赖p21ras的细胞外信号调节激酶(ERK)1/2激活^[10-11]. 越来越多的研究资料表明Pyk-2参与了许多细胞生命活动的代谢过程, 其与病毒性肝病的关系也引起人们的关注. 本文就近几年Pyk-2的研究状况作一简要综述.

1 Pyk-2的结构和功能

1.1 FAK 非受体型酪氨酸激酶家族 Pyk-2具有多种命名, 比如相关黏附局灶酪氨酸激酶(related adhesion focal tyrosine kinase, RAFTK)、细胞黏附激酶-β(cell adhesion kinase β, CAK-β)、细胞黏附依赖性酪氨酸激酶 (cell adhesion-dependent tyrosine kinase, CADTK)、或者局灶黏附激酶-2 (focal adhesion kinase-2, FAK2), 属于FAK非受体型酪氨酸激酶家族中的一员, 可以表达于不同的细胞类型中, 包括神经细胞和造血细胞^[4, 12-15]. Pyk-2与FAK具有明显的序列同源性(中心催化结构域具有60%相似性, 羧基端与氨基端都有40%相似性). 这两种激酶呈现出45%氨基酸同源性并且都缺少SH2或SH3结构域, 而在许多其他的胞质酪氨酸激酶中都具有此结构, 虽不包含SH2和SH3结构域却具有几个结合位点能与含有SH2/SH3的信号蛋白作用^[4, 13]. Pyk-2和FAK都具有长的氨基端和羧基端末端结构域中间夹杂有中心激酶结构域. 并且Pyk-2和FAK在高度保守的中央催化区具有同样全面的结构, 例如包含SH2结构域蛋白的磷酸化/停泊位点^[16-17], 包含SH3结构域蛋白的富含脯氨酸结合位点^[18-19], 以及有关的氨基末端带4.1(NH2-terminal band 4.1), 埃兹蛋白(ezrin)等蛋白的同源结构域^[20]. 二者主要的自身磷酸化位点也是保守的. Pyk-2和FAK中这一位点已被证实可充当Src家族激酶的结合位点^[9]. 其他几个与FAK相互作用的蛋白也被证实能与Pyk-2结合, 这种结合作用的生物学意义还没能完全阐明^[9, 18, 21-23]. 例如与FAK相似, Pyk-2也具有大的氨基端和羧基端末端结构域借助他们Pyk-2能与几种信号分子和细胞骨架蛋白相互作用^[9, 18, 21-22]. Ueda et al^[24]利用酵母双杂交系统筛选鉴定出一种新型

的与 Pyk-2 相互作用的蛋白命名为分子量为 200 kD 的 FAK 家族激酶结合蛋白(FAK family kinase-interacting protein of 200 KD, FIP200). 体外结合实验和免疫共沉淀进一步证实了 FIP200 和 Pyk-2 的结合作用, 相似的实验也表明 FIP200 能与 FAK 结合.

尽管 Pyk-2 在结构上相似于 FAK, 但 Pyk-2 似乎还有不同于 FAK 的细胞功能. 通过酵母双杂交或另外的基于酵母的克隆技术已鉴定出 2 种与 Pyk-2 相互作用蛋白, Nirs 和 Pap. Nirs 是一种与果蝇视网膜变性蛋白 B 有关的跨膜蛋白^[25]. Pap (α 和 β 亚型) 是一种具有 Arf-GAP 活性的胞质蛋白, 参与了肺泡转运的调节^[26]. 并且这两种蛋白似乎都与 Pyk-2 相互作用而不与 FAK 作用. 另外虽然 FAK 已被证实实在整合素介导的细胞迁移过程中发挥重要作用^[27-30], 但在纤维原细胞中 Pyk-2 的表达并不促进细胞迁移^[31]. 缺乏局灶黏附激酶(FAK-/-) 的纤维原细胞表现出形态上和迁移性的缺陷但可被 FAK 的再表达逆转. 作为 FAK 相关激酶的 Pyk-2 在 FAK-/- 细胞中可表达, 然而呈现出核周的分布并且功能上不能替代 FAK^[32]. 这是因为 FAK 的羧基端(FAK-CT)而非氨基端在体内可与 $\beta 1$ - 整合素形成复合物^[33-34]. FAK 羧基端内一个被称为灶性黏附靶向基序的结构能促进 FAK 定位到整合素受体丛集区^[35], 并且对于结合 β - 整合素相关蛋白也是很重要的^[36]. FAK 和 Pyk-2 在其羧基端结构域都包含保守位点能结合 α - 整合素相关蛋白桩蛋白(paxillin)^[37-38]. 然而在纤维原细胞或平滑肌细胞中 Pyk-2 不能牢固地定位于病灶接触位点^[31-39]. 随后的研究又提出通过 FAK 的整合素信号可保护细胞免于凋亡^[40]和促进细胞周期的进程^[41]. 相反在许多细胞系中 Pyk-2 的过量表达可诱导凋亡^[42]. 尽管在整合素信号传导中 Pyk-2 的潜在功能不是很清楚, 但在许多其他的细胞过程中 Pyk-2 都发挥作用, 包括钙离子诱导的铁通道的调节和裂原激活蛋白激酶(MAPK)的激活^[17]、Jannus 蛋白 N-末端激酶(JNK)活化^[43-44]和在 PC12 细胞中 Src 介导的 MAPK 信号途径的激活^[9]. Ren et al^[45]发现 FAK 和 Pyk-2 在细胞骨架组织中参与介导了不同的作用机制. 在纤维细胞中 Pyk-2 的过表达而非 FAK 诱导了细胞骨架结构的重建, 而且 Pyk-2 诱导的细胞骨架结构的重建能被 FAK 挽救. 为了深入研究 Pyk-2 介导的细胞骨架的重建机制, 有资料报道利用酵母双杂交系统筛选能与 Pyk-2 相互作用的蛋白. 并且确定了一种新型与 Pyk-2 相互作用的蛋白, 含有 rhoGAP 蛋白的 PH 和 SH3 结构域(PH and SH3 domain containing rhoGAP protein, PSGAP). PSGAP 在体内、体外均能促进 GTPase 对 CDC42 和 RhoA 的催化活性. Pyk-2 结合到 PSGAP 的 SH3 结构域, 抑制 PSGAP 对 CDC42 的作用从而激活 CDC42 的活性. 该研究表明 PSGAP 可作为 Pyk-2 的一种介体通过小 G 蛋白调整细胞骨架的组建.

Almeida et al 认为 FAK 和 Pyk-2/FAK-CT 在病灶接触位点上很可能协同促进促迁移信号复合物的形成,

该复合物也可能包括在这些位点上的活化的 ERK2 和 JNK. Klingleil et al^[46]的研究认为当通常的结合 SH2 或 SH3 的蛋白靶向到 FAK 和 Pyk-2 就可以作为一种复合物的形式起到增强 FAK-/- (focal adhesion kinase-null) 细胞迁移性的作用. 共同的作用蛋白募集例如 Src 家族的 PTKs 和 p130Cas 可能是增强迁移性信号的病灶接触相关信号复合物形成过程中的第一步. 已有的研究表明 p130Cas 的酪氨酸磷酸化和 ERK2 活化而介导的信号能协同增强细胞的迁移, 据此 Candice et al 认为 FAK 作用于 p130Cas 和 ERK2 信号的上游而协同这些迁移增强信号.

Siciliano et al^[47] 利用大白鼠海马回切片和皮质的突触小体来研究两种高度相关的细胞质的酪氨酸激酶 Pyk-2 和 FAK 的调节机制, 结果发现膜的去极化能增加 Pyk-2 和 FAK 的酪氨酸磷酸化, 谷氨酸盐和离子化谷氨酸盐受体特殊的促效药能促进 FAK 的酪氨酸磷酸化而对 Pyk-2 没有作用. 作者认为海马回切片中, 在涉及到 Ca^{2+} 和 PKC 的信号途径中 Pyk-2 和 FAK 的酪氨酸磷酸化受到不同的调节. Pyk-2 和 FAK 可能在各种神经元的活动之间提供了某些特殊的连接, 增加了胞质 Ca^{2+} 和蛋白酪氨酸磷酸化, 这些对于神经元的生存和突触的可塑性非常重要.

1.2 PYK-2 的功能

1.2.1 影响 Pyk-2 活性的因素 Pyk-2 能被多种能升高细胞内钙离子浓度的细胞外刺激物所激活^[9, 13, 43-44], 包括乙酰胆碱受体或诱导钙内流的电压式钙通道, G 蛋白耦连受体激动剂例如血管舒缓肽、溶血磷脂酸、血管紧张素 II 以及其他能促进钙从细胞内钙库释放的递质^[7, 9, 23, 44]. 此外佛波醇酯, G 蛋白耦连受体激活剂和整合素触发的信号都可能导致 Pyk-2 的酪氨酸磷酸化^[9, 13]. 有报道认为自然杀伤(NK) 细胞表达 Pyk-2 而非 FAK, $\beta 1/2$ 整合素由内到外(outside-in) 信号传导促进 Pyk-2 的激活^[48-49]. 最近的研究又表明 Pyk-2 可能通过与一种新型的 GTPase 激活蛋白称为 Pap 相互作用而参与了肺泡的转运^[26]. Wang et al^[50] 在研究水杨酸盐对参与血管紧张素 II 和血小板来源生长因子激活的某些信号传导元件可能的作用位点时发现水杨酸盐能抑制钙离子依赖的非受体型酪氨酸激酶 Pyk-2 和 c-Src 的磷酸化.

1.2.2 PYK-2 参与了多种信号途径 Pyk-2 最先被认识是作为一种与 MAPK 和 JNK 信号途径连接的关键酶, 而此信号途径在细胞生长和黏附过程中发挥重要作用. 近来 Pyk-2 更被证明是多种细胞信号途径的一种上游调节因子, 包括 Src 和 MAPK 家族的多种成员^[1].

在血管平滑肌细胞(VSMC) 中血管紧张素 II 能诱导介于 Pyk-2 和 ERK1/2、Src、Shc、Grb2 这 4 种因子的上游调控因子之间的复合物形成, 表明 Pyk-2 参与了血管紧张素 II 诱导激活的 ERK1/2 的调控. 已有的研究已发现在血管平滑肌细胞中 Pyk-2 参与了血管紧张素 II 诱导的蛋白合成及其此过程中涉及到的两条信号传导

途径的调节，即 ERK1/2 和磷脂酰激酶 -3/Akt 途径。Rocic et al^[51]在培养的 VSMC 中利用反义寡核苷酸下调 Pyk-2 的表达。结果发现 Pyk-2 的表达下调 80% 导致由血管紧张素 II 诱导的 ERK1/2、p70S6 激酶和 Akt 活性受到 80% 抑制，而且 Pyk-2 的下调导致血管紧张素 II 诱导的蛋白合成受到完全抑制。作者认为 Pyk-2 作为 ERK1/2 和磷脂酰激酶 -3/Akt 途径的一种上游调节因子参与了血管紧张素 II 诱导的 VSMC 蛋白合成。

再如 Park et al^[52]发现 PC12 细胞中蛋白激酶 A(PKA) 对于去极化诱导的 ERK 和 p38 的激活是必需的，此外还发现去极化诱导的 Pyk-2 的酪氨酸残基的磷酸化可由于 PKA 的抑制而被阻断，而 Pyk-2 是 MAPK 活化的一个关键的钙敏感性上游调节因子。与去极化诱导的信号途径相反，由缓激肽，一种 G 蛋白耦连受体激动剂，不能被 PKA 的抑制而被阻断。作者认为 PKA 的抑制阻断了去极化诱导的 Pyk-2/MAP 激酶途径的活化，因此阻断了早期基因的表达。

Sorokin et al 在大鼠和人肾小球系膜细胞中研究了 ERK 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶内皮素(ET)-依赖性激活的分子机制，发现在表达 Pyk-2 结构域阴性的人和大鼠肾小球系膜细胞中，ET-1 诱导的 p38 MAPK 途径(而不是 ERK 途径)激活受到抑制。这表明 Pyk-2 参与了 ET-1 介导的 p38 MAPK 激酶级联反应激活。

Jeon et al^[53]报道在大鼠海马回中通过电惊厥休克(ECS)可以激活 MAPKs、MEK 和 Rafs，由于在神经细胞中有报道 Pyk-2 和 Src 参与了 MAPK 的激活，受此启发作者探讨了电惊厥休克后 Pyk-2 是否为 Raf-MEK-MAPK 级联反应的上游途径，结果检测到 ECS 后大鼠海马回中 Pyk-2 的酪氨酸磷酸化和激活。ECS 能瞬时增加 Pyk-2 多个酪氨酸残基的磷酸化，并且这种磷酸化作用 1 min 后达到高峰 10 min 后降到基础值；1 min 后也观察到 Pyk-2 与 Src 和 Grb2、Grb2 与 Ras 的结合增强。综合实验结果作者认为 ECS 激活 Pyk-2，其经由 Src、Grb2 和 Ras 将信号转导到 MAPK 级联反应。

Sancho et al^[54]发现 Pyk-2 与微管组织中心(microtubule-organizing center, MTOC) 共定位于迁移性 NK 细胞的蔓延边缘。当多克隆的 NK 细胞结合到 K562 鞣位时，Pyk-2 就异位到 NK 与靶细胞相互作用区域。此过程的特异性体现在具有抑制或激活 CD94/NKG2 表位的 NK 细胞中。Pyk-2、MTOC 和 paxillin 转移到 NK 与靶细胞相互作用区域，此过程的调节是建立在控制靶细胞杀伤的 NK 细胞受体介导的对靶细胞的特异性识别的基础上。并行体外激酶测定表明 Pyk-2 能被特异性的信号激活，这些信号能触发其移位和 NK 细胞介导的细胞毒性。野生型和显负性的 Pyk-2 突变体二者的过表达，而非 ZAP-70 野生型能阻止 MTOC 和 paxillin 特异性的移位，并且可阻断 NK 细胞的细胞毒性反应。作者认为 Pyk-2 的区室化与有效的信号转导有关；另外，该研究还表明 Pyk-2 在能调节细胞毒性反应的信号复合物的组装过程中发挥重要作用。

体内葡萄糖既可作为一种营养因子又是生理和病理过程的调节因子。Gautam et al 报道葡萄糖和某些糖类能通过一种机制快速激活 ERK，该机制不依赖葡萄糖的摄入和新代谢以及 PKC，而依赖 PYK-2、GRB2、SOS、RAS、RAF 和 MEK1 并且通过葡萄糖(运)载体 1(glucose transporter)的过表达得到放大而不是 Glut2、Glut3 或 Glut4。这种放大作用不依赖葡萄糖的摄取而依赖 Glut1 羧基端的第 463-468 aa，IASGFR。Glut1 羧基端的第 469-492 的残基缺失对这种机制是无效的，但是第 465 位的丝氨酸或 468 位的精氨酸的突变产生的显负性突变能抑制葡萄糖依赖的 ERK 激活。葡萄糖促进 Pyk-2 第 402 和 881 位的酪氨酸残基磷酸化和 Pyk-2 结合到 Myc-Glut1 上。据此作者认为通过一种需要 Pyk-2 和 Glut1 羧基端的第 463-468 残基 IASGFR 参与的机制，葡萄糖激活 GRB2/SOS/RAS/RAF/MEK1/ERK 信号途径，并且在葡萄糖将信号传导到 Pyk-2 和 ERK 的过程中 Glut1 充当了一种传感器，换能器和放大器的作用。

Pyk-2 和雄激素受体(androgen receptor, AR)，在前列腺癌进程中的一个关键转录因子，他们之间的连接关系仍是不清楚。Wang et al^[55]报道利用全长的雄激素受体结合蛋白，ARA55，一种共调节因子作为诱饵，分离到 ARA55 相互作用蛋白 Pyk-2，并且证实 Pyk-2 通过灭活 ARA55 能抑制 AR 的反式激活作用。这种灭活作用是由于 Pyk-2 对于 ARA55 的第 43 位直接磷酸化的结果。

Pyk-2 在前列腺上皮细胞中的表达与前列腺癌的恶性程度相关。Picascia et al^[56]利用 PC3 细胞系来研究 Pyk-2 在前列腺细胞增生和分化过程中的调节作用。在 PC3 细胞中 Pyk-2 能被常规的刺激物例如肿瘤坏死因子-α 和溶血磷脂酸(LPA) 所激活。而 LPA 不但刺激 Pyk-2 的磷酸化还能诱导这些细胞中 ERK1/2 的激活。PC3 细胞克隆(PC3-PKM) 能表达显负性的激酶缺陷型 Pyk-2 的突变体，该细胞系的增生与野生型 PC3 细胞相比明显下降。作者认为 Pyk-2 在前列腺细胞增生的调节中发挥作用，其表达水平可作为前列腺细胞分化状态的一种灵敏的指示标志。

糖元合成激酶 3β(GSK3β) 是一种参与了多种细胞活动的丝氨酸/色氨酸激酶。其酪氨酸残基被磷酸化后表现出活化。Hartigan et al^[57]首先证实 GSK3β 在体内和原位都是 Pyk-2 的作用底物。GSK3β 的酪氨酸被磷酸化后表现出活化。

单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1) 在动脉粥样硬化和炎症过程中具有决定性的作用。Yamasaki et al^[58]研究了单核细胞系 THP-1 中 Pyk-2 在 MCP-1 介导的信号转导中的作用，发现 MCP-1 刺激后 Pyk-2 的酪氨酸残基被快速磷酸化，Lyn、Shc 和 paxillin 的酪氨酸残基也被磷酸化。通过免疫沉淀和免疫印迹实验检测到这些免疫分子间的结合，发现 Pyk-2 和 Lyn 的结合依赖于 MCP-1 的刺激和 Pyk-2 酪氨酸残基的磷酸化，p38 的磷酸化也

依赖 Pyk-2 酪氨酸残基的磷酸化，然而 Pyk-2 和 Grb2 的结合不受 MCP-1 的刺激影响。ERK 的磷酸化并没有因为负性激酶 Pyk-2 的过表达而受到影响。作者认为在 THP-1 细胞中 Pyk-2 可以与 Grb2、Lyn 形成复合物，但是 Pyk-2 并不总是参与 MCP-1 介导的信号转导途径。

2 PYK-2 在病毒性肝炎中的意义

乙型肝炎病毒(HBV)基因组的 X 开放读码框(ORF)编码一条 145-154 aa 的蛋白，分子量 17 kD 左右。乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBxAg)对于土拨鼠的嗜肝病毒感染和其他哺乳动物嗜肝 DNA 病毒在体内复制是必不可少的。HBx 对 Src 的激活对于 HBV DNA 的复制非常重要。Bouchard et al [59] 报道 HBx 激活胞质钙离子依赖的 Pyk-2，其是 Src 激酶的激活剂。抑制 Pyk-2 或者由线粒体钙通道介导的钙信号就可以阻断 HBx 对 HBV DNA 复制的激活，这表明 HBx 作用于线粒体钙通道的调节。能升高胞质钙离子浓度的反应物能替代 HBx 蛋白在 HBV DNA 复制中的作用。因此作者认为对于 HBV DNA 的复制胞质钙离子浓度的变化是一种基本条件并且由 HBx 蛋白介导。

Pyk-2 作为 FAK 非受体型酪氨酸激酶家族中的一员，可被细胞内外多种刺激诱导激活，参与了多种信号传导途径，再细胞的生存代谢过程具有重要的作用，进一步阐明其在肝脏疾病发生发展过程中的作用机制对于寻找肝病治疗预防的突破口很有意义，也是我们面临的艰巨任务。

3 参考文献

- 1 Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S. RAFTK/Pyk-2-mediated cellular signaling. *Cell Signal* 2000;12:123-133
- 2 Girault J-A, Costa A, Derkinderen P, Studler JM, Toutant M. FAK and PYK-2/CAB? in the nervous system: a link between neuronal activity, plasticity and survival? *Trends Neurosci* 1999;22:257-263
- 3 Sasaki H, Nagura K, Ishino M, Tobioka H, Kotani K, Sasaki T. Cloning and characterization of cell adhesion kinase ? a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem* 1995;270:21206-21219
- 4 Avraham S, London R, Fu Y, Ota S, Hiregowdara D, Li S, Jiang S, Pasztor LM, White RA, Groopman JE, Avraham H. Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J Biol Chem* 1995;270:27742-27751
- 5 Zheng C, Xing Z, Bian ZC, Guo C, Akbay A, Warner L, Guan JL. Differential regulation of PYK-2 and focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem* 1998;273:2384-2389
- 6 Sabri A, Govindarajan G, Griffin TM, Kenneth LB, Samarel AM, Lucchesi PA. Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK-2 by angiotensin II in vascular smooth muscle. *Circ Res* 1998;83:841-851
- 7 Brinson AE, Harding T, Dilberto PA, He Y, Li X, Hunter D, Herman B, Earp HS, Graves LM. Regulation of a calcium-dependent tyrosine kinase in vascular smooth muscle cells by angiotensin II and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1998;273:1711-1718
- 8 Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F, Hirata Y. Involvement of PYK-2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999;33:201-206
- 9 Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J. A role for PYK-2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 1996;383:547-550
- 10 Blaukat A, Ivankovic-Dikic I, Grb2 E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K, Dikic I. Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk-2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 1999;274:14893-14901
- 11 Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 1997;272:19125-19132
- 12 Earp HS, Huckle WR, Dawson TL, Li X, Graves LM, Dy R. Angiotensin II activates at least two tyrosine kinases in rat liver epithelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:28440-28447
- 13 Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK-2 involved in Ca²⁺ induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995;376:737-745
- 14 Sasaki H, Nagura K, Ishino M, Tobioka H, Kotani K, Sasaki T. Cloning and characterization of cell adhesion kinase p, a novel protein tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem* 1995;270:21206-21219
- 15 Herzog H, Nicholl J, Hort YI, Sutherland GR, Shine J. Molecular cloning and assignment of FAK-2, a novel human focal adhesion kinase to 8p11.2-p22 by nonisotopic in situ hybridization. *Genomics* 1996;32:484-486
- 16 Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994;372:786-791
- 17 Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK-2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ionchannel and MAP kinase functions. *Nature* 1995;376:737-745
- 18 Astier A, Avraham H, Manie SN, Groopman J, Carty T, Avraham S, Freedman AS. The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosine-phosphorylated after beta1-integrin stimulation in B cells and binds to p130cas. *J Biol Chem* 1997;272:228-232
- 19 Polte TR, Hanks SK. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130Cas) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem* 1997;272:5501-5509
- 20 Girault JA, Labesse G, Mornon JP, Callebaut I. The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem Sci* 1999;24:54-57
- 21 Salgia R, Avraham S, Pisick E, Li JL, Raja S, Greenfield EA, Sattler M, Avraham H, Griffin JD. The related adhesion focal tyrosine kinase forms a complex with paxillin in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1996;271:31222-31226
- 22 Hiregowdara D, Avraham H, Fu Y, London R, Avraham S. Tyrosine phosphorylation of the related adhesion focal tyrosine kinase in megakaryocytes upon stem cell factor and phorbol myristate acetate stimulation and its association with paxillin. *J Biol Chem* 1997;272:10804-10810
- 23 Li X, Earp HS. Paxillin is tyrosine-phosphorylated by and preferentially associates with the calcium-dependent tyrosine kinase in rat liver epithelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:14341-14348
- 24 Ueda H, Abbi S, Zheng C, Guan JL. Suppression of Pyk-2 kinase and cellular activities by FIP200. *J Cell Biol* 2000;149:423-430
- 25 Lev S, Hernandez J, Martinez R, Chen A, Plowman G, Schlessinger J. Identification of a novel family of targets of PYK-2 related to Drosophila retinal degeneration B (rdgB) protein. *Mol Cell Biol* 1999;19:2278-2288
- 26 Andreev J, Simon JP, Sabatini DD, Kam J, Plowman G, Randazzo PA, Schlessinger J. Identification of a new Pyk-2 target protein with Arf-GAP activity. *Mol Cell Biol* 1999;19:2338-2350

- 27 Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 1995;377:539-544
- 28 Cary LA, Chang JF, Guan JL. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci* 1996;109:1787-1794
- 29 Cary LA, Han DC, Polte TR, Hanks SK, Guan JL. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol* 1998;140:211-221
- 30 Gilmore AP, Romer LH. Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Mol Biol Cell* 1996;7:1209-1224
- 31 Sieg DJ, Ilic D, Jones KC, Damsky CH, Hunter T, Schlaepfer DD. Pyk-2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk-2 does not fully function to enhance FAK-cell migration. *EMBO J* 1998;17:5933-5947
- 32 Klingbeil CK, Hauck CR, Hsia DA, Jones KC, Reider SR, Schlaepfer DD. Targeting Pyk-2 to beta 1-integrin-containing focal contacts rescues fibronectin-stimulated signaling and haptotactic motility defects of focal adhesion kinase-null cells. *J Cell Biol* 2001;152:97-110
- 33 Chen LM, Bailey D, Fernandez-Valle C. Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J Neurosci* 2000;20:3776-3784
- 34 Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000;2:249-56
- 35 Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* 1993;123:993-1005
- 36 Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 1995;270:16995-16999
- 37 Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, Morimoto C. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med* 1995;182:1089-1100
- 38 Liu S, Thomas SM, Woodside DG, Rose DM, Kiosses WB, Pfaff M, Ginsberg MH. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* 1999;402:676-681
- 39 Zhang X, Chattopadhyay A, Ji Q, Owen JD, Ruest PJ, Carpenter G, Hanks SK. Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9021-9026
- 40 Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1996;134:793-799
- 41 Zhao JH, Reiske H, Guan JL. Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1998;143:1997-2008
- 42 Xiong W, Parsons JT. Induction of apoptosis after expression of PYK-2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1997;139:529-539
- 43 Tokiwa G, Dikic I, Lev S, Schlessinger J. Activation of Pyk-2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science* 1996;273:792-794
- 44 Yu H, Li X, Marchetto GS, Dy R, Hunter D, Calvo B, Dawson TL, Wilm M, Anderegg RJ, Graves LM, Earp HS. Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1996;271:29993-29998
- 45 Ren XR, Du QS, Huang YZ, Ao SZ, Mei L, Xiong WC. Regulation of CDC42 GTPase by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with PSGAP, a novel pleckstrin homology and Src homology 3 domain containing rhoGAP protein. *J Cell Biol* 2001;152:971-984
- 46 Klingbeil CK, Hauck CR, Hsia DA, Jones KC, Reider SR, Schlaepfer DD. Targeting Pyk-2 to beta 1-integrin-containing focal contacts rescues fibronectin-stimulated signaling and haptotactic motility defects of focal adhesion kinase-null cells. *J Cell Biol* 2001;152:97-110
- 47 Siciliano JC, Toutant M, Derkinderen P, Sasaki T, Girault JA. Differential regulation of proline-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase beta (PYK-2/CAKbeta) and pp125(FAK) by glutamate and depolarization in rat hippocampus. *J Biol Chem* 1996;271:28942-28946
- 48 Gismondi A, Bisogno L, Mainiero F, Palmieri G, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Proline-rich tyrosine kinase-2 activation by $\alpha 1$ integrin fibronectin receptor cross-linking and association with paxillin in human natural killer cells. *J Immunol* 1997;159:4729-4736
- 49 Rodríguez-Fernández JL, Gómez M, Luque A, Hogg N, Sánchez-Madrid F, Cabañas C. The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 1999;10:1891-1907
- 50 Wang Z, Brecher P. Salicylate Inhibits Phosphorylation of the Nonreceptor Tyrosine Kinases, Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 and c-Src. *Hypertension* 2001;37:148-153
- 51 Rocic P, Lucchesi PA. Down-regulation by antisense oligonucleotides establishes a role for the proline-rich tyrosine kinase PYK-2 in angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2001;276:21902-21906
- 52 Park JH, Park JK, Bae KW, Park HT. Protein kinase A activity is required for depolarization-induced proline-rich tyrosine kinase 2 and mitogen-activated protein kinase activation in PC12 cells. *Neurosci Lett* 2000;290:25-28
- 53 Jeon SH, Oh SW, Kang UG, Ahn YM, Bae CD, Park JB, Kim YS. Electroconvulsive shock increases the phosphorylation of Pyk-2 in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:1026-1030
- 54 Sancho D, Nieto M, Llano M, Rodriguez-Fernandez JL, Tejedor R, Avraham S, Cabanas C, Lopez-Bonet M, Sanchez-Madrid F. The tyrosine kinase PYK-2/RAFTK regulates natural killer (NK) cell cytotoxic response, and is translocated and activated upon specific target cell recognition and killing. *J Cell Biol* 2000;149:1249-1262
- 55 Wang X, Yang Y, Guo X, Sampson ER, Hsu CL, Tsai MY, Yeh S, Wu G, Guo Y. Suppression of androgen receptor transactivation by Pyk-2 via interaction and phosphorylation of the ARA55 coregulator. *J Biol Chem* 2002;277:15426-15433
- 56 Picascia A, Stanzione R, Chieffi P, Kisslinger A, Dikic I, Tramontano D. Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates proliferation and differentiation of prostate cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002;186:81-87
- 57 Hartigan JA, Xiong WC, Johnson GV. Glycogen synthase kinase 3beta is tyrosine phosphorylated by PYK-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:485-489
- 58 Yamasaki M, Arai H, Ashida N, Ishii K, Kita T. Monocyte chemoattractant protein 1 causes differential signalling mediated by proline-rich tyrosine kinase 2 in THP-1 cells. *Biochem J* 2001;355:751-756
- 59 Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001;294:2376-2378

核因子κB的信号转导机制及研究策略

巨立中,成军,钟彦伟

巨立中,成军,钟彦伟,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室,北京市100039国家自然科学基金项目, No.C03011402, No.C30070689,军队“九、五”科技攻关项目No.98D063,军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038,军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138,军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135。

项目负责人:成军,10039,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:2003-11-13 接受日期:2003-12-16

巨立中,成军,钟彦伟.核因子κB的信号转导机制及研究策略.世界华人消化杂志 2004;12(4):948-950
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/948.asp>

0 引言

核因子κB(nuclear factor of κB, NF-κB)是一种广泛存在的转录因子,几乎每个真核细胞中都存在NF-κB,不同的刺激信号激活该转录因子后,参与相应的基因表达的调控,如细胞的生长、分化、凋亡、炎症反应、肿瘤发生等^[1-2]。由于其广泛的生物学活性,对NF-κB的研究为阐明某些疾病的发病机制及治疗具有重要的意义。

1 NF-κB的结构及信号转导机制

1986年,Sen et al^[3]首次发现成熟浆细胞中存在与免疫球蛋白κ轻链基因的增强子序列特异性结合,并促进κ链基因转录的核蛋白因子。随后的研究发现,NF-κB是一种普遍存在的转录因子,已发现有150多种物质可以激活NF-κB,受NF-κB调控的基因多达150种^[4]。最初研究发现NF-κB是由p50和p65两个亚单位组成的异二聚体,后来发现存在有NF-κB家族,由于NF-κB与Rel家族有较强的同源性,所以又把NF-κB与Rel合称为Rel/NF-κB家族,在哺乳类动物中已发现Rel/NF-κB家族的5个成员:p65(RelA)、RelB、c-Rel、p50(NF-κB1)、p52(NF-κB2)。在大多数细胞中,p50和p65是NF-κB活性形式的主要成分,所以通常所说的NF-κB或Rel/NF-κB即为p50/p65异源二聚体。NF-κB特异的结合位点是κB,其DNA序列为5'-GGGRNYYYYC C-3'(R为任一嘌呤,Y为任一嘧啶,N为任一核苷酸),该序列也称为κB元件。NF-κB家族成员在N-端有一个约300个氨基酸残基(aa)的高度保守的Rel同源区,负责NF-κB因子的二聚化、核定向易位、与DNA及IκB结合。根据C-端的结构和功能不同,将NF-κB因子的组成肽链分为p50和Rel组,p50组包括p50、p52,而Rel组包括p65、RelB、c-Rel。p50组成员的主要功能是结合DNA,不具有转录激活功能。Rel组成员具有转录激活作用。p50组成员和Rel组成员间形成的异源二聚体为转录激活复合物,而p50组间形成的同源二聚体为转

录抑制复合物。通常NF-κB与IκB(inhibitory protein of NF-κB)结合。NF-κB的激活受其胞质抑制蛋白IκB的调控,IκBs与NF-κB结合,掩盖他的核定位信号,从而使NF-κB滞留在细胞质内,处于无活性状态。IκB也是一种大的抑制分子家族,包括IκBα、IκBβ、IκBε、IκBγ、Bcl-3和Caltus(果蝇中)等成员,它们的共同特点是在C-端有锚蛋白(Ank)重复序列,除了Bcl-ε外,其他IκB成员有一个与降解有关的PEST区。Bcl-ε是惟一位于核内并促进NF-κB转录,而非抑制NF-κB核易位的IκB家族成员^[5-8]。另外,Cohen et al^[9]在研究促炎症细胞因子激活NF-κB的信号转导中,分离到一个较大的白介素-1(IL-1)诱导的IKK复合物,IKK是由IKKα、IKKβ和IKKγ三个亚单位组成的三聚体,IKKα和IKKβ共同有一个与降解有关的KD区和一个亮氨酸拉链(LZ),IKKα、IKKβ和IKKγ三者功能不同,且不可相互替代,IKKα和IKKβ为酶解功能单位,IKKγ为调节单位,负责对IKKα和IKKβ的活性进行调节。NF-κB信号转导通路十分复杂,多数认为是:各种信号经由不同的方式激活IKK,IKK进一步将IκB磷酸化,例如IκBa的磷酸化部位分别在Ser32和Ser36,而IκBβ的磷酸化部位在Ser19和Ser23。接下来在泛素连接酶的作用下,IκB上的某些Lys发生泛素化,导致IκB被26S的蛋白酶体水解,于是受其抑制的NF-κB得以释放,发生核易位,进入细胞核与相应的κB位点结合,启动特异的靶基因转录^[10]。

2 NF-κB的研究策略

由于NF-κB有多种功能,其信号转导途径亦十分复杂,对它的研究方法多种多样,目前研究的主要目的在于阐明:什么因子可以激活NF-κB;什么因子可以抑制NF-κB的激活?这些因子是通过何种途径作用的?NF-κB被激活后用什么手段进行证实?下文介绍几种常用的研究策略,根据实验目的,可以单独应用,但更多的是将几种方法结合使用。

2.1 转基因小鼠模型 Carlsen et al^[11]于2000年建立了一种转基因小鼠动物模型,用来在体内动态观察NF-κB的活性。模型的构建方法为:(1)将Igκ轻链启动子基因(至少含3个NF-κB的结合位点)与荧光虫的荧光素编码基因相连构成3x-κB-luc目的基因,将该基因与质粒相连,构成表达载体,用Hind III和Bgl I使质粒载体线性化;(2)♀小鼠(C57BL/6J×CBA/J)与♂小鼠交配,取出受精卵,用微注射法将线性化的质粒注入受精卵内,将该受精卵植入假孕小鼠子宫内,3x-κB-luc基因阳性的子代小鼠可用来作为模型;(3)由于该转基因小鼠携带有NF-κB控制的萤光素酶编码基因,能使萤光素发光,因此可根据不同的需要将完整的小鼠或部分器官与一特殊的显像系统相连,先给小鼠注射D-萤光素,再根据需要注射不同的NF-κB激活物如肿瘤坏死因子α(TNFα)等,用显像系统观察不同部位的光强度,根

据光强度判断 NF- κ B 的活性。他们的研究结果表明，在无外界刺激的情况下，小鼠的颈部淋巴结、胸腺、腹部集合淋巴结有强的发光，用 TNF α ，IL-1 α 或脂多糖(LPS)刺激小鼠后，光强度明显增加且呈组织特异性，即皮肤、肺、脾、小肠壁、腹腔集合淋巴结最强，肝、肾、心、骨骼肌次之，脂肪组织最弱。进一步用紫外线照射皮肤或建立类风湿关节炎模型，相应的皮肤区及受累关节光强度明显增加。该模型用途广，特异性好，不仅用来阐明某些疾病的发病机制，也可用来筛选抑制 NF- κ B 活性的药物，如给小鼠注射 TNF α 之前注射地塞米松，则相应部位的光强度未增加，表明地塞米松能抑制 TNF α 激活 NF- κ B 的作用^[12-13]。

2.2 抗体定位及酶学检测 如前所述，刺激因子激活 NF- κ B，其易位于核内，与靶基因结合发挥作用。检测 NF- κ B 是否定位于核内，可判断 NF- κ B 是否被激活，常用抗 p65 的单克隆抗体作为一抗，用异硫氰酸荧光素标记的兔抗鼠抗体为二抗，将细胞与抗体孵育后用免疫荧光分析法确定 p65 的位置，将这一方法称为抗体定位法。Purcell et al^[14] 用 p65 单克隆抗体免疫荧光分析法检测到乙型肝炎病毒 X 蛋白(pX)能通过不依赖 IKK 的途径激活 NF- κ B。该法简便易行，但可靠性略差，因此常将该法与酶学检测结合使用^[15-16]。酶学检测的基本原理为：将 Ig κ 链的基因片段(含 NF- κ B 的结合位点)与虫荧光素酶编码基因(报告基因)相连，构建质粒表达载体，将该载体转染细胞，用刺激因子如 TNF α 激活 NF- κ B，报告基因表达荧光素酶，通过对该酶的检测，可确定某因子是否激活 NF- κ B 及 NF- κ B 是否发挥转录调节作用。将抗体定位与酶学检测结合使用，不仅能确定 NF- κ B 是否易位入核内，而且能得知 NF- κ B 是否发挥转录调节作用。

2.3 DNA 迁移率变动试验 DNA 迁移率变动试验(DNA mobility shift assay, EMSA)，又叫凝胶阻滞(gel retardation)试验，是一种体外研究 DNA 与蛋白质相互作用的特殊的凝胶电泳技术。基本原理为^[17]：在凝胶电泳中，由于电场的作用，小分子 DNA 片段比其结合了蛋白质的 DNA 片段向阳极移动的速度快，因此，可标记短的双链 DNA 片段，将其与蛋白质混合，对混合物进行凝胶电泳，若目的 DNA 与特异性蛋白质结合，其向阳极移动的速度受到阻滞，对凝胶进行放射性自显影，就可证实特异性 DNA 与相应蛋白结合。在进行 NF- κ B 研究中，标记 Ig κ 轻链 DNA，与特异性刺激因子刺激的细胞核提取物作用，然后进行 DNA 迁移率变动试验，若该刺激因子能激活 NF- κ B，后者易位入细胞核内，则核提取物中出现 NF- κ B，标记的 DNA 与 NF- κ B 结合，进行放射性自显影可发现二者结合及结合的位点，反之亦然。该实验已广泛用于 NF- κ B 的研究中^[18-21]，其不仅能证实某些疾病的发病与 NF- κ B 有关，而且用于阻断 NF- κ B 活性的药物的筛选。Herfarth et al^[22]证实，在葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium)激活 NF- κ B 后所

致小鼠的结肠炎发病中，NF- κ B 的激活可被胶毒霉素(gliotoxin)阻断，因而认为胶毒霉素是有希望的治疗结肠炎的药物。

2.4 显负性突变体的应用 显负性突变是基因的构成突变，这种突变体基因表达有缺陷的产物，即表达产物可与野生型基因表达产物结合，但结合后使野生型基因表达产物失去激活作用^[23]。显负性突变体在 NF- κ B 信号转导研究中应用十分广泛，显负性突变体主要用来做对照，根据实验目的，可构建多种显负性突变体^[23-27]。如为阐明某刺激因子是否通过 IKK 途径激活 NF- κ B，可构建该因子的显负性突变体作对照，将突变型因子及野生型因子分别与 IKK 作用，以观察刺激因子能否通过 IKK 途径激活 NF- κ B。Nemoto et al^[28]为了研究有丝分裂原激活蛋白激酶激酶激酶1(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, MEKK1)对 IKK 复合体的激活作用，构建了 MEKK1 的显负性突变体，经实验证实，野生型 MEKK1 对 IKK 有激活作用，而显负性突变体 MEKK1 不仅不能激活 IKK，而且有阻碍 TNF α 激活 IKK 的作用。

3 参考文献

- 1 Heyninck K, Krike MM, Beyaert R. Structure-function analysis of the A20-binding inhibitor of NF-KB activation, ABIN-1. *FEBS Letters* 2003;536:135-140
- 2 Nair A, Venkatraman M, Malieka TT, Nair B, Karunagaran D. NF-KB is constitutive activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 2003;22:50-58
- 3 Sen R, Baltimore D. Inducibility of Kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-Kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47:921-928
- 4 Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-KappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-6886
- 5 Chen X, Shen B, Xia L, Khaletzkij A, Cheu D, Wong DCJ, Li LL. Activation of nuclear KB in radiosensitivity of TP53-inactive human keratinocytes. *Cancer Res* 2002;62:1213-1221
- 6 Karin M. How NF-Kappa B is activated: the role of the kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999;49:6867-6874
- 7 Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB complex. *Cell* 1997;91:299-302
- 8 Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB complex. *Cell* 1997;91:299-302
- 9 Cohen L, Henzel WJ, Baeuerle PA. IKPA is a scaffold protein of the I kappaB complex. *Nature* 1998;395:292-296
- 10 Huffel SV, Delaei F, Heyninck K, Valck DD, Beyaert R. Identification of a novel A20-binding inhibitor of nuclear factor-KB activation termed ABIN-2. *J Biol Chem* 2001;276:3026-30223
- 11 Carlsen H, Moskaug J, Fromm SH, Blohoff R. In vivo imaging of NF-KB activity. *J Immunol* 2002;168:1441-1446
- 12 Lernbecher T, Muller U, Wirth T. Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* 1993;365:767-770
- 13 Blackwell TS, Yull FE, Chen CL, Venkatakrishnan A, Blackwell TR, Hicks DJ, Lancaster LH, Christman JW, Kerr LD. Multiorgan nuclear factor kappa B activation in a transgenic mouse model of systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1095-1101
- 14 Purcell NH, Yu C, He D, Xiang J, Paran N, DiDonato JA, Yamaoka S, Shaul Y, Lin A. Activation of NF-kappaB by hepatitis B virus X protein through an IkappaB kinase-independent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G669-G677
- 15 Kwon JA, Rho HM. Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through

- the nuclear factor kappaB binding site. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:445-455
- 16 DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997;388:548-554
- 17 Weaver RF. Molecular biology. 2 ed. 北京:科学出版社, 2002: 124-127
- 18 Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol* 2002;220:83-95
- 19 Arlt A, Vorndamm J, Muerkoster S, Yu H, Schmidt WE, Folsch UR, Schafer H. Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2002;62:910-916
- 20 Kabouridis PS, Hasan M, Newson J, Gilroy DW, Lawrence T. Inhibition of NF-kappa B activity by a membrane-transducing mutant of I kappa B alpha. *J Immunol* 2002;9:2587-2593
- 21 Chiao PJ, Na R, Niu J, Scelabas GM, Dong Q, Curley SA. Role of Rel/NF-kappaB transcription factors in apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer* 2002;95:1696-1705
- 22 Herfarth H, Brand K, Rath HC, Rogler G, Scholmerich J, Falk W. Nuclear factor-kappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol* 2000;120:59-65
- 23 Weaver RF. Molecular biology. second ed. 北京: 科学出版社, 2002:178-181
- 24 Swantek JL, Christerson L, Cobb MH. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α promoter activity is inhibitor of nuclear factor- κ B kinase-dependent. *J Biol Chem* 1999;274: 11667-11671
- 25 Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997;278:1612-1615
- 26 Berenson JR, Ma HM, Vescio R. The role of nuclear factor-kappaB in the biology and treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001;28:626-633
- 27 Kibbe MR, Johnnides C, Gleixner S, Kovesdi I, Lizonova A, Zuckerbraun B, Billiar TR, Tzeng E, Muluk SC. Regulation of tissue factor expression in smooth muscle cells with nitric oxide. *J Vasc Surg* 2003;37:650-659
- 28 Nemoto S, DiDonato JA, Lin A. Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase. *Mol Cell Biol* 1998; 18:7336-7343

细胞色素CYP II E1与肝脏疾病关系的研究进展

王春花,成军,郎振为,吴煜,杨艳杰,纪冬,党晓燕

王春花,成军,刘煜,杨艳杰,纪冬,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

郎振为,首都医科大学佑安医院病理科,北京市 100050
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135.

项目负责人:成军,10039,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.
cjj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

王春花,成军,郎振为,吴煜,杨艳杰,纪冬,党晓燕. 细胞色素CYP II E1与肝脏疾病关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(4):950-954

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/950.asp>

0 引言

在肝细胞微粒体内有1个氧化还原酶系统,由多种水解酶和结合酶组成。这个酶系统在生理情况下,可以促进生理活性物质的灭活和排泄,另一方面也可以促进药物代谢,所以又叫药酶。细胞色素P450是药酶中的一种多功能氧化还原酶,他可以使药物的羟基及芳香基羟化,使硝基及偶氮化合物还原成氨基,因他的一氧化碳结合物的吸收光谱高峰在450 nm处,故叫P450。P450是肝药酶中最重要的酶系,参与各种外源物(如药物、化学毒物、致癌物等)和内源物(如类固醇激素、维生素D、胆酸等)在体内代谢过程。P450中现已知有70多种药物代谢酶分别催化不同物质的生物转化。其中细胞色素P450 II E1(CYP II E1)是二甲基亚硝胺D-脱甲基酶,主要在肝脏表达,一些疏水性的外来物质经CYP II E1转化后形成极性更大的物质排出体外,而有时可能被转化为细胞毒、致癌、致突变作用更强的物质,例如他代谢酒精、四氯化碳、对乙酰氨基酚等,生成毒性更大的物质;代谢乙醇生成活性氧基,产生肝毒性,因此生物学效应具有双面性^[1]。越来越多的研究表明CYP II E1与各种肝病的关系密切。

1 CYP II E1

1.1 CYP II E1的分布和基因结构 1987年Wrighton et al同时从人的肝微粒体分离纯化出CYP II E1并分别命名为P450HLJ和P450ALC。其与先前在兔和大鼠肝微粒体中发现的CYP II E1的氨基酸序列约有80%是相同的,彼此间的活性非常相似,并且迄今发现的作用底物在人和动物中也是相同的^[2],这为利用动物替代人类进行实验研究提供了可行性具有重要的科研意义。人的CYP II E1主要分布于成人肝脏并富集于肝小叶中心区域,近年陆续发现在鼻腔、食管、胃、小肠、结肠、肺、肾和皮肤等许多肝外组织器官有不同程度的表达。CYP II E1的分子量为56.9 kDa,基因定位于第10号染色体上,其大小为11.4 kb,由9个外显子和8个内显子,一个典型的TATA盒子组成,编码493个氨基酸残基(aa)的蛋白,他的全部序列及其上游的2 788 bp和下游的559 bp的顺序^[3]。

1.2 CYP II E1的基因多态性 CYP II E1的个体差异大,体外用免疫学方法检测发现可达50倍,同一个体受到诱导激活前后差别也较大,例如酒精代谢中除了酒精脱氢酶为主要系统,他如同血型一样终生不会改变,CYP II E1系统占酒精代谢能力的15%左右,而且可以被激活,一般所谓酒量愈练愈大,就是和这个代谢路径有关。此外该酶也存在显著种族差异,如日本人美国黑人^[4]均明显低于美国白人。这些差异可能与遗传因素有关,因为CYP II E1存在6种限制性内切酶片段长度多态性(RFLP),即Taq I、Dra I、Rsa I和Msp I RFLP,以及5' - 端的Pst I和Rsa I RFLP^[5],其中Dra I的5' - 端的Pst I和Rsa I在转录水平影响CYP II E1的

- the nuclear factor kappaB binding site. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:445-455
- 16 DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 1997;388:548-554
- 17 Weaver RF. Molecular biology. 2 ed. 北京:科学出版社, 2002: 124-127
- 18 Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol* 2002;220:83-95
- 19 Arlt A, Vorndamm J, Muerkoster S, Yu H, Schmidt WE, Folsch UR, Schafer H. Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2002;62:910-916
- 20 Kabouridis PS, Hasan M, Newson J, Gilroy DW, Lawrence T. Inhibition of NF-kappa B activity by a membrane-transducing mutant of I kappa B alpha. *J Immunol* 2002;9:2587-2593
- 21 Chiao PJ, Na R, Niu J, Scelabas GM, Dong Q, Curley SA. Role of Rel/NF-kappaB transcription factors in apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer* 2002;95:1696-1705
- 22 Herfarth H, Brand K, Rath HC, Rogler G, Scholmerich J, Falk W. Nuclear factor-kappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol* 2000;120:59-65
- 23 Weaver RF. Molecular biology. second ed. 北京: 科学出版社, 2002:178-181
- 24 Swantek JL, Christerson L, Cobb MH. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α promoter activity is inhibitor of nuclear factor- κ B kinase-dependent. *J Biol Chem* 1999;274: 11667-11671
- 25 Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997;278:1612-1615
- 26 Berenson JR, Ma HM, Vescio R. The role of nuclear factor-kappaB in the biology and treatment of multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001;28:626-633
- 27 Kibbe MR, Johnnides C, Gleixner S, Kovesdi I, Lizonova A, Zuckerbraun B, Billiar TR, Tzeng E, Muluk SC. Regulation of tissue factor expression in smooth muscle cells with nitric oxide. *J Vasc Surg* 2003;37:650-659
- 28 Nemoto S, DiDonato JA, Lin A. Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase. *Mol Cell Biol* 1998; 18:7336-7343

细胞色素CYP II E1与肝脏疾病关系的研究进展

王春花,成军,郎振为,吴煜,杨艳杰,纪冬,党晓燕

王春花,成军,刘煜,杨艳杰,纪冬,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

郎振为,首都医科大学佑安医院病理科,北京市 100050
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135.

项目负责人:成军,10039,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.
cjj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

王春花,成军,郎振为,吴煜,杨艳杰,纪冬,党晓燕. 细胞色素CYP II E1与肝脏疾病关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(4):950-954

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/950.asp>

0 引言

在肝细胞微粒体内有1个氧化还原酶系统,由多种水解酶和结合酶组成。这个酶系统在生理情况下,可以促进生理活性物质的灭活和排泄,另一方面也可以促进药物代谢,所以又叫药酶。细胞色素P450是药酶中的一种多功能氧化还原酶,他可以使药物的羟基及芳香基羟化,使硝基及偶氮化合物还原成氨基,因他的一氧化碳结合物的吸收光谱高峰在450 nm处,故叫P450。P450是肝药酶中最重要的酶系,参与各种外源物(如药物、化学毒物、致癌物等)和内源物(如类固醇激素、维生素D、胆酸等)在体内代谢过程。P450中现已知有70多种药物代谢酶分别催化不同物质的生物转化。其中细胞色素P450 II E1(CYP II E1)是二甲基亚硝胺D-脱甲基酶,主要在肝脏表达,一些疏水性的外来物质经CYP II E1转化后形成极性更大的物质排出体外,而有时可能被转化为细胞毒、致癌、致突变作用更强的物质,例如他代谢酒精、四氯化碳、对乙酰氨基酚等,生成毒性更大的物质;代谢乙醇生成活性氧基,产生肝毒性,因此生物学效应具有双面性^[1]。越来越多的研究表明CYP II E1与各种肝病的关系密切。

1 CYP II E1

1.1 CYP II E1的分布和基因结构 1987年Wrighton et al同时从人的肝微粒体分离纯化出CYP II E1并分别命名为P450HLJ和P450ALC。其与先前在兔和大鼠肝微粒体中发现的CYP II E1的氨基酸序列约有80%是相同的,彼此间的活性非常相似,并且迄今发现的作用底物在人和动物中也是相同的^[2],这为利用动物替代人类进行实验研究提供了可行性具有重要的科研意义。人的CYP II E1主要分布于成人肝脏并富集于肝小叶中心区域,近年陆续发现在鼻腔、食管、胃、小肠、结肠、肺、肾和皮肤等许多肝外组织器官有不同程度的表达。CYP II E1的分子量为56.9 kDa,基因定位于第10号染色体上,其大小为11.4 kb,由9个外显子和8个内显子,一个典型的TATA盒子组成,编码493个氨基酸残基(aa)的蛋白,他的全部序列及其上游的2 788 bp和下游的559 bp的顺序^[3]。

1.2 CYP II E1的基因多态性 CYP II E1的个体差异大,体外用免疫学方法检测发现可达50倍,同一个体受到诱导激活前后差别也较大,例如酒精代谢中除了酒精脱氢酶为主要系统,他如同血型一样终生不会改变,CYP II E1系统占酒精代谢能力的15%左右,而且可以被激活,一般所谓酒量愈练愈大,就是和这个代谢路径有关。此外该酶也存在显著种族差异,如日本人美国黑人^[4]均明显低于美国白人。这些差异可能与遗传因素有关,因为CYP II E1存在6种限制性内切酶片段长度多态性(RFLP),即Taq I、Dra I、Rsa I和Msp I RFLP,以及5' - 端的Pst I和Rsa I RFLP^[5],其中Dra I的5' - 端的Pst I和Rsa I在转录水平影响CYP II E1的

表达, C2 等位基因使其增加.

CYP II E1 的基因多态性使基因转录水平有明显差别, 从而导致CYP II E1在体内的活性不同, 而对药物、毒物和致癌物的代谢不同, 以至对相关疾病的易感性不同. 李靖涛 et al 研究了细胞色素 P450 II E1 基因多态性在非酒精性脂肪肝中的意义, 结果证实, 非酒精性脂肪肝与 CYP II E1 基因 Rsa I 及 Pst I RFLPs 关系密切, 其中 C2 基因在其发病机制中起一定作用.

酒精性脂肪肝的发病机制尚不明确. 但免疫介导和自由基损害是重要的机制, 而遗传因素和环境因素的作用也不容忽视. 目前, 越来越多的研究着眼于酒精引起肝损伤的易感人群的遗传特点. 现认为与乙醇代谢有关的酶编码基因乙醇脱氢酶(ADH)、乙醛脱氢酶(ALDH) 和细胞色素 P4502E1 编码基因的多态性在酒精性肝病的遗传倾向中具有重要意义. 当存在高活性 ADH 同功酶、高活性 CYP II E1 或低活性 ALDH 时, 可致乙醛产生率增加而氧化率减低.

胃癌的发生与环境致癌物有关, 然而, 即使是在胃癌高发区, 也只有小部分人发生胃癌. 提示在相似的暴露条件下, 个体易患因素在发病过程中起重要作用. 代谢酶遗传多态性与个体肿瘤易患性的关系是一个日益受到关注的研究领域^[6]. 蔡琳 et al^[7]首次对代谢酶基因多态与环境暴露在胃癌发生中的作用进行探讨, 结果发现 CYP II E1 和 GSTM1 基因多态与胃癌易患性有关, 个体代谢致癌物的能力直接影响癌症的易患性, 调节致癌物代谢的遗传因素是胃癌发生的重要因素, 由于大多数环境致癌物是间接致癌物, 需经体内代谢活化才能转化成他们的最终形式, CYP II 2E1 是活化亚硝胺等小分子质量致癌物的 I 相代谢酶^[8]. 谷胱甘肽 S- 转移酶(GST)M1 属 II 相代谢酶, 他对致癌物多环芳烃环氧化物有很强的解毒能力, 其解毒作用在防治肿瘤发生的过程中有重要功用, 代谢酶基因等位缺失和酶活性低下, 可导致宿主对一些毒物和致癌物的敏感性增高^[9]. 因此, I 相代谢酶和 II 相代谢酶之间的平衡决定了致癌物在体内的剂量, 影响了胃癌发生的危险性.

2 CYP II E1 与肝脏疾病的关系

2.1 酒精性肝病 酒精性脂肪肝的发病机制尚不明确. 可能与下列因素有关: (1) 酒精代谢产物乙醛对肝细胞的损伤; (2) 细胞内过氧化物堆积; (3) 酒精干扰了微粒体解毒功能; (4) 肝网状组织细胞系统障碍, 伴枯否(Kupffer)细胞净化功能下降. 众所周知乙醇摄入后能诱导 CYP II E1 的表达和活性^[10-11]. 这是因为当血与肝组织乙醇浓度较低时, 大部分乙醇由 ADH 氧化代谢. 然而在慢性酗酒者中并不能诱导 ADH, 而细胞色素 P4502E1 却能高度诱导. 戴宁 et al 通过动物实验发现酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 II E I 的表达在腺泡 II 区显著增强, 并向 III 区弥散, 与肝脂肪变的分布相一致, 并可能与脂质过氧化有关.

P4502E1 能产生大量的 OH⁻、O₂⁻、H₂O₂ 等自由基, 这些氧自由基可使 DNA、蛋白质和脂质氧化. 在酒精所致的肝损害中 P4502E1 诱导和激活的巨噬细胞是氧自由基的重要来源^[12-14]. 体内乙醇的摄入与源于氧化应激的自由基的生成相关联, 已发现反应性的氧核素参与了大鼠乙醇诱导的肝脏损伤的发病机制^[15]. 在肝细胞中乙醇主要诱导生成 CYP II E1, 而其可能是反应性的氧核素的一种来源, 可以导致肝损伤^[16]. French et al 已报道利用肠源型模型的酒精循环周期中, 乙醇的血清水平与诱导生成的 CYP II E1 呈现相关关系; 更重要的是 CYP II E1 的浓度与病理分级有关, 故有人认为 CYP II E1 参与了乙醇诱导的肝脏疾病. 而且 CYP II E1 的抑制剂能部分减弱由肠源性乙醇导致的肝脏病理损伤^[17]. 此外在能被内毒素激活的枯否氏细胞中, NADPH 依赖的氧化酶也是反应性的氧核素的一种来源. 因此关于氧化应激是来源于肝细胞中的 CYP II E1 还是枯否氏细胞中的 NADPH 氧化酶存在争议.

有资料认为 CYP II E1 与枯否氏细胞协同作用. CYP II E1 过度表达导致的氧应激可能使 Kupffer 细胞产生反应性氧中间物(ROI)或促细胞分裂, 使肝细胞对氧化诱导的损伤敏感, 从而促进肝细胞的损伤. 为了评价 CYP II E1 表达对肝细胞损伤反应的效果, 通过转染鼠肝细胞株 RALA255-10G, 建立了 2 株新的细胞株, S-CYP15(CYP II E1 表达水平增加) 和 AN-CYP10(CYP II E1 表达水平下降). S-CYP15 细胞株通过 Northern blot 分析、免疫杂交、催化活性等证实其 CYP II E1 水平增加, 经对乙酰氨基酚处理后, 其细胞死亡的敏感性增加. 与 AN-CYP10 相比, S-CYP15 经过氧化氢和超氧化产生生物甲茶酮处理后细胞死亡明显减少. S-CYP15 对这些 ROI 的反应是耐受凋亡, 而 AN-CYP10 因细胞坏死而死亡. 对 ROI 诱导的细胞死亡的不同的敏感性是因为 AN-CYP10 细胞株的谷胱甘肽(GSH)水平明显下降, 化学性诱导的 GSH 耗竭触发了 S-CYP10, 而非 AN-CYP10 细胞株的细胞死亡. 由于 GSH 的部分作用, CYP II E1 表达增加可使肝细胞耐受 ROI 诱导的细胞变性. 因此, CYP II E1 过度表达和 GSH 耗竭使肝细胞容易死亡.

此外, 乙醇加多不饱和脂肪酸喂养的大鼠, 相比对照只用乙醇喂养的大鼠在诱导 CYP II E1 及其随后发生的肝脏氧化损伤时具有协同作用^[18].

CYP II E1、乙醇代谢物和增高的脂质过氧化物三者之间的相互作用与酒精性肝病的发病机制密切相关. Niemela et al^[19]研究比较了人类各种细胞色素酶的表达与乙醛加合物的产生之间的关系. 结果发现乙醇诱导的 CYP II E1 存在于所有的酒精性肝脏中, 而在患有各种不同程度的肝病的嗜酒患者中 CYP2A6 在小叶分区的三区肝细胞中也是大量丰富的, CYP3A415 在酒精性肝硬化中占有绝对优势. CYP II E1 和 CYP2A6 的免疫反应性的位点共同定位于脂肪沉积处和乙醛脂质过氧化物来源的蛋白加合物的存在位点处. 在源于肥胖症和糖尿病

而导致的脂肪肝患者的中央小叶的肝细胞中CYP酶类的含量也是非常丰富的，故作者认为酒精诱导的肝损伤与CYP2A6、CYP II E1和CYP3A4的总体被诱导和乙醛脂质过氧化物来源的蛋白-乙醛加合物二者有关系。然而在非酒精性脂肪变性的患者中也可见CYP被诱导生成。

然而，CYP II E1在实验性酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)中的体内作用是有争议的。尽管CYP II E1的诱导生成和实验性ALD存在密切的相关关系^[18]，并且CYP II E1的抑制剂能改善酒精性肝损伤^[20]，但与野生型鼠一样，CYP II E1基因敲除鼠(knockout mice)仍表现出易感的乙醇诱导的肝损伤和对其他的CYP家族成员(CYP1A、CYP2A、CYP2B、CYP3A)同样的诱导作用。而且尽管已诱导出CYP II E1^[21]，但氯化钆仍能阻断酒精性肝损伤，表明CYP II E1的诱导产生与酒精性肝损伤之间相关关系的脱节。但后两项实验只能检验实验性ALD的早期阶段，至于在实验性ALD的进展过程中是否CYP II E1发挥作用仍需去研究。还需指出CYP II E1的活性在小鼠体内比大鼠和人类天生固有要低的多，因此在评价CYP II E1在ALD中的作用时，由小鼠为实验对象得到的结论需要谨慎地加以考虑。另外CYP II E1的过表达对于小鼠酒精性肝损伤的作用还需进一步研究评价。

有资料报道在肠源性的单纯乙醇喂养和乙醇加氯化钆喂养的模型中，CYP II E1都可被相同地诱导；但氯化钆能阻止肝脏的病理损伤^[21]。这些数据表明来源于枯否氏细胞而非肝细胞中的CYP II E1的氧化应激在乙醇诱导的肝脏损伤的始动过程中占有优势。但Kono et al^[22]认为目前得到的许多数据涉及到的抑制剂或营养素处理可能是非特异性的，并推荐基因敲除技术有助于避免这些潜在的问题。并利用CYP II E1敲除鼠为实验对象采用肠源性乙醇喂养模型探讨了CYP II E1是否参与了酒精诱导的肝脏损伤，结果发现来源于CYP II E1的氧化剂在鼠早期酒精诱导的肝脏损伤的机制中没有或只发挥很小的作用。同时还发现CYP家族的其他成员，例如CYP3A、CYP2A12、CYP1A和CYP2B在CYP II E1 +/+ 和 -/- 的小鼠中被诱导表达的程度是相似的，这表明P450的其他亚型可能在早期乙醇诱导的肝脏损伤的始动过程中是一种起作用的因素。

2.2 非酒精性脂肪肝 非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)和酒精性肝病(ALD)具有相似的病理特征。这些病理组织学的异常包括脂肪变性，肝细胞损伤，复合性炎症性小叶浸润和程度不等的纤维化^[23-26]。有资料已表明患有NASH的患者存在肝内CYP II E1的上调表达^[27]。由于CYP II E1能促进脂质过氧化反应而在ALD中发挥关键的作用，因而Leclercq et al^[28]提出CYP II E1是否也是NASH发展过程中的一个关键因子并加以验证。在缺乏蛋氨酸和胆碱(methionine- and choline-deficient, MCD)的小鼠膳食模式中发现，肝损伤与

CYP II E1的诱导产生和升高100倍的肝脏脂质过氧化物明显相关。微粒体中NADPH依赖的脂质氧化酶有助于这些脂质过氧化物的形成，并且体外抑制实验证实CYP II E1是主要的催化剂。为了进一步阐明CYP II E1作为一种氧化应激始动因子在NASH中的作用，作者利用一种CYP II E1-/-小鼠给予MCD饮食，结果发现CYP II E1缺陷型鼠表现出既不能阻止NASH的进展又不能制止微粒体中NADPH依赖的脂质过氧化物的升高，这意味着存在另一种非CYP II E1的过氧化物酶途径。在患有NASH的CYP II E1缺陷型鼠而非野生型鼠中，可见cYP4A10、CYP4A14发生上调。而且体外肝脏微粒体脂质过氧化物可被抗鼠CYP4A10的抗体充分抑制。Isabelle et al的实验结果表明实验性NASH与肝脏微粒体脂质过氧化物高度相关。CYP II E1在野生型鼠中是参与此过程的主要的酶类，但不是催化内源性脂质过氧化反应的P450蛋白家族的惟一的一个，并且鉴定出CYP4A酶类在肝脏氧化应激反应中可作为另外一种替代的始动因子。

有趣的是，糖尿病和饥饿这些因子被报道在临幊上与更严重的NASH的进展密切相关^[29-30]，并且也能上调CYP II E1的表达。在由MCD膳食诱导而发生NASH的大鼠中，CYP II E1表达的范围和在小叶中的分布与脂肪变性和炎症的分布范围密切相关^[31]。

2.3 自身免疫性肝病，药物性肝炎和中毒性肝病 细胞色素P450(CYPs)和鸟苷二磷酸(UDP)-葡萄糖苷酸转移酶(glucuronosyltransferases)(UGTs)在许多肝内和肝外疾病中都是自身免疫抗体的靶目标。直接对抗肝内CYPs和UGTs的自身抗体最先是通过间接免疫荧光法被鉴定的，并命名为抗肝肾微粒体抗体。肝肾微粒体I型抗体被检测到为直接抗CYP2D6。丙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒可诱导很多自身免疫现象，并且也检测到许多自身抗体，例如在将近4%的慢性丙型肝炎患者中可检测到抗-CYP2D6的自身抗体，大约2%的患者可检测到抗-CYP2A6的自身抗体。

在小部分患者中，已知某些药物能诱导免疫介导的特发性药物反应，也即药物性肝炎。药物诱导的肝炎经常与抗肝的CYPs或其他的肝脏蛋白的自身抗体有关，例如氟烷导致的药物性肝炎可检测到抗CYP II E1的自身抗体，抗惊厥药物诱发的肝炎与抗CYP3A的自身抗体有关^[32]。药物型肝炎的发病机制还可能是某些药物在肝内通过CYP II E1代谢产生一些毒性产物，如自由基、氨基等，与肝细胞内的大分子物质(如蛋白质、核酸等)共价结合或造成细胞质膜的脂质过氧化最后导致肝细胞坏死。例如许多长期酗酒者服用常规剂量的醋氨酚时出现肝毒性，可能与乙醇诱导的CYP II E1的表达增强有关。

CCl₄是一种肝毒剂，在肝中经P4502E1转化为三氯甲基自由基(CCl₃)，通过氢黏附而攻击内质网膜上的磷脂分子，引起膜的脂质过氧化，CCl₄继而与膜

脂质和蛋白质大分子进行共价结合，引起膜结构和功能完整性的破坏，从而引起细胞和P450分子损伤，引起血清ALT和AST活性升高，P450含量降低和肝细胞变性坏死。众所周知，苯巴比妥通过诱导P450E1而加重CCl₄肝毒性。视黄醇喂养小鼠能减轻四氯化碳诱导的肝脏损伤。Inder et al [33]研究了细胞色素CYP II E1在此过程中是否发挥作用。结果发现在小鼠中，视黄醇本身并不能改变组成性的或者诱导性的CYP II E1的表达，然而如果与CCl₄结合应用，视黄醇确能减少CCl₄生物活化后得到的毒性代谢物的数量。作者认为视黄醇减轻四氯化碳诱导的肝脏损伤是通过降低CCl₄的生物活化作用而不是通过减少CYP II E1的表达。

2.4 病毒性肝病 张顺财 et al 研究发现病毒感染所致肝脏疾病中CYP II E1的各基因型分布与正常人相似，这表明病毒性肝病与CYP II E1的基因型无关。细胞色素P450E1可表达于人类外周血淋巴细胞中，先前的研究已暗示了可利用这种既定的易获取的组织作为CYP II E1含量状况的报告因子的可能性。受此启发Haufroid et al [34]深入研究二者间的关联性，利用两种对照状态下即慢性丙型肝炎(CHC)和胰岛素依赖的糖尿病(IDD)患者，评定其外周血淋巴细胞中CYP II E1的表达情况，也即一种器官病变和一种全身疾病的比较。结果发现在慢性丙型肝炎患者中肝内CYP II E1的表达和肝病的进展程度(包括小叶炎症和纤维化指标)明显相关，观察到肝脏的改变与肝小叶地带CYP II E1的优先分布协调一致。然而没有观测到任何由于肝脏病变而影响外周血淋巴细胞中CYP II E1的表达的结果。但在胰岛素依赖的糖尿病患者中对比对照可观测到外周血淋巴细胞中平均CYP II E1的表达水平呈现有统计学意义的升高。作者认为肝脏疾病时外周血淋巴细胞中CYP II E1表达水平的检测没有帮助，而在全身性疾病例如糖尿病的状况下，推荐这种相对非侵袭性的检测方法来监测CYP II E1的诱导水平。

患有肝脏疾病时，磷脂酰乙醇胺转甲基酶的活性是受到抑制的，但缺乏的卵磷脂可通过给予多烯卵磷脂(polyenylphosphatidylcholine, PPC)得到补充。实验证实[35]PPC可阻止CYP II E1的诱导生成和纤维化。酒精中毒和丙型肝炎通常是共存的，这可导致加速的肝纤维化，肝硬化和肝细胞癌。PPC作为一种适宜的抗纤维化的药物正被应用于临床以验证其疗效。

2.5 肝细胞癌 一些研究发现某些物质经P450E1转化为致癌的代谢物而导致组织癌变，对P450E1的诱导或抑制可以影响致癌作用，如苯巴比妥通过诱导P450E1而促进黄曲霉素的致癌作用。亚硝胺类化合物，这类物质需经体内细胞色素p450 2E1(CYP II E1)等酶代谢活化后方具致癌潜能。Tsutsumi et al [36]在一组大鼠饮用水中加入一定量的乙醇使其CYP II E1水平高于对照组，再加入最低致癌剂量的N-亚硝基二甲苯(NDMA)，60 wk后乙醇处理组肝组织病理检查发现癌

前病变，对照组则未出现，表明乙醇诱导的CYP II E1加速NDMA的致癌作用。近来有关CYP II E1的基因多态性与个体癌症的易感性的研究越来越受到关注，已有相关报道认为胃癌，鼻咽癌的易感性与CYP II E1的多态性有关^[7]。但有关肝癌与CYP II E1的多态性的研究未见相关报道。

肝脏是体内物质最主要的进行解毒，转化代谢的器官，CYP II E1主要在肝脏表达，参与许多内原性及外原性化合物的代谢，鉴定出更多的CYP II E1作用底物，阐明其个体种族差异的机制，进一步寻找基因多态性位点以及影响其表达及活性的因素，对于解释某些肝脏疾病的发生，发展以及对于疾病的治疗预防都有重要的意义。

3 参考文献

- 1 Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. P450 and human cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:1325-1335
- 2 Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J* 1992;6:724-730
- 3 Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Human ethanol-inducible P450IIIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 1988;27:9006-9013
- 4 Kim RB, Yamazaki H, Chiba K, O'Shea D, Mimura M, Guengerich FP, Ishizaki T, Shimada T, Wilkinson GR. In vivo and in vitro characterization of CYPIIIE1 activity in Japanese and Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:4-11
- 5 Uematsu F, Ikawa S, Kikuchi H, Sagami I, Kanamaru R, Abe T, Satoh K, Motomiya M, Watanabe M. Restriction fragment length polymorphism of the human CYPIIIE1 (cytochrome P450IIIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics* 1994;4: 58-63
- 6 Hong JY, Yang CS. Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity. *Environ Health Perspect* 1997;105(Suppl 4):759-762
- 7 蔡琳, 俞顺章. 福建长乐胃癌分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 1999;7:652-655
- 8 Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5-flanking region change transcriptional regulation if the human cytochrome P4502E1 gene. *J Biochem* 1991;110: 559-565
- 9 Nakajima T, Elovaara E, Anttila S, Hirvonen A, Camus AM, Hayes JD, Ketterer B, Vainio H. Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer. *Carcinogenesis* 1995;16: 707-711
- 10 Ardies CM, Lasker JM, Lieber CS. Characterization of the cytochrome P-450 monooxygenase system of hamster liver microsomes. Effects of prior treatment with ethanol and other xenobiotics. *Biochem Pharmacol* 1987;36:3613-3619
- 11 Koop DR, Crump BL, Nordblom GD, Coon MJ. Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole, and isoniazid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4065-4069
- 12 Maher JJ. Alcoholic steatosis and steatohepatitis. *Semin Gastrointest Dis* 2002;13:31-39
- 13 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

- 14 Caprioli F, Pometta R, Visentin S, Massironi S, Conte D. "Hepatitis flare", asthenia, peripheral polyneuropathy and diffuse liver steatosis in a hepatitis C virus asymptomatic chronic carrier. *Dig Liver Dis* 2001;33:359-362
- 15 Knecht KT, Adachi Y, Bradford BU, Iimuro Y, Kadiiska M, Xuang QH, Thurman RG. Free radical adducts in the bile of rats treated chronically with intragastric alcohol: inhibition by destruction of Kupffer cells. *Mol Pharmacol* 1995;47:1028-1034
- 16 Ronis MJ, Huang J, Crouch J, Mercado C, Irby D, Valentine CR, Lumpkin CK, Ingelman-Sundberg M, Badger TM. Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:944-950
- 17 Albano E, Clot P, Morimoto M, Tomasi A, Ingelman-Sundberg M, French SW. Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology* 1996;23:155-163
- 18 Nanji AA, Zhao S, Lamb RG, Dannenberg AJ, Sadrzadeh SM, Waxman DJ. Changes in cytochromes P-450, 2E1, 2B1, and 4A, and phospholipases A and C in the intragastric feeding rat model for alcoholic liver disease: relationship to dietary fats and pathologic liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:902-908
- 19 Niemela O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pasanen M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000; 33:893-901
- 20 Morimoto M, Hagbjork AL, Wan YJ, Fu PC, Clot P, Albano E, Ingelman-Sundberg M, French SW. Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. *Hepatology* 1995;21:1610-1617
- 21 Koop DR, Klopfenstein B, Iimuro Y, Thurman RG. Gadolinium chloride blocks alcohol-dependent liver toxicity in rats treated chronically with intragastric alcohol despite the induction of CYPIIE1. *Mol Pharmacol* 1997;51:944-950
- 22 Kono H, Bradford BU, Yin M, Sulik KK, Koop DR, Peters JM, Gonzalez FJ, McDonald T, Dikalova A, Kadiiska MB, Mason RP, Thurman RG. CYPIIE1 is not involved in early alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol* 1999;277:G1259-G1267
- 23 Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-438
- 24 Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohol-like liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95:1056-1062
- 25 Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80
- 26 Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998;15: 246-258
- 27 Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998;27:128-133
- 28 Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYPIIE1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000;105:1067-1075
- 29 Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995;22:1714-1719
- 30 Day CP, Yeaman SJ. The biochemistry of alcohol-induced fatty liver. *Biochim Biophys Acta* 1994;1215:33-48
- 31 Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYPIIE1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996;111:1645-1653
- 32 Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Target proteins in human autoimmunity: cytochromes P450 and UDP-glucuronosyltransferases. *Can J Gastroenterol* 2000;14:429-439
- 33 Inder RE, Bray BJ, Sipes IG, Rosengren RJ. Role of cytochrome P4502E1 in retinol's attenuation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the Swiss Webster mouse. *Toxicol Sci* 1999;52:130-139
- 34 Haufroid V, Ligocka D, Buyschaert M, Horsmans Y, Lison D. Cytochrome P4502E1 (CYPIIE1) expression in peripheral blood lymphocytes: evaluation in hepatitis C and diabetes. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59:29-33
- 35 Lieber C. Liver diseases by alcohol and hepatitis C: early detection and new insights in pathogenesis lead to improved treatment. *Am J Addict* 2001;(10 Suppl):29-50
- 36 Tsutsumi M, Matsuda Y, Takada A. Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 in the development of hepatocellular carcinoma by the chemical carcinogen, N-nitrosodimethylamine. *Hepatology* 1993;18:1483-1489

生物芯片技术

张立勇, 张学工, 李衍达

张立勇, 张学工, 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
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: 2003-10-27 接受日期: 2003-12-19

摘要

生物芯片技术是近年发展起来的极具时代特征的新型检测分析技术。他的出现实现了对生物样品高效、快速和高通量的微量检测,使全面、综合分析某些生命现象成为可能,从而为生命科学、医学、化学、新药开发、食品与环境监督等众多领域提供了强有力的技术支持。

张立勇, 张学工, 李衍达. 生物芯片技术. 世界华人消化杂志 2004;12(4): 955-958
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/955.asp>

0 引言

人类基因组计划(human genome project, HGP)的成功和蛋白质组计划(human proteome project, HPP)的启动,获得了数量巨大的基因和蛋白质信息。对庞大的基因组和蛋白质组信息进行处理和研究,必需设计和利用更为高效的软件和硬件技术,建立新型、高效、快速的检测分析技术。同时,随着生命科学与众多相关学科如物理学、微电子学、计算机科学、材料科学、微加工技术、有机合成技术等的迅猛发展和综合交叉,为生物芯片(biochip)的实现提供了实践上的可能性。

所谓生物芯片技术就是通过微加工工艺将大量生物识别分子如核酸片段、多肽分子,甚至组织切片、细胞等按照预先设置的排列方式固定在厘米见方的芯片片基(基质或载体)上,利用生物分子之间的特异性亲和反应,实现对基因、配体、抗原等生物活性物质的检测分析。由于生物芯片采用了微电子学的并行处理和高密度集成的概念,因此可同时并行分析成千上万种生物分子,具有高通量、高灵敏度和并行检测的特点。

1 生物芯片技术的分类

传统杂交分析技术以硝酸纤维素膜或尼龙膜为载体,杂交反应后经放射自显影进行检测。由于硝酸纤维素膜或尼龙膜等材料有渗透作用,易使被分析的材料扩散,因此生物芯片分析利用固相表面作为载体。固相表面无渗透作用,少量的生化物质可准确地沉淀到特定位置上;同时固相片基能够提供一个均匀的接触面,可以提

高定量分析的质量。

制作生物芯片的载体材料很多,大致可分为四类:无机材料、天然有机聚合物、人工合成的有机高分子聚合物和各种高分子聚合物制成的膜。目前,适用于制作生物芯片的载体材料只有少数几种,如玻璃片、金属片、各种有机高分子制作的薄膜等。生物芯片按载体可分为:硅晶片芯片、玻璃芯片、塑料芯片和磁珠芯片等。根据芯片上固定的探针不同,他又可分为:基因芯片、蛋白质芯片、组织芯片和细胞芯片等。另外,根据原理不同,生物芯片可分为:元件型微阵列芯片、通道型微阵列芯片和生物传感芯片等新型生物芯片。

2 基因芯片

基因芯片(gene chip),也叫DNA芯片、DNA微阵列(DNA microarray)、寡核苷酸阵列(oligonucleotide array),其实质是在玻片、硅片、薄膜等载体上有有序地、高密度地固定大量的靶基因片段或寡核苷酸片段,这些被固定的分子探针在基质上就形成了高密度DNA微阵列。样品核酸分子经过标记后,与固定在载体上的DNA阵列中的点进行杂交。通过检测杂交信号而获得样品分子的数量和序列信息,从而对基因序列及功能进行大规模、高密度地研究。由于基因芯片采用了信息的集约化和平行处理原理,具有无可比拟的高效、快速和多参数的特点,是传统生物技术的一次重大创新和突破。

基因芯片技术的高通量、高精度、高效率在差异表达基因的筛选中得到了广泛的应用,他所揭示的基因表达谱可以提供相当丰富的信息,能发现传统临床医学所不能诊断的疾病类型和在疾病发生、发展中特殊表达的基因,有助于寻找新的诊断方法和治疗手段。应用cDNA微阵列技术发现了一些在食管癌中差异表达的基因^[1-3],研究这些基因在食管癌发生、发展中的作用,对于阐明肿瘤发生、发展的机制、寻找肿瘤标志物、设计新的抗肿瘤药物和有针对性地进行个体治疗都有至关重要的意义。刘业海 et al^[4]应用cDNA微阵列技术比较分析了喉癌配对组织的基因表达谱,结果表明:在正常组织和喉癌组织中,基因表达相差3倍以上者为35个,其中在喉癌组织中表达上调的基因为8个,下调基因为27个;相差5倍以上的基因有7个,这7个基因均在喉癌组织中表达下调。Affymetrix公司把p53基因全长序列和已知突变的探针集成在芯片上,制成p53基因芯片,将在癌症早期诊断中发挥作用。

Heller et al^[5]构建了96个基因的cDNA微阵列，研究了类风湿关节炎、肠炎基因的特征性表达活性，确定了许多基因与这两种病变的关系，为探讨基因芯片在诊断感染性疾病方面提供了新的思路。华盛顿大学利用含5 766个基因的芯片研究了卵巢癌基因表达谱的变化，找出在卵巢癌组织中过度表达的30个由GenBank收录的基因^[6]。

基因芯片在感染性疾病、遗传性疾病、重症传染病和恶性肿瘤等疾病的临床诊断方面具有独特的优势：一张芯片能同时对多种疾病进行检测，无需机体免疫应答反应期，能及早诊断；待测样品用量小；能特异性检测病原微生物的亚型及变异；可在短时间内掌握大量的疾病诊断信息。目前，基因芯片已广泛用于发现疾病相关基因、建立疾病诊断指标和基础生物学及医学研究领域。但基因芯片技术仍有其局限性，如设备价格昂贵，加上操作人员的训练及仪器的维护经费，是一个沉重的负担；如果没有一个合理正确的分析逻辑，从实验后数据分析中的得到的结果很有可能造成严重的错误，误导实验人员。因此，微阵列系统的整合是一件非常重要的相当复杂的工作。通过适当的分工，将生物学家、软件工程人员和机械工程人员的专长整合，才能够完成高标准的微阵列系统。

3 蛋白质芯片

蛋白质是一切生命活动的基础，受基因表达的调控，因而以检测样品中mRNA丰度为基础的cDNA芯片是当今研究中倍受关注的技术手段。但是，细胞内mRNA的信息远不能反映基因产物的最终功能形式—蛋白质的表达状况，mRNA的丰度与其最终表达产物—蛋白质的丰度之间并没有直接的关联；更何况许多蛋白质还有翻译后修饰加工、结构变化、蛋白质与蛋白质间、蛋白质与其他生物大分子的相互作用等，因此以微阵列技术对生物样品行整体蛋白质表达分析的蛋白质芯片(protein chip)在后基因组时代越来越受重视。

蛋白芯片，也称肽芯片(peptide chip)，是根据蛋白质—蛋白质相互作用而设计的高通量蛋白检测技术平台。其主要特点是将已知蛋白阵列固定在载体上，用来检测相配对的未知蛋白。固定在载体上的蛋白质可以是抗体、抗原、受体、配体、酶、底物以及蛋白结合因子等。这种新技术可以在一次实验中比较生物样品中成百上千的蛋白质的相对丰度。在实际应用中，抗体芯片研究得最多。此外，还有表面增强激光解吸离子化(surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI)蛋白质质谱芯片、组织芯片(tissue chip)和细胞芯片(cell microarray)等。

3.1 抗体芯片 抗体芯片(antibody microarray)，是将能识别特异抗原的抗体制成微阵列，检测生物样品中抗原蛋白表达模式的方法。Clontech公司推出的第一代抗体芯片Ab Microarray 380包含了固定在芯片片基上的

378种已知蛋白质的单克隆抗体，可以在一次简单实验中同时检测样品中的378种蛋白质的表达情况，并且可以在一张芯片上对两种样品的表达模式进行比较分析。这使得抗体芯片在毒性实验、疾病研究和药物开发上有广泛的应用前景。Ab Microarray 380芯片上每个抗体都是并列双点以增加结果的可靠性，抗体针对广泛的胞内蛋白和膜结合蛋白，已知参与信号传导、癌症、细胞周期调控、细胞结构、凋亡和神经生物学等广泛的生物功能，因而可以用于检测某一特定的生理或病理过程相关蛋白的表达模式；同时，还可以作为DNA芯片的补充，用于研究蛋白和基因表达之间的关系。

3.2 表面增强激光解吸离子化蛋白质质谱芯片 SELDI 蛋白质质谱芯片技术是Taylor医学院的Hutchens和Yip发展起来的^[7-9]。这种技术是利用经过特殊处理的固相支持物或芯片的层析表面，根据蛋白质物理、化学性质的不同，选择性地从待测生物样品中捕获配体，将其结合在芯片的固相层析表面上，经原位清洗和浓缩后，结合TOF-MS技术，对结合的多肽或蛋白质进行质谱分析^[7-10]。

美国Ciphergen Biosystems公司购买了SELDI技术的生产专利，在此基础上推出一种称为Ciphergen's proteinchip® biomarker system的技术平台，将蛋白质组学研究技术整合在类似“芯片”的装置上进行。他的核心技术就是SELDI质谱和飞行时间检测技术的相互整合^[7]。通过把蛋白质结合在芯片上直接进行TOF-MS分析，去除了分析前复杂的样品制备过程。不经严格纯化，直接用患者的血液、尿液、脑脊液、胸腔积液等体液以及细胞裂解液进行分析。同时，还可以定量和定性分析结合的靶蛋白^[7, 11-13]。他的操作具有相对简单、高效、快速和准确等特点，一经出台就受到临床研究工作者的高度青睐，同时预示着有可能最先进入临床蛋白质组检测的应用前景^[7]。

Petricoin et al^[14]利用Ciphergen公司的专利技术SELDI蛋白质芯片—飞行时间质谱仪对已知诊断的卵巢癌样品进行研究，以确定一个合适的分辨标准—蛋白质表达谱型。他们发现在质/荷比为534、989、2 111、2 251和2 465 Da处的5个峰的同时变化对卵巢癌的诊断具有意义。其中M_r 2 251 Da的蛋白质峰在肿瘤患者血清中的表达水平低于正常人。他们利用这种特殊的血清蛋白质谱型对来自无癌、早期、晚期卵巢癌和良性疾病的妇女血清样品进行了盲法分析。结果表明，50例卵巢癌的样品被全部准确检出为肿瘤，其中包括18例Ⅰ期患者；对照组66例非恶性肿瘤人群中有63例被确定为非恶性肿瘤。这种方法的灵敏度为100%，特异性为95%，阳性预测值为94%。Jr et al^[15]利用SELDI技术鉴定了已知的4种前列腺相关的生物标志物：前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸酶(prostate acid phosphatase, PAP)、前列腺特异性肽(prostate specific peptide, PSP)和前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)，并从LCM获得的前列腺癌

细胞裂解物和正常前列腺细胞裂解物中发现了一些在前列腺中表达上调的蛋白质, 其分子量分别为33 kD、18 kD 和 3.5 kD, 这些蛋白质很可能发展成为新的肿瘤标志物。Qu et al^[16]利用生物信息学算法从前列腺癌患者血清得到的SELDI图谱中得出了两种分类法(classifier)。其中 AdaBoost classifier 可以将前列腺癌患者和健康人分开, 其特异性和敏感性均为 100%。Adam et al^[17]利用生物信息学方法从 SELDI 血清图谱中找到了 9 个差异蛋白组成的特征性图谱, 可以将前列腺癌患者、前列腺良性增生和健康人分开。其敏感性为 83%, 特异性为 97%, 实验组人群和总体人群的阳性预测值分别为 96% 和 91%。赵晓航 et al^[18]利用 SELDI 质谱芯片技术从食管鳞状细胞癌患者血清中发现了十种候选的肿瘤标志物。近年来, 高校蛋白质组学研究院与多家临床医院密切合作, 从 30 例患者和相应数量的健康人血清样品中成功筛选出 15 个候选的肺癌标志分子, 其中 5 个具有很高的灵敏性和特异性。这 5 个候选的肺癌标志分子中有 2 个在非小细胞肺癌患者的血清中表达上调, 3 个表达下调^[19]。这些候选标志分子的发现为分子诊断技术的发展提供了关键性的基础, 一旦实现临床应用, 将大大改变我国目前对肺癌临床检测的手段, 改变待病灶形成后才能检测出来的状况。

目前, 利用 CIPHERGEN Biosystems 公司的 SELDI-TOF-MS 技术平台已发现了前列腺癌、老年痴呆症、急性肾衰竭、乳腺癌、肾结石、膀胱癌和尿道感染等疾病的生物标志物的候选物, 有望成为早期诊断的标志物, 用于大规模的临床筛查^[7, 11, 15]。

3.3 组织芯片 组织芯片, 也称组织微阵列(tissue microarrays, TMAs), 是美国 NIH 的 Kononen et al^[20]于 1998 年发明的。他是一种将成百上千个组织标本排列在同一张玻璃片上的技术, 可以通过一张组织切片研究数百对组织标本的 RNA、DNA 或某种蛋白质的表达情况。以往在人们对肿瘤发生、发展机制的大量研究中曾先后发现了许多与肿瘤发展进程或预后相关的“标志物”, 但是要想验证他们通常十分困难。而组织微阵列技术可以在一张玻璃切片上同时分析大量的组织标本, 正好解决了这个难题, 使某些研究结果最终有可能用于指导临床诊断和治疗。TMAs 在肿瘤研究领域中的应用已有大量报道^[21-26]。

TMAs 是一种大规模群体水平的研究工具。虽然由于取材微小可能使某一个点与供体组织不完全一致, 但大规模的统计分析将明显消除单个数据的差异对最终结果的影响。有学者用 TMAs 和正规的组织切片进行了对比研究, 结果显示两种方法的一致性大于 95%^[27]。由于所有的组织都可以被放置在 TMAs 中, 因而他不仅仅在肿瘤研究领域, 在其他方面如炎症性疾病, 心血管和神经系统疾病, 一些动物模型的组织标本, 以及细胞系的研究中都将体现出他的实用价值。目前, 这种技术还有许多问题有待于解决, 但已显示出重要的科研

和应用价值, 也存在很大的经济价值。近 2 a TMAs 得到了迅速发展, 相信在不久的将来他将在分子病理学研究领域发挥更大的作用。

3.4 细胞芯片 细胞芯片, 也称仿生芯片, 是将单个细胞与一个电子集成电路芯片经特殊方法结合起来的微型装置。其原理是当细胞面临一定的电压时, 细胞膜微孔就会张开, 具有渗透性。通过计算机控制微型装置中的芯片就可以控制细胞的活动。这样在根本不影响周围细胞的情况下, 可以对目标基因或细胞进行基因导入、蛋白质提取等研究。生物医学专家认为, 最终开发出的细胞芯片能够精确调节电压, 这样就可以激活不同的人体组织细胞, 包括从肌肉、骨骼到人脑细胞; 如果把他们植入人体, 就可以取代或修补人体病变细胞组织。此外, 细胞芯片还可用于研究细胞分泌和胞间通讯及细胞分类、纯化等。

最近出现了一种细胞微阵列芯片^[28], 他是将不同的质粒 DNA 点在玻璃片上做成质粒 DNA 芯片, 接着在脂质转染试剂处理好的芯片上培养细胞, 被转染的细胞因此获得了外源 DNA 赋予的新性状, 因此也称为反向转染(reverse transfection)。这种技术不但可以用于 cDNA、融合肽或 RNA 分子的分析, 而且还可以用于研究一些细胞因子、化学抑制剂或放射性标记对基因表达的影响。

4 芯片实验室

芯片实验室(Lab-on-a-Chip)是生物芯片研究领域的一个热点^[11]。他是利用微机电加工技术与生物技术, 将采样、稀释、加试剂、反应、分离、检测等化学分析的全过程集成于一体, 缩小构成芯片上的实验室系统^[29-31]。他是一个多学科交叉的新领域, 他的最终目标是对分析的全过程实现全集成, 从而极大地缩短检测分析时间, 节省实验材料。

目前美国的 Nanogen 公司、Affymetrix 公司、宾西法尼亚大学医学院和密歇根大学的科学家通过利用在芯片上制作出的加热器、阀门、泵、微量分析器、电化学检测器或光电子学检测器等, 将样品制备、化学反应和检测 3 部分作了部分集成。Gene Logic 公司设计制造的生物芯片可以从待检样品中分离出 DNA 或 RNA, 并对其进行荧光标记。当样品流过固定于栅栏状微通道内的探针时, 即可捕获与之互补的靶核酸序列。然后应用自己开发的检测设备实现对杂交结果的检测分析。这种芯片上的寡核苷酸探针具有较大的黏附面积, 可以灵敏地检测到稀有基因的变化。同时, 由于该芯片设计的微通道具有浓缩和富集作用, 所以可以加速杂交反应, 缩短测试时间, 降低测试成本。1998-06, Nanogen 公司首次报道用芯片实验室所实现的从样品制备到反应结果显示的全部分析过程。这个实验室的成功是生物芯片研究领域的一大突破, 他向人们展示了用生物芯片制作芯片实验室的可能。

芯片实验室是缩小了的生化分析器，他将样品制备、生化反应到检测分析的整个过程集成在芯片上，解决了基因/蛋白质芯片技术中存在的一些问题，如对实验室规模、仪器设备要求较高、依赖性较强；芯片之间的重复性较差；样品制备和标记操作的一体化性能欠佳等^[32-34]。芯片实验室的发展前景广阔，但现有芯片实验室的研究水平比理论上所要达到的水平还相差很多，这是因为：(1)微量样品与检测准确度的矛盾；(2)芯片的小尺寸与检测器等的连接等。但他的出现必将会给生命科学、医学、化学、新药开发、农作物育种和改良、司法鉴定、食品与环境监督等众多领域提供强有力的技术支持，从而带来检测分析领域的一场革命。

5 参考文献

- 1 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
- 2 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
- 3 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
- 4 刘业海, 唐平章, 徐震纲, 祁永发, 丁芳, 张立勇, 王海涛, 刘芝华. EMP-1基因在喉癌中的表达差异分析. 中国医学科学院学报 2003;25:49-51
- 5 Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2150-2155
- 6 Wang K, Gan L, Jeffery E, Gayle M, Gown AM, Skelly M, Nelson PS, Ng WV, Schummer M, Hood L, Mulligan J. Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene* 1999;229:101-108
- 7 张立勇, 赵晓航, 吴旻. 表面增强激光解吸电离质谱芯片在蛋白质组学研究中的应用. 生命的化学 2002;22:478-480
- 8 Ching J, Voivodov KI, Hutchens TW. Surface chemistries enabling photoinduced uncoupling/desorption of covalently tethered biomolecules. *J Org Chem* 1996;61:3582-3583
- 9 Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:587-592
- 10 Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:1164-1177
- 11 Weinberger S R, Morris TS, Pawlak M. Recent trends in protein biochip technology. *Pharmacogenomics* 2000;1:395-416
- 12 von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research. *BioTechniques* 2000;29:1066-1070
- 13 May M, Heebner G. Laboratory technology trends: the power of proteomics. *Science* 2001;292:317-335
- 14 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-577
- 15 Jr GW, Cazares LH, Leung SM, Nasim S, Adam BL, Yip TT, Schellhammer PF, Gong L, Vlahou A. Proteinchip® surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate biomarkers in complex protein mixtures. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1999;2:264-276
- 16 Qu Y, Adam BL, Yasui Y, Ward MD, Cazares LH, Schellhammer PF, Feng Z, Semmes OJ, Wright GL Jr. Boosted decision tree analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients. *Clin Chem* 2002;48:1835-1843
- 17 Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62:3609-3614
- 18 Zhao XH, Mao YS, Zhang LY, Liu Y, Wang HX, Yip TT, Ying WT, Qian XH, Liu F, Wang XQ, Ni XG, Xu Y, Zhang DC, Wu M. Discovery of esophageal cancer protein biomarkers from sera. *AACR Program/Proceedings Supplement* 2002:79
- 19 Xiao XY, Tang Y, Wei XP, He DC. A preliminary analysis of non-small cell lung cancer biomarkers in serum. *Biomed Environ Sci* 2003;16:140-148
- 20 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-847
- 21 Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999;5:1966-1975
- 22 Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, Koivisto P, Mousses S, Chen Y, Mahlamaki E, Schraml P, Moch H, Willi N, Elkahloun AG, Pretlow TG, Gasser TC, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1758-1764
- 23 Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1999;154:981-986
- 24 Barlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, Bittner ML, Torhorst J, Haas P, Bucher C, Sauter G, Kallioniemi OP, Kallioniemi A. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1252-1259
- 25 Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA. Neuroendocrine expression in metastatic heterogeneous protein expression. *Human Pathol* 2000;31:406-414
- 26 Nocito A, Bubendorf L, Maria Tinner E, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jager P, Luc Fehr J, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G. Microarray of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 2001;194:349-357
- 27 Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000; 80: 1943-1949
- 28 郭志儒. 一种新型的生物芯片-活细胞芯片. 中国兽医学报 2002; 22:21
- 29 王琪, 方向东, 王小宁, 戚正武. 缩微芯片实验室. 生命的化学 2000;20:87-89
- 30 Jackson DJ, Naber JF, Roussel TJ Jr, Crain MM, Walsh KM, Keynton RS, Baldwin RP. Portable high-voltage power supply and electrochemical detection circuits for microchip capillary electrophoresis. *Anal Chem* 2003;75:3311-3317
- 31 Huikko K, Kostiainen R, Kotiaho T. Introduction to microanalytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci* 2003;20:149-171
- 32 Weigl BH, Bardell RL, Cabrera CR. Lab-on-a-chip for drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:349-377
- 33 Gambari R, Borgatti M, Altomare L, Manaresi N, Medoro G, Romani A, Tartagni M, Guerrieri R. Applications to cancer research of “lab-on-a-chip” devices based on dielectrophoresis (DEP). *Technol Cancer Res Treat* 2003;2:31-40
- 34 Jain KK. Lab-on-a-chip and microarrays: discovery and development. *Pharmacogenomics* 2003;4:123-125

• 文献综述 •

RNA干扰技术与消化系肿瘤的基因治疗

陆 嵘, 房静远

陆嵘, 房静远, 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

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消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com

电话: 021-62360930

收稿日期: 2003-10-30 接受日期: 2003-12-08

摘要

将靶基因序列同源的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)导入细胞可以抑制某些基因的表达, 即 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi). RNAi 是机体中普遍存在的机制, 起到负责基因的表达和调控的作用。由于 RNAi 能够高效特异地抑制基因表达, RNAi 技术在研究基因功能、遗传规律、信号转导机制等多个领域迅速展开。作为一项崭新的技术, RNAi 在肿瘤的基因治疗方面具有非常广阔前景。本文就近年来 RNAi 技术在消化系肿瘤的基因治疗中的运用作一综述。

陆嵘, 房静远. RNA 干扰技术与消化系肿瘤的基因治疗. 世界华人消化杂志 2004;12(4):959-961

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/959.asp>

0 引言

RNAi 现象最早在 1998 年由 Fire et al [1] 首次发现并命名, 是通过导入特异序列的 dsRNA 引起基因沉默方法。由于 RNAi 抑制基因表达具有特异性和高效性, 同时伴随近年来合成 dsRNA 技术上的改进, RNAi 已成为研究基因功能、肿瘤基因治疗、病毒感染基因治疗的新方法。目前已发现通过 RNAi 抑制 K-ras, Bcl-2, CDK-2, PLK-1, p53 等肿瘤相关基因, 能够使胰腺癌、肝癌等多种消化系肿瘤细胞增生速度减慢, 恶性程度降低, 凋亡加快[2-3]。目前有关 RNAi 的研究已经成为分子生物学的热点。预测 RNAi 将是未来 10 a 间最有可能产生重大成果的领域之一, 并被美国《Science》杂志评选为 2002 年度世界十大科学成就之首。

1 RNAi 的作用机制

RNAi 属于转录后基因沉默机制(post transcriptional gene silencing, PTGS), 其本质是小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA) 高效、特异地阻断体内同源基因表达, 致使 mRNA 降解和基因表达受抑。研究表明, RNAi 广泛存在于各种生物体, 植物、真菌、锥虫、果蝇和哺乳动物中都发现了 RNAi 现象[4]。自然界中, RNAi 可能是动植物体内的一种保护机制, 主要作用在于防御病毒感染, 维持基因组中转座子的稳

定, 参与胚胎发育等[5]。RNAi 的具体机制和过程尚未十分清楚, 可能的作用机制是, 外源导入或者由转基因、病毒感染等各种方式引入的 dsRNA, 在 Dicer 酶(特异识别 dsRNA 的 RNase III 家族中的一员)的作用下, 以一种 ATP 依赖的方式逐步切割 RNA, 降解成 21-23 个核苷酸的 siRNA。siRNA 双链同其他一些蛋白和酶结合成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)。随后在 siRNA 的引导下, RISC 识别与反义链互补的 mRNA, 在结合部位切割 mRNA, mRNA 与小片段的正义链置换, 切割后断裂的 mRNA 随之降解, 从而使该基因的表达受抑, 而 RISC 复合物又可以参加下一个 RNAi 作用循环[6]。目前已发现多种基因参与 RNAi 的作用过程, 例如 rde-1 和 rde-4 基因被认为参与了 RNAi 的启动步骤, 而 rde-1 家族中的一个成员是翻译起始因子, rde-2 和 mut-7 基因是 PTGS 效应阶段的重要基因[7]。

近来的研究还表明 RNAi 可能还牵涉到其他更加复杂的机制, 如 RNAi 可以通过基因组区域的重新甲基化而抑制基因表达[8-9]。Wassenegger et al [8] 发现外源的 dsRNA 可以导致基因组上的 DNA 序列甲基化。如果甲基化出现在编码区, 则转录照常进行, 但基因表现 PTGS, 如果甲基化出现在启动子区域, 则转录不能进行, 从而表现为转录水平的沉默现象(TGS)。TGS 不及 PTGS 稳定, 也不具备可遗传性。研究还发现 RNAi 与染色体重排和异染色质形成有关, 通过改变染色质的结构可以影响基因的表达[10-11]。此外, 在线虫上还发现, 内源编码的 RNAi 诱导物, 如 lin-4 基因的产物, 也会在转译水平上抑制基因的表达[12]。

2 RNAi 技术的运用

依据 RNAi 现象, 科学家建立了 RNAi 技术, 即人为设计合成针对某特定基因序列的 dsRNA 来关闭或抑制该基因的表达。dsRNA 的合成包括化学合成法、体外转录法、转录载体体内转录法等。其中, 以 DNA 为模板体内合成 siRNA 载体的成功应用, 为 RNAi 的研究提供了更为简便和实用的方法, 使 RNAi 技术真正成为了可被广泛采用的有力工具[13]。

RNAi 技术在基因功能的研究中具有许多传统方法无法比拟的特点和优势。首先, RNAi 具有较高的特异性, 只引起与 dsRNA 同源的 mRNA 降解。RNAi 技术中 siRNA 序列选择余地大, 21-23 个核苷酸中只要改变一个核苷酸, 就可以使该 siRNA 序列不对靶向 mRNA 起作用, 因此 RNAi 可用来抑制单个核苷酸突变基因

的表达。例如血管内皮生长因子(VEGF)在肿瘤生长过程中具有重要作用，至少存在5个亚型，其功能和临床作用各不相同。通过抑制VEGF的表达可以达到治疗肿瘤的目的，然而至今尚缺乏抑制特定VEGF亚型的有效手段。Zhang et al^[14]成功利用RNAi技术抑制了VEGF188亚型的表达，结果使该亚型的表达下降42.7%，而其他亚型的表达未受影响。其次，RNAi抑制基因表达具有很高的效率，仅需少量的dsRNA就能有效抑制靶基因表达。Verma et al^[15]研究发现要达到相同的抑制 β -连环蛋白基因的目的，反义寡核苷酸技术所需浓度为2 umol/L，而siRNA则仅需要20 nmol/L。Aoki et al^[16]比较了反义RNA技术和RNAi对人癌细胞的影响，作者将正义和反义RNA表达质粒转染肝癌细胞和胰腺癌细胞，以往的观点认为如果同时转染正义和反义RNA，反义转染的作用可能会被正义转染消除，但是研究结果却发现同时转染正义和反义RNA质粒对目的基因的抑制作用明显高于单一的反义RNA转染，而单一的正义转染则不能抑制基因表达。作者提出通过RNAi来抑制靶基因的表达，其效果优于反义RNA技术。并且RNAi技术在转染细胞48 h后即可了解抑制靶基因表达后的生物学现象，若使用基因敲除等其他技术，往往需要较长的时间。此外，RNAi具有可传播性，即siRNA可以在RNA依赖性RNA聚合酶的作用下进行大量扩增，并转运出细胞，使RNAi扩散到整个机体并可以传代^[17]。

RNAi技术正改变着功能基因组学领域的研究步伐。由于RNAi能够特异、高效、经济地抑制基因表达，可以作为代替基因敲除的遗传工具，因此迅速发展的RNAi技术已经成为一种功能强大的研究哺乳动物中选择性抑制特异性基因表达和研究基因功能的重要方法。此外，RNAi还为某些疾病的基因治疗提供了新途径，尤其是针对某个基因表达异常增高引起的疾病，如病毒感染、肿瘤等^[18]。RNAi有望治疗艾滋病和丙型肝炎等病毒感染性疾病，并降低某些病毒相关性肿瘤的发生率，如宫颈癌、肝癌等^[19-22]。Wilson et al^[23]设计针对HCV基因组的siRNA以电穿孔方式导入人肝癌细胞(Huh-7)，病毒特异蛋白的表达水平可降低90%，从而有效减少病毒复制，并且siRNA的干扰作用的持续时间超过3 wk。动物体内实验也发现siRNA能保护小鼠抵御HCV病毒的感染^[24]。

3 RNAi与消化系肿瘤

肿瘤的形成是一个多步骤的过程，其中原癌基因的异常激活和过度表达是重要因素之一。通过RNAi技术抑制肿瘤细胞中这些过度表达的基因，将有利于肿瘤的治疗。例如在人类常见的肿瘤中约30%存在活化的ras癌基因，胰腺癌中更是高达85%。Brummelkamp et al^[2]建立了K-ras的siRNA表达系统，并转染人胰腺癌细胞系CAPAN-1，发现能够显著降低K-ras的mRNA表达水平，并可明显抑制细胞克隆的生长以及阻止裸鼠

肿瘤的形成

β -连环蛋白和APC基因是WNT信号传导途径的关键成分。这些基因的突变可引起 β -连环蛋白表达水平增加，导致细胞过度增生，促进结肠息肉和结肠癌的发展。有学者^[15]构建了 β -连环蛋白基因的siRNA并转染结肠癌细胞系SW480和HCT116，这2种细胞分别存在APC和 β -连环蛋白基因突变，因此 β -连环蛋白水平升高。结果发现转染siRNA后能显著降低 β -连环蛋白基因的表达，并抑制癌细胞的增生。siRNA可以针对 β -连环蛋白基因的多个靶区域，使得蛋白表达量降低90%，反义寡核苷酸技术虽然也能用于抑制 β -连环蛋白基因的表达，但其抑制效果明显低于RNAi。作者进一步用转染 β -连环蛋白基因siRNA的HCT116细胞注射裸鼠，4/8存活超过70 d，而对照组则全部死亡。

端粒酶的活化使细胞具有无限增生的能力，是恶性肿瘤的普遍现象。正常细胞不表达端粒酶，而大多数肿瘤细胞中有端粒酶的表达^[25]。Kosciolek et al^[26]构建了端粒酶逆转录酶(hTERT)和端粒酶RNA(hTR)的同源序列dsRNA，并转染各种肿瘤细胞系，结果发现这2种dsRNA都能使肿瘤细胞内的端粒酶活性有所降低，并且RNAi对端粒酶表达的抑制作用具有浓度和时间的双重依赖性。作者认为端粒酶可作为肿瘤分子治疗的靶基因，通过siRNA抑制端粒酶活性是非常具有潜力的方法。

肿瘤细胞接触某种治疗药物后可获得对其他非相关药物的广泛耐药性，这种现象称为多药耐药(multidrug resistance, MDR)。MDR是肿瘤化疗的主要障碍之一，而MDR1基因的过度表达及基因产物P糖蛋白增加是MDR的重要原因。Nieth et al^[27]通过RNAi技术，设计了特异的siRNA处理胰腺癌和胃癌细胞来抑制MDR1的表达。结果发现这2种细胞的MDR1的mRNA和蛋白表达量可降低90%以上。细胞对柔红霉素的耐药作用分别下降了89%和58%。结论提示RNAi技术可作为一种特殊的方法运用于肿瘤患者，提高肿瘤细胞对药物的敏感性。

目前认为正确维持甲基化状态是生长发育过程中所必需的，而肿瘤发生过程中普遍存在甲基化失衡的情况^[28]。DNA甲基化酶(DNA methyltransferase, Dnmt)活性升高是癌细胞的一个具有特征的早期分子改变，可引起DNA发生异常甲基化，基因活性改变和染色体不稳定。Matsukura et al^[29]建立了Dnmt1的siRNA的表达质粒转染结肠癌细胞系HCT116，结果可以使Dnmt1的表达显著降低，并可引起肿瘤细胞的生长停止。

Williams et al^[30]通过cDNA微阵列分析发现结肠癌细胞HCT116中c-myc和survivin表达明显升高，于是分别构建c-myc和survivin的siRNA转染HCT116细胞，结果2种基因的蛋白表达量显著下降，并且细胞增生也受到抑制。将转染survivin siRNA的细胞注射裸鼠，与对照组相比可使肿瘤直径减小为原来的1/7。而将转染c-myc siRNA细胞注射裸鼠，肿瘤直径减少26%。由于这2个基因都与细胞增生有关，因此相对c-myc而言，

survivin 更有可能成为肿瘤治疗的靶基因。作者提出 RNAi 可作为一种新型的抗癌治疗手段，并且 RNAi 结合 cDNA 微阵列分析是探索过度表达的肿瘤相关基因的有力工具。

目前使用 RNAi 技术应用于人类疾病的预防和治疗尚在起步之中，需要更加广泛和细致的研究。仍有许多问题需要解决，比如提高 RNAi 的转染效率，避免 RNAi 转染后在细胞内的降解等。但是现有的研究成果已经使人们认识到 RNAi 对肿瘤基因研究的巨大潜力，也为肿瘤的基因治疗带来了新的希望^[31]。

4 参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
- 2 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002;2:243-247
- 3 McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39
- 4 Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 2002;1575:15-25
- 5 Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:829-834
- 6 Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 2003;19:9-12
- 7 Sijen T, Plasterk RH. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 2003;426:310-314
- 8 Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994;76:567-576
- 9 Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000;19:5194-5201
- 10 Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell* 2002;110:689-699
- 11 Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002;297:1833-1837
- 12 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251
- 13 Miyagishi M, Taira K. Development and application of siRNA expression vector. *Nucleic Acids Res Suppl* 2002;2:113-114
- 14 Zhang L, Yang N, Mohamed-Hadley A, Rubin SC, Coukos G. Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knockdown of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:1169-1178
- 15 Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. Small interfering RNAs directed against beta-Catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:1291-1300
- 16 Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, Kamiya J, Kiyosawa K. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:96-102
- 17 Dalman T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000;101:543-553
- 18 Lieberman J, Song E, Lee SK, Shankar P. Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference. *Trends Mol Med* 2003;9:397-403
- 19 Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002;8:681-686
- 20 Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002;418:430-434
- 21 Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002;418:435-438
- 22 Milner J. RNA interference for treating cancers caused by viral infection. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:459-467
- 23 Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatinos S, Rodriguez-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2783-2788
- 24 McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39
- 25 Horikawa I, Cable PL, Mazur SJ, Appella E, Afshari CA, Barrett JC. Downstream E-box-mediated regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transcription: evidence for an endogenous mechanism of transcriptional repression. *Mol Biol Cell* 2002;13:2585-2597
- 26 Koscielak BA, Kalantidis K, Tabler M, Rowley PT. Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. *Mol Cancer Ther* 2003;2:209-216
- 27 Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett* 2003;545:144-150
- 28 Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* 2003;190:125-133
- 29 Matsukura S, Jones PA, Takai D. Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 2003;31:77
- 30 Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003;9:931-946
- 31 Borkhardt A. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference-new hope for a highly specific cancer treatment. *Cancer Cell* 2002;2:167-168

基因功能研究新途径 - RNA 干扰

万志红, 王宇明

万志红, 王宇明, 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
国家自然科学基金资助课题, No. 30300304
项目负责人: 万志红, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. zhihong_wan@sohu.com
电话: 023-68754289 传真: 023-65337618
收稿日期: 2003-08-11 接受日期: 2003-10-18

摘要

近年来的研究表明, 一些小的双链RNA可以高效特异地阻断体内特定基因表达, 促使mRNA降解, 诱导细胞表现出特定基因缺失的表型, 称为RNA干扰(RNA interference, RNAi). 它是体内抵御外在感染的一种重要保护机制, 也可以作为一种简单有效的代替基因敲除的遗传工具. 现就RNAi的研究进展做一综述.

万志红, 王宇明. 基因功能研究新途径 - RNA 干扰. 世界华人消化杂志 2004; 12(4):962-964
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/962.asp>

0 引言

传统基因功能的研究方法包括: 基因敲除、转基因、反义技术和显微注射等. 随着人类和鼠基因组序列分析工作的完成, 要求我们用更快捷、准确、有效的工具去研究哺乳动物的基因功能. RNA干扰(RNA interference, RNAi)提供了一个基因功能研究的新途径. 虽然已有证据显示RNAi在小鼠早期发育中起作用, 但对所有哺乳动物是否有普遍意义还不够清楚. 现就RNAi的研究进展做一综述.

所有有机物都有限制异常或外源基因表达的保护机制. 随着转基因技术的广泛应用, 发现转入的基因可被机体当作外源遗传物质. 以植物为例, 发现转入基因可诱导其自身沉默, 并以一种称为转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)或共抑制(cosuppression)的过程同时引起同源基因的沉默^[1]. 而当在线虫中转入双链RNA后导致的同源基因沉默比正义或反义RNA更为有效, 这一现象因此引起研究者的关注. 在许多种属中引入双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)均可引起强烈、特异性的基因沉默(gene silencing), 这种现象称为RNA干扰^[2-4]. 这种特异性抑制靶基因的转录后表达的现象, 存在于从低等的线虫到人类培养细胞等多种有机体, 通过序列特异性引起转录后基因沉默. 如今, RNA干扰已成为分子生物学领域最热门的研究课题之一. 过去几年的研究表明RNA干扰在植物和动物中都会发生, 并且参与抵抗病毒感染、转座子沉默机制等过程.

RNAi有关技术是研究转录后调控的有效工具, 可用于功能基因组学研究以及基因治疗等临床用途.

1 RNA 干扰的作用特点

RNA干扰可以从两个水平引起基因沉默: (1)转录后沉默: 特异性抑制靶基因的转录后表达. 即RNAi作用于信使RNA从宿主细胞DNA模板转录后. dsRNA通过碱基互补结合于mRNA的特定区域, 随后通过引导相关的酶复合物引起mRNA互补片段的降解, 诱导相关的基因沉默. (2)转录水平沉默: 序列特异性调节基因组功能. 其中RNA引导的DNA甲基化(RdDM)现象第1次在植物中发现, 尽管RdDM只在植物中研究较深, 但越来越多的证据表明它能在许多生物体中调节基因功能^[5-6]. 与启动子序列同源的siRNA(short interfering RNA, siRNA), 一般引起启动子甲基化, 从而在转录水平干扰基因表达; 与开放性阅读框架序列同源的siRNA, 一般抑制靶基因的转录后表达.

目前认为RNAi至少包括两步RNA的降解过程, 第一步为dsRNA降解形成特征性的与靶基因同源的21-23个核苷酸的双链RNA, 第二步为这些短核苷酸序列参与形成多亚基复合物, 称为RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), 并引导复合物中的核酸内切酶降解特异性的mRNA, 阻止mRNA翻译成蛋白质. 序列特异性要求siRNA与目的基因之间必须完全配对. 最近有学者报道从果蝇中成功分离到执行上述第一步核酸降解过程的名为Dicer的酶, 它是特异性酶解dsRNA的RNase III核酸酶家族成员, 在进化中高度保守^[7]. 此外, siRNA可作为一种特殊引物, 在RNA依赖RNA聚合酶(RdRp)作用下以靶mRNA为模板合成dsRNA, 后者可被降解形成新的siRNA; 新生成的siRNA又可进入上述循环, 这种过程称为随机降解性多聚酶链反应(random degradative PCR). 新生的dsRNA反复合成和降解, 不断产生新的siRNA, 使靶mRNA渐进性减少, 从而发挥强大的诱导基因沉默现象^[8-9].

与反义核酸、核酶相比较, 干扰RNA的作用特点包括: (1)特异性抑制目的基因. 针对某特定的内源基因的dsRNA转入动物体内或胚胎内, 能特异抑制该基因的功能, 而单链正义或反义RNA的抑制作用较弱或缺失. (2)广泛分布且可遗传. dsRNA分子能够在线虫体内被有效转运至全身各处, 用经小肠微注射或者浸润喂食线虫的方法都能得到各组织中对靶基因的抑制, 在体细胞和生殖细胞中都能检测RNA的表达, 并且其子

代也产生了对相应基因强烈而特异的抑制效应^[10], 但此特点仅限于低等生物, 目前在哺乳动物尚未发现; (3) RNAi 的靶序列需慎重选择。实验证明, 只有针对编码区的 dsRNA 才能产生有效和特异性的干涉, 针对内含子区域的 dsRNA 序列则不能产生; 此外 dsRNA 的长度对 RNAi 的效率有影响^[11]。选择靶序列应避免高度同源序列之间的交叉干扰, 例如对线虫的体壁肌肉肌球蛋白重链的编码区基因进行 RNAi 实验, 当选择其 5' 端高度保守区作为靶序列进行 dsRNA 注射时产生致死表型, 而选择其他部分进行实验时则产生预期的瘫痪表型^[12]。

2 RNA 干扰的应用

2.1 研究基因功能的新工具 通过 RNAi 特异性抑制基因的表达来阐明基因在生物体中的特定功能。现存的一些抑制哺乳细胞特定基因表达的方法的效果和重复性都不理想, 而 RNAi, 由于能在极低浓度, 微量(nmol 范围) siRNA 存在情况下显示出特殊有效性, 在研究哺乳动物细胞培养物的基因功能方面有极大的应用前景。许多基因已被成功地从哺乳动物体细胞和胚胎细胞系中敲除, 包括常用的 HeLa, HEK293, 和 P19 细胞^[13-15]。21 nt 的双链 RNA, 已经成为敲除特定基因在哺乳动物细胞系中表达的强大工具, 对分析功能显性缺陷型也非常有用。将靶向特定基因的大约 21 碱基长短的双链 siRNAs (small interfering RNAs), 或者是 45-50 碱基长短的发夹结构 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 转染到细胞。shRNA 在细胞内会自动被加工成为 siRNA, 从而引发基因沉默或者表达抑制。现在有多个报道证实通过质粒表达 siRNAs 同样可以抑制特定基因的表达。尽管细节各有不同, 但载体大都是用 Pol III 启动子启动编码 shRNA 的序列。选用 Pol III 启动子的原因在于这个启动子总是在离启动子一个固定距离的位置开始转录合成 RNA, 遇到 4-5 个连续的 U 即终止, 非常精确。当这种带有 Pol III 启动子和 shRNA 编码序列的质粒转染哺乳动物细胞时, 这种能表达 siRNA 的质粒确实能够下调特定基因的表达, 抑制范围包括外源基因和内源基因。采用质粒表达 siRNA 的优点在于: 通过 siRNA 表达质粒的选择标记, siRNA 载体能够更长时间地抑制目的基因表达; 此外, 由于质粒可以复制扩增, 相比起化学合成来说, 能够显著降低制备 siRNA 的成本^[16-17]。

目前可以实现 RNAi 在特定时期针对特定组织细胞, 对目的基因功能的干扰, 如 dsRNA 成功用于小鼠早期胚胎特异基因的阻断, 分别阻断了卵母细胞的 c-mos 和早期胚胎(植入前)的 E-cadherin 及 GFP 转基因的表达^[18], 为基因调控和发育研究提供了广泛使用该技术的可能。人工导入 dsRNA 以抑制基因功能将成为在后基因组时代进行基因功能分析的有效手段。

2.2 抗病毒治疗的新策略 对哺乳动物而言, 30 bp 以上的 dsRNA 能够诱导抗病毒干扰素反应, 整体性地抑制 mRNA 翻译^[19-20]。但导入短的 siRNA 到哺乳动物细胞中

不会激活干扰素反应, 却能诱导序列特异性的 mRNA 降解^[21-22]。RNAi 介导的转录后沉默提供了在病毒生命周期的多个阶段抑制病毒和细胞内基因复制的强有力的潜在工具^[23-24]。siRNA 抗病毒机制与依赖于细胞及体液免疫不同, 而是依赖于 siRNA 与目标 RNA 的核苷酸碱基配对, 引导酶降解病毒的目的基因。Novina et al^[25]证实 siRNA 能通过 HIV-1 病毒受体进入人体细胞, 针对 HIV 受体 CD14 及次要受体 CCR5 设计的 siRNA 能降低两个受体的表达; 针对关键基因 gap 的 siRNA 能降解 gap 基因, 最终抑制病毒基因组 RNA 聚集及 P24 蛋白产生, 并能降低现症感染的病毒复制。Gitlin et al^[26]也报道用脊髓灰质炎病毒的 siRNA 预处理人和小鼠细胞能够显著降低病毒滴度以及从感染的细胞中清除病毒。这些最新的实验研究表明, RNAi 确实能抑制病毒感染。但由于这些实验都是在体外合成 siRNA 导入细胞内, 而 RNA oligo 合成费用昂贵, 及其对基因表达抑制的暂时性及 RNA 的不稳定性严重制约了他的应用。由于体外转录的缺陷, 最近 Jacque et al^[27]用 T7 启动子在细胞内转录 siRNA, 并报道 RNAi 能抑制人细胞株及淋巴细胞感染 HIV, 结果发现, siRNA 能作用于 HIV 的多种基因阻止病毒复制, 并且进入细胞内的病毒可被 siRNA 降解。

3 存在问题及展望

siRNA 可能用于许多抗病毒作用, 但仍有许多问题还需进一步研究。最重要的一点是 siRNA 并不能作用于所有病毒的 RNA 序列: 某些序列可能藏于二级结构或目的 RNA 的折叠区域; 某些序列可能与蛋白质形成紧密结构从而使 siRNA 无法识别^[28]。因此最合适靶序列的选择需要反复试验。此外, 病毒容易发生变异, 一方面逃避机体免疫识别, 另一方面避免 siRNA 识别。可以针对病毒的保守区域或病毒的多个靶序列设计多个 siRNA。在使用 siRNA 抗病毒的过程中病毒可能产生抵抗 siRNA 的蛋白, Silhavy et al^[28]报道病毒产生 19 ku 的蛋白(p19)是一基因沉默的抑制因子, 体外实验发现 p19 能与 21-25 nt 的 RNA3' 末端的 2 个核苷酸结合, 从而阻断 siRNA 的作用。

siRNA 已经很有效地导入了培养细胞, 但如何把他用于动物体内, 甚至患者体内还需要更进一步改进方法。尽管抗病毒 siRNA 方法还不够完善, 但 siRNA 已显示出比以往基因治疗更明显的优势。目前处于研究状态的反义核酸和核酶, 虽然表现出一定程度的抗病毒活性, 但核酶不稳定, 反义核酸的抑制作用较弱。RNAi 和 siRNA 的发现产生了一种新的功能基因组研究策略, 同时有可能研究出基于 RNAi 的基因治疗药物。

4 参考文献

- 1 Vaucherel H, Fagard M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* 2001;17:29-35
- 2 Bosher JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2000;2:E31-E36

- 3 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;409:363-366
- 4 Pickford AS, Cogoni C. RNA-mediated gene silencing. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:871-882
- 5 Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, Toyoda J, Yasuda K, Iino S. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2002;37:355-363
- 6 De Clercq E. Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini Rev Med Chem* 2002;2:163-175
- 7 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-366
- 8 Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001;107:297-307
- 9 Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. Acellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293:834-838
- 10 Baulcombe D. RNA silencing. Diced defence. *Nature* 2001; 409:295-296
- 11 Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* 2000;404:293-296
- 12 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200
- 13 Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 2001;114:4557-4565
- 14 Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1443-1448
- 15 Caplen NJ. RNAi as a gene therapy approach. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:575-586
- 16 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
- 17 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553
- 18 Wianatty F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-strand RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000;2:70-75
- 19 Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1415-1434
- 20 Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67: 227-264
- 21 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interferences is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15:188-200
- 22 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryolysate. *EMBO J* 2001;20: 6877-6888
- 23 Carmichael GG. Medicine: silencing viruses with RNA. *Nature* 2002;418:379-380
- 24 Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol* 2001;1:34
- 25 Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002; 8:681-686
- 26 Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002; 418:430-434
- 27 Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002;418:435-438
- 28 Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, Szittya G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyan J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 2002;21:3070-3080

• 文献综述 •

错配修复基因甲基化紊乱与消化系肿瘤

孙丹凤, 房静远

孙丹凤, 房静远, 上海第二医科大学附属仁济医院 上海市 200001
项目负责人: 房静远, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海市消化疾病研究所.
电话: jingyuanfang@yahoo.com
收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

摘要

肿瘤的发生过程中, 表型遗传修饰对肿瘤相关基因的表达起调控作用, 主要有总基因组甲基化水平降低, 癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化及抑癌基因的低乙酰化。其中,DNA 错配修复基因的失活与基因的甲基化紊乱密切相关。hMLH1(human Mut L homologue 1) 和 hMSH2(human Mut S homologue 2) 是 DNA 错配修复的主要控制基因, 其表达的失活与该启动子区高甲基化有关。本文就消化系肿瘤发生中错配修复与甲基化紊乱关系作一综述。

孙丹凤, 房静远. 错配修复基因甲基化紊乱与消化系肿瘤. 世界华人消化杂志 2004;12(4):965 - 968
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/965.asp>

0 引言

消化系统肿瘤的发生与很多因素有关, 其中作为抑制肿瘤发生的 DNA 错配修复基因的失活存在于很多肿瘤中, 主要为 hMLH1 基因。该基因失活可产生微卫星不稳定现象, 多项研究发现其失活与启动子区高甲基化有关。甲基化可使基因表达下调, 在真核生物中参与多种重要生物学功能。错配修复基因的甲基化在肿瘤发生过程中起重要作用, 经甲基化抑制剂处理后该基因可重新表达, 从而恢复对 DNA 的错配修复功能。

1 错配修复

错配修复(mismatch repair, MMR) 是细胞纠正复制错误的重要手段, 常出现在增生过程中以维持基因的精确性。hMLH1 和 hMSH2 是主要的 DNA 错配修复控制基因。MLH1 和 MSH2 基因蛋白产物的功能是识别和修复错配的 DNA。hMLH1 或 hMSH2 基因完全失活时, 不能对转换和颠换突变进行识别和修复, 因而激活肿瘤基因或使某些抑癌基因失活, 最终可导致细胞死亡或肿瘤形成。肿瘤形成时 MMR 缺失的细胞突变率提高 1 000 倍, 这可由微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI) 分析获知。所谓 MSI 是指由于 MMR 突变功能异常, 造成 DNA 频发复制错误, 导致细胞的微卫星 DNA 序列发生改变, 表现为微卫星片段长度增加或减少。

2 DNA 甲基化

DNA 甲基化是脊椎动物 DNA 惟一的自然化学修饰方式, 由 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)介导, 将胞嘧啶转变为 5- 甲基胞嘧啶的一种反应, 主要发生在胞嘧啶 - 鸟嘌呤的 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶碱基上。真核生物中, DNA 甲基化修饰的生物学功能有重要意义, 包括在转录水平抑制基因的表达、参与真核生物胚胎发育调节、参与基因组印迹和 X 染色体失活及与细胞分化、增生有关。通常将 CpG 丰富的区域称为 CpG 岛, 多种基因的启动子和第 1 外显子富含 CpG 岛。在正常组织中, 散在的 CpG 通常是甲基化的, 而 CpG 岛则为非甲基化。在肿瘤发生过程中, 该模式发生逆转, 包括总基因组甲基化水平降低、癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化。抑癌基因的高度广泛甲基化使 DNA 发生转录抑制, 抑癌基因的不能表达参与了肿瘤的发生。近来又发现与肿瘤发生密切相关的错配修复基因亦存在这一现象。甲基化酶抑制剂 5-aza 及其衍生物 5-aza-dC 可逆转这一反应而使甲基化水平降低。

3 hMLH1 和 hMSH2 的甲基化调控

hMLH1 和 hMSH2 在生理状况下表达丰富的蛋白产物以维持基因的精确性, 当其发生突变、缺失或其他改变时, 则影响其正常表达, 出现错配修复功能障碍, 与肿瘤的发生有关^[1]。许多研究证实 hMLH1 启动子甲基化在 MSI 阳性肿瘤中很常见, 该甲基化阻断 hMLH1 的转录。Deng et al^[2] 在研究伴 MSI 的散发性结直肠癌时, 在 hMLH1 启动子区鉴定出一个 CCAAT 盒, 发现在其上游 2 个碱基对处的一个 CpG 位点甲基化可抑制转录因子 CBF 与 CCAAT 盒的结合, 认为这是导致结肠癌中 hMLH1 基因失活的原因之一。有学者^[3] 分析了 hMLH1 启动子区 CpG 岛甲基化模式, 发现启动子特殊区域的甲基化程度在 hMLH1 基因失活中起重要作用, 而其更上游区域及第 1 外显子起始区的甲基化状态与基因失活无必然联系。这些发现都表明 hMLH1 基因的失活与其启动子某些特殊区域的甲基化有关。另外, Deng et al^[4] 还证实, 在表达正常水平 hMLH1 的 17 个结直肠细胞系和 54 例结直肠肿瘤中分别有 4 个细胞系和 16 例肿瘤存在 hMLH1 位点的杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH), 而在所有表达非正常水平 hMLH1 的 9 个细胞系和 9 例肿瘤中均未发现这一现象。强烈提示杂合性缺失并不常与 hMLH1 基因的失活有关。一项研究^[5] 检测了 100 例原发性胃癌患者, 发现 hMLH1 甲基化的发生频

率与年龄增长呈正相关，并提出 hMLH 1 甲基化在老年人群胃癌发生中有重要作用。

有关 hMSH 2 甲基化研究的报道相对较少，除个别研究认为甲基化调控其基因表达^[6]外，多数实验显示其在结直肠癌^[7]和胃癌^[8-10]等发生中与该基因失活关系不明显。相反，该基因的甲基化与内分泌肿瘤^[11]、肺癌^[12]和乳腺癌^[13]等的该基因失活有关。

4 错配修复基因甲基化紊乱与微卫星异常

4.1 胃癌 胃癌与其他人类散发性肿瘤相比有较高的MSI。Shin et al^[14]在研究 hMLH 1、hMSH 2 的遗传状态与表达水平及 MSI 的关系时，观察了 11 种人类胃癌细胞系。发现仅 3 种伴有 hMLH 1、hMSH 2 遗传学改变的细胞系有 MSI。3 种含野生型基因的细胞系，尽管并无 MSI，其 hMLH 1、hMSH 2 表达明显下降。由此可见，相对低水平的 hMLH 1、hMSH 2 表达仍可维持微卫星稳定 (microsatellite stable, MSS)。该研究认为 MSI 仅与错配修复基因的遗传改变有关。为研究 hMLH1 启动子高甲基化在伴 MSI 多发性胃癌的形成中所起的作用，Jung et al^[9]分析了来自 15 个患者的 33 例多发性胃癌。发现所有高频 MSI (high-frequency MSI, MSI-H) 缺乏 hMLH 1 的表达而仍有 hMSH 2 表达，无 MSI 或低频 MSI (lower-frequency MSI, MSI-L) 者则均有这 2 种基因的表达而所有不表达 hMLH 1 者均存在该基因高甲基化状态。Fang et al^[15]及其他不少学者^[16-19]也发现伴 MSI-H 的胃癌其 hMLH 1 甲基化程度明显高于 MSI-L 或 MSS 者。而早期胃癌中的 MSI 现象及由高甲基化所致的 hMLH 1 失活则较胃腺瘤更常见^[20-21]。散发性胃癌中约有 15% MSI-H。Kang et al^[10]研究了 hMLH 1 和 hMSH 2 启动子甲基化与其基因表达在散发性胃癌中的相互关系，以及这 2 个错配修复基因与复制错误(replication error, RER) 的关系。发现 hMLH 1 表达缺失仅存在于 RER 阳性组，95% RER 阳性肿瘤有 hMLH 1 高甲基化。不管 RER 阳性或阴性，所有肿瘤均无 hMSH 2 启动子甲基化，并都表达 hMSH 2。提示在 MSI-H 散发性胃癌中，hMLH 1 启动子区甲基化可能是基因失活的主要机制^[22]。一项研究^[23]发现 8 例家族性胃癌(FGC) 中有 6 例 MSI，4 例 MSI 显示 hMLH 1 表达紊乱，且此 4 例 MSI 均有 hMLH 1 启动子甲基化。与此相反，有 hMLH 1 表达的胃癌则未发现该启动子区甲基化。近来研究表明，早期乳头状型胃腺癌较其他形态学类型的胃癌有更高及更广泛的 MSI-H，并指出由启动子甲基化导致的 hMLH 1 表达静默是引起乳头状胃腺癌错配修复功能失活的原因所在，且是其形成过程中的一个早期事件^[24]。有学者提出 hMLH 1 启动子高甲基化是小凹型胃癌发展中一个起始的较重要因素^[25]，而肠型胃癌启动子区的高甲基化较恶性弥漫型更常见^[26]。Sakata et al^[27]观察了 17 例单发性胃癌和 13 例多发性胃癌以及邻近和远离这些肿瘤的正常组织。发现所有 MSI-H 肿瘤存在 hMLH 1 启动子甲基化，并与 hMLH 1 蛋白

表达相关。而且伴 MSI-H 的单发性和多发性胃癌的邻近正常组织有同样高水平的 hMLH 1 启动子甲基化。提示 MSI-H 胃癌正常黏膜组织的 hMLH 1 启动子高甲基化可增加其向肿瘤发展的危险性。Baek et al^[8]检测 86 例胃腺瘤 hMLH 1 和 hMSH 2 的表达，发现 87% MSI 阳性腺瘤 hMLH 1 表达缺失或减少，而所有这些腺瘤都存在 hMLH 1 启动子甲基化。MSI 阴性腺瘤 hMLH 1 表达失活仅占 4%。hMSH 2 基因则在大多数腺瘤中有大量表达，而与 MSI 状态无关。提示由启动子甲基化所致的 hMLH 1 表达失活是 MSI 阳性胃腺瘤的一个早期事件，并可能是其起源。尽管大多数伴 MSI 的散发性胃癌与 hMLH1 高甲基化有关，却仍有一部分胃癌虽有 hMLH1 高甲基化而不表现为 MSI。有学者^[28]就此现象进行研究，将 hMLH1 启动子区由远及近分成 3 个区域，各自分析他们的高甲基化与 MSI 之间的联系。最终发现 hMLH 1 启动子近端区域的高甲基化在伴有 MSI 的胃癌形成过程中起重要作用。Kang et al^[29]亦发现靠近 hMLH 1 启动子转录近端某个特定小区域的甲基化往往与肿瘤的 MSI 阳性有关。鉴于 MSI 与胃癌的密切关系，MSI 很可能为将来胃癌的诊断及分类提供一种很好的分子生物学手段^[30]。

4.2 结直肠癌 当前结直肠肿瘤形成模式以 APC 基因突变作为起始事件，其他如凋亡相关基因、DNA 错配修复基因等的异常则为结直肠癌发生的早期阶段奠定基础。这些基因的失活常和启动子区高甲基化有关。研究证明 DNA 甲基化在肿瘤发展过程中起潜在媒介作用。结直肠癌中，DNA 错配修复基因的失活与 MSI 有关。许多研究发现大多数伴 MSI 的散发性结直肠癌有 hMLH 1 启动子甲基化，且该甲基化常与 hMLH 1 表达缺失有关。伴 MSI 的结直肠癌其高甲基化可通过去甲基化逆转而重新表达 hMLH 1，并使 MMR 缺失的细胞系恢复 MMR 功能。由此提出散发性结直肠癌的 MMR 是由 hMLH 1 的表型遗传修饰即甲基化而失活。10-15% 的散发性结直肠癌及大多数遗传性非息肉性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) 伴有 MSI-H，其中 HNPCC 的错配修复基因失活常由突变引起，而散发性结直肠癌的基因失活则如前所述与甲基化有关^[31-33]。因此对 MSI-H 肿瘤甲基化及基因突变的分析可作为 HNPCC 筛选的一种有效手段^[34]。虽然免疫组化技术亦能鉴定错配修复基因的突变情况，但他不能取代对 MSI 的检测分析^[35]。另外，血清学基础上的甲基化分析也可作为发现和监控 MSI 结直肠癌的一种手段^[36]。Young et al^[37]将按照 Bethesda 标准规定的 112 例 MSI-H 家族性结直肠癌和 57 例 MSI-H 散发性结直肠癌相比较，发现散发性肿瘤的 MSI 较 HNPCC 更为广泛。在 hMLH 1 表达缺失的肿瘤中分别有 87% 的散发性肿瘤和 55% 的 HNPCC 有 hMLH 1 甲基化。Miyakura et al^[38]在研究 88 例散发性结直肠癌时，88.9% 的 MSI-H 结直肠癌有 hMLH 1 启动子甲基化，其中又有 89% 为完全甲基化并伴有 hMLH 1 蛋白表达减

少。在部分甲基化的病例中, 仅 hMLH 1 启动子上游区域出现甲基化。在 MSI-H 的正常黏膜中亦有 33.3% 为部分甲基化。因此认为 hMLH 1 启动子上游区域甲基化可能是 MSI-H 肿瘤发生过程中的一个早期事件^[39]。另外他们还提出, 甲基化的频率和女性^[40-41]及年龄增长密切相关。有学者提出一些右半结肠的增生性息肉可增加 MSI 散发性结直肠癌发生的概率, 肿瘤细胞亚群的 hMLH 1 启动子甲基化在肿瘤发展过程中起决定性作用^[42]。15~25% 的散发性结直肠癌有复制错误(RER)现象。研究表明大多数(70%) RER 阳性肿瘤细胞系突变表现型是由 hMLH 1 启动子甲基化引起的, 而与杂合性缺失无关^[43]。Cunningham et al^[44]研究 257 例非选择性的结直肠癌患者, 其中 88% 的 hMLH 1 阴性患者及所有 MSI-H 者有 hMLH 1 启动子甲基化而未检测到 hMLH 1 突变。部分由炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)所致的肿瘤亦有 MSI 特征, 研究发现他们与 hMLH 1 启动子甲基化密切相关, 尤其在 MSI-H 中。同时 hMLH 1 甲基化及 MSI 又与 hMLH 1 表达减少明显相关。因此, 现认为 hMLH 1 甲基化导致至少一种 IBD 肿瘤亚型的 DNA MMR 缺失^[45]。研究表明, 由 MMR 缺失所致的结直肠癌对抗多种化疗药物, 包括 5-氟尿嘧啶(5-FU)。体外试验显示, 5-aza-dC 诱导的去甲基化反应可使 MLH1 蛋白重新表达, 进而克服对 5-FU 的抵抗, 这将为今后肿瘤化疗方案的完善提供帮助^[46]。Plumb et al^[47]的研究也支持这一观点。值得注意的是, 近来有学者^[48]提出 MSI 反而可逆转由 DNA 甲基化所致的结直肠癌不良预后, 其机制尚有待进一步研究。

4.3 肝细胞癌 迄今为止, 尚未明确 MSI 在肝癌发生过程中的作用。一项研究^[49]对 36 例肝癌的 hMLH 1 和 hMSH 2 进行免疫组化分析, 显示所有肿瘤均染色阳性。并对微卫星标记物 BAT26 进行检测, 结果无一肿瘤在该位点表现 MSI。这些发现提示 MMR 缺失在肝癌发生过程中无明显影响^[50]。Kondo et al^[51]研究来自 40 例患者的非癌组织及癌组织基因组 DNA, 非癌组织的 LOH、MSI、DNA 甲基化分别占 38%、15% 和 83%, 而癌组织此 3 类现象分别占 98%、20% 和 100%。未检测到由甲基化引起的 hMLH 1 基因静默, 这一现象与肝癌低 MSI 相一致。由此可见, 肝癌发生、发展中, LOH 及 DNA 甲基化紊乱起着关键作用, 而与甲基化引起的 hMLH 1 基因静默无关。

总之, 在肿瘤发生过程中, 错配修复基因 hMLH 1 启动子区的高甲基化使该基因表达沉默, 导致细胞 DNA MMR 功能障碍, 以致胃癌和结直肠癌的发生。甲基化酶抑制剂可逆转这一现象的事实, 可能为今后肿瘤的治疗提供一种新的思路。

5 参考文献

- 1 Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V, Fiorini T, Fossi S, Chang DK, Lunedeli V, Pozzato P, Zagari RM, De Luca L, Fuccio L, Martinelli GN, Roda E, Boland CR, Bazzoli F. Frequent loss of hMLH 1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Res* 2003; 63:787-792
- 2 Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene* 2001;20:7120-7127
- 3 Kang YH, Bae SI, Kim WH. Comprehensive analysis of promoter methylation and altered expression of hMLH1 in gastric cancer cell lines with microsatellite instability. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:119-124
- 4 Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Slezinger M, Kim YS. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002;86:574-579
- 5 Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, Fukuda Y, Sawabe M, Saitoh K, Kamiyama R, Hirokawa K, Yuasa Y. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;94:208-211
- 6 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
- 7 Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:3455-3460
- 8 Baek MJ, Kang H, Kim SE, Park JH, Lee JS, Paik YK, Kim H. Expression of hMLH1 is inactivated in the gastric adenomas with enhanced microsatellite instability. *Br J Cancer* 2001;85: 1147-1152
- 9 Jung HY, Jung KC, Shim YH, Ro JY, Kang GH. Methylation of the hMLH1 promoter in multiple gastric carcinomas with microsatellite instability. *Pathol Int* 2001;51:445-451
- 10 Kang GH, Shim YH, Ro JY. Correlation of methylation of the hMLH1 promoter with lack of expression of hMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *Lab Invest* 1999; 79:903-909
- 11 Miturski R, Postawski K, Semczuk A, Bogusiewicz M, Baranowski W, Jakowicki JA, Keith G. Global DNA methylation in relation to hMLH1 and hMSH2 protein immunoreactivity in sporadic human endometrial carcinomas. *Int J Mol Med* 2003;11:569-574
- 12 Wang YC, Lu YP, Tseng RC, Lin RK, Chang JW, Chen JT, Shih CM, Chen CY. Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest* 2003;111:887-895
- 13 Murata H, Khattar NH, Kang Y, Gu L, Li GM. Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 2002;21:5696-5703
- 14 Shin KH, Park JG. Microsatellite instability is associated with genetic alteration but not with low levels of expression of the human mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1. *Eur J Cancer* 2000;36:925-931
- 15 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
- 16 Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* 2001;20: 329-335
- 17 Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Hinoda Y, Imai K. Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *Int J Cancer* 1999;83:309-313
- 18 Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, Tosi P, Minacci C, Roviello F, Piva P, Hamilton SR, Jackson CE, Powell SM. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol* 1999;155:205-211

- 19 Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:159-164
- 20 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:2847-2851
- 21 Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003;83:635-641
- 22 Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;87:200-203
- 23 Yanagisawa Y, Akiyama Y, Iida S, Ito E, Nomizu T, Sugihara K, Yuasa Y, Maruyama K. Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;85:50-53
- 24 Guo RJ, Arai H, Kitayama Y, Igarashi H, Hemmi H, Arai T, Hanai H, Sugimura H. Microsatellite instability of papillary subtype of human gastric adenocarcinoma and hMLH1 promoter hypermethylation in the surrounding mucosa. *Pathol Int* 2001;51:240-247
- 25 Endoh Y, Tamura G, Ajioka Y, Watanabe H, Motoyama T. Frequent hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in differentiated-type tumors of the stomach with the gastric foveolar phenotype. *Am J Pathol* 2000;157:717-722
- 26 Oue N, Sentani K, Yokozaki H, Kitadai Y, Ito R, Yasui W. Promoter methylation status of the DNA repair genes hMLH1 and MGMT in gastric carcinoma and metaplastic mucosa. *Pathobiology* 2001;69:143-149
- 27 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
- 28 Ishiguro K, Kawakami K, Maeda K, Ishida Y, Omura K, Watanabe G. Microsatellite instability in gastric cancer is closely associated with hMLH1 hypermethylation at the proximal region of the promoter. *Int J Mol Med* 2003;12:603-608
- 29 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
- 30 Simpson AJ, Caballero OL, Pena SD. Microsatellite instability as a tool for the classification of gastric cancer. *Trends Mol Med* 2001;7:76-80
- 31 Haydon AM, Jass JR. Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol* 2002;3:83-88
- 32 Roh SA, Kim HC, Kim JS, Kim JC. Characterization of mutator pathway in younger-age-onset colorectal adenocarcinomas. *J Korean Med Sci* 2003;18:387-391
- 33 Wheeler JM, Loukola A, Aaltonen LA, Mortensen NJ, Bodmer WF. The role of hypermethylation of the hMLH1 promoter region in HNPCC versus MSI+ sporadic colorectal cancers. *J Med Genet* 2000;37:588-592
- 34 Potocnik U, Glavac D, Golouh R, Ravnik-Glavac M. Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;126:85-96
- 35 Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A. Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 2001;81:535-541
- 36 Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, Markowitz SD. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res* 2001;61:900-902
- 37 Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA, Jass JR. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* 2001;159:2107-2116
- 38 Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2001;121:1300-1309
- 39 Yuen ST, Chan TL, Ho JW, Chan AS, Chung LP, Lam PW, Tse CW, Wyllie AH, Leung SY. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002;21:7585-7592
- 40 Ashktorab H, Smoot DT, Carethers JM, Rahamanian M, Kittles R, Vosganian G, Doura M, Nidhury E, Naab T, Momen B, Shakhami S, Giardiello FM. High incidence of microsatellite instability in colorectal cancer from African Americans. *Clin Cancer Res* 2003;9:1112-1117
- 41 Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Ward R. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002;122:1376-1387
- 42 Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1307-1313
- 43 Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF. Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10296-10301
- 44 Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, Tester DJ, Parc Y, Burgart LJ, Halling KC, McDonnell SK, Schaid DJ, Walsh Vockley C, Kubly V, Nelson H, Michels VV, Thibodeau SN. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet* 2001;69:780-790
- 45 Fleisher AS, Esteller M, Harpz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Wilson KT, James SP, Herman JG, Meltzer SJ. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res* 2000;60:4864-4868
- 46 Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003;106:66-73
- 47 Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 2000;60:6039-6044
- 48 Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Hawkins NJ. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2003;21:3729-3736
- 49 Wang L, Bani-Hani A, Montoya DP, Roche PC, Thibodeau SN, Burgart LJ, Roberts LR. hMLH1 and hMSH2 expression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2001;19:567-570
- 50 Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Kaneto H, Sasaki S, Ohmura T, Satoh T, Karino Y, Endo T, Toyota J, Imai K. Infrequent widespread microsatellite instability in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2000;16:543-547
- 51 Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis-A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;32:970-979

• 文献综述 •

Calpain μ 与肝脏的缺血再灌注损伤

王蒙, 沈锋, 李锡锋, 陈旭, 吴孟超

王蒙, 沈锋, 李锡锋, 陈旭, 吴孟超, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗一科 上海市 200438
项目负责人: 王蒙, 200438, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗一科. lison_sh@hotmail.com
电话: 021-25071042 传真: 021-25071042
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

摘要

随着医学科学的迅速发展, 肝移植和肝癌手术已逐渐成为普遍的手术. 然而, 供肝的保存和肝癌手术时, 肝门部常温阻血后的再灌注损伤是导致移植肝脏和肝癌术后的肝脏功能不良的重要因素. 当肝脏的缺血再灌注时, Ca^{2+} 细胞内大量流入, 引起与 Ca^{2+} 依赖性水解蛋白酶(calpain μ)的活性化(初期反应变化)为十分重要的基点. 我们曾经通过 TBHP(tert-butyl hydroperoxide)处理培养肝细胞, 发现细胞内 Ca^{2+} 的大量流入, 从而发现及确定了 calpain μ 的活性化出现, 继而发现了细胞膜 bleb 的形成, 造成细胞骨骼蛋白如 talin、 α -actinin 酶系统的大量分解. 我们曾在大白鼠的动物模型中, 以 68% 肝门部常温阻血 10 min, 再灌注 5 min, 反复重复 6 次共缺血 1 h, 但未发现 calpain μ 的出现. 在人体肝脏手术中, 肝门常温阻血 12 min 也同样地未发现 calpain μ 的出现. 另外, 在肝门部常温阻血前静脉注射 prostaglandin I₂(PGI₂)的诱导体OP2507、prostaglandin E₁(PGE₁)或 prednisolone, 发现即使肝门部常温阻血 25 min, 也未发现 calpain μ 的出现.

王蒙, 沈锋, 李锡锋, 陈旭, 吴孟超. Calpain μ 与肝脏的缺血再灌注损伤. 世界华人消化杂志 2004;12(4):969-971
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/969.asp>

0 引言

在肝切除及肝移植手术中, 缺血再灌注损伤是不可避免的重要复杂问题. 众所周知, 肝脏是一个非常脆弱和容易出血的脏器. 自从 1908 年 Pringle^[1]首先报道了肝两叶安全阻血方法以来, 此方法已经逐渐引起世界各国肝脏外科界的极大重视. 预防肝脏缺血再灌注损伤, 在肝移植和肝癌合并肝硬化手术中是非常重要的. 对于肝脏外科医生来说, 如果能有安全的 1 h 全肝血流阻断时间, 安全的肝切除术便能够得到很好的实施. 这样不仅减少出血量, 而且还可以避免输血所带来的一系列不良反应, 如肝炎(不同型)、HIV 感染等. 所以对于寻找肝脏的缺血再灌注损伤的预防方法, 在肝脏外科日常手术中是至关重要的.

近年来, 对于肝脏的缺血再灌注损伤这一问题已经引起了许多研究者的极大重视, 并且做了大量的研

究工作, 但依然未解明其全貌, 对其根本原因和机制并未有一个明确的解释. 肝脏的缺血再灌注损伤所引起的细胞反应如同“水面落石”所引起涟漪现象. 我们的研究是从肝脏的缺血再灌注损伤所引起的细胞分子结构, 细胞外的 Ca^{2+} 的流入, 从而引起 Ca^{2+} 依赖性蛋白水解酶(calpain μ)的活性化的初期反应这一重要和致命过程来着手的.

1 缺血再灌注引起细胞损害机制

引起肝组织损害大体分为细胞外因素(细胞性和液性因素)和细胞内因素(细胞损害机构), 二者之间相互影响, 即使前者较显著受到影响, 后者的反应受到抑制, 所造成细胞损害也较轻微. 故从后者的细胞内损害机制来考虑肝脏的缺血损伤机制(图 1). 当缺血再灌注时引起血流中诸多的因子, platelet-activating factor (血小板活性化因子)^[2], endothelin (内皮因子)^[3], superoxide (过氧化物)^[4]等大量增加, 从而引起细胞外 Ca^{2+} 的大量流入细胞内, 细胞内 Ca^{2+} 的大量增加从而引起 Ca^{2+} 依赖性酶系统的活性化, 如: phospholipase C(磷酸脂质酶 C)^[5], calmodulin(钙调节蛋白)^[6] 依赖性 kinase 和 calpain μ ^[7] 等, 导致细胞凋亡的重要因素. 细胞膜存在的酶系统在维持细胞骨骼上起着非常重要的作用.

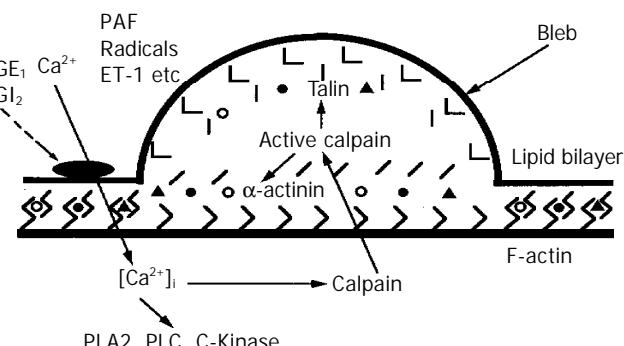


图 1 肝缺血再灌注损伤在细胞膜上的发生机制.

许多研究结果表明, 在这些酶系统中 calpain 是最敏感而又重要的枪机^[8-12]. 近来有研究者报道 calpain 存在于很多的细胞膜上^[13]. 在正常情况下, 细胞膜上的 calpain 是没有活性的. 当各种原因造成细胞环境改变时, 并且激活了 calpain 的活性时, 使其活性化. 自 1964 年由 Goll et al^[14]首先在大白鼠脑细胞中发现 calpain 的存在, 但对其作用及机制并没有明确阐述. 直到 1976 年由 Dayton et al^[15]解明了 calpain 是与 Ca^{2+} 相依赖的. calpain

的活性化必须由 Ca^{2+} 激活。由于 Ca^{2+} 所流入的量不同以及各种细胞内所含量不同，如心肌细胞和骨骼肌细胞及血小板中含量较多，故引起 calpain 可分为两种，即 μM 和 mM (图 2)。当细胞内 Ca^{2+} 的浓度(μM 水平)增加时，切断了 calpain 构造式 II 的中心 Cys^{108} 和 His^{265} 的结构，从而使 calpain 构造式 I 破裂，继而使 calpain 的活性型(80 k)被降解到活性化型(78 k)。

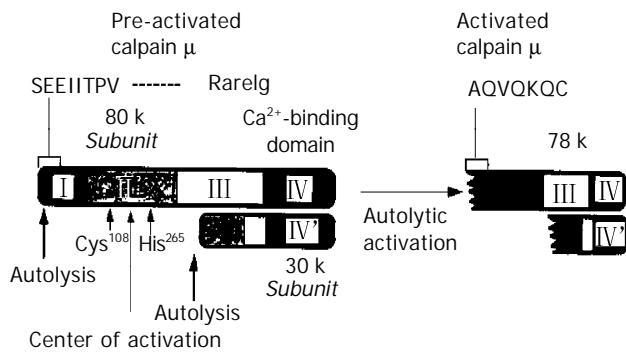


图 2 发生 calpain 活性化的机制。

当 calpain μ 活性降解后，从而引起细胞膜上的酶如 talin、 α -actinin 的分解。同时引起线粒体膜电位的改变，进而导致细胞膜的 Bleb 出现，最终导致细胞崩溃而凋亡。另外，bleb 的形成大致分为 3 个阶段(图 3)：小的 bleb，bleb 的脱落和 bleb 的崩解。bleb 的崩解可引起细胞不可逆性的损害。研究还表明，由于细胞内 Ca^{2+} 的大量增加，从而引起细胞内 ATP 减少，使其降解为 ADP-AMP，同时也使 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶活性减低，导致细胞内 Na^+ 浓度增高，从而激活细胞膜上 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白，使细胞内 Ca^{2+} 浓度增高的恶性循环。另外，ATP 大量降解使细胞内线粒体严重水肿，最终导致细胞死亡。在研究中还发现，肝脏缺血再灌注可以引起细胞的 cytokine，如 interleukin 1 β (IL-1 β) 和 tumor necrosis factor α (TNF- α) 大量产生。一方面，当 IL-1 β 的大量产生，可以使 cAMP 降解，造成细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加，使得 calpain μ 活性化，同时也使 talin 降解，导致细胞凋亡。另一方面，由于 TNF- α 的产生，刺激了 TNF 的感受器 TNF-R₁ 和 TNF-R₂，使磷脂酶活性化。1996 年 Arora 和 Gores 曾报道过当磷脂酶被活性化时，更加使得 calpain 的活性化递增，这样可以加速细胞的凋亡。

用 TBHP (tert-butyl hydroperoxide) 处理后的肝细胞使细胞内 Ca^{2+} 浓度上升，从而激活 calpain μ 的活性，发现细胞膜的 bleb 形成，同时 talin 等的细胞骨骼蛋白分解也被证实^[16]。

2 缺血再灌注的安全时间

研究者曾以 68% 大白鼠的肝温缺血 1 h 和 2 h 再灌注模型中(图 4)，在缺血前 30 min 从阴茎静脉注射 PGI₂ 的诱导体(OP-2507)或 prednisolone，来测定投入组和对照组的胆汁流量、血流量、AST 和 ALT 的值、细胞

膜的 bleb 形成、calpain μ 、talin 及 cytokine 等，发现投入组与对照组间有明显差异。所以，在肝缺血前，静脉注射 PGI₂ 或 prednisolone 等，对肝脏功能的保护起着非常重要的作用，尤其是对长期肝硬化及肝硬化较重的患者来讲，更是十分重要的^[17]。

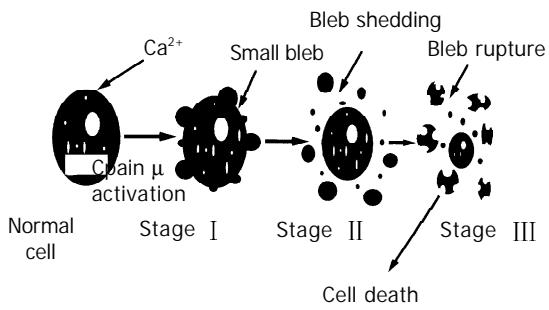


图 3 Bleb 形成的过程、分解、凋亡。

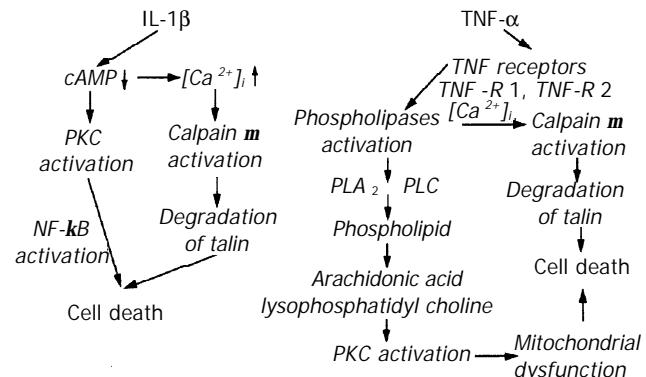


图 4 肝缺血再灌注损伤起 cytokin 产生导致细胞死亡的径路。

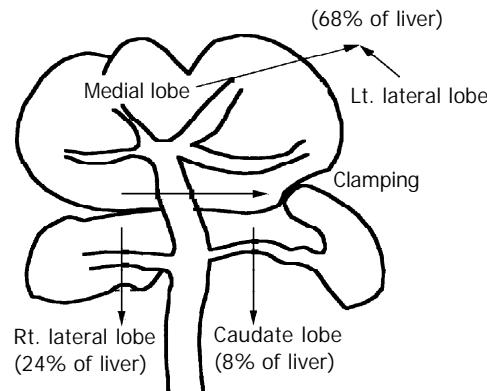


图 5 68% 大白鼠的肝缺血模型。

研究者以 68% 间歇性肝温缺血 1 h 和再灌注 2 h (图 5)分为 3 个组：1 组是缺血 10 min，间歇 5 min，连续 6 次共缺血 1 h 后再灌注 2 h；2 组是缺血 15 min，间歇 5 min，连续 4 次共缺血 1 h 后再灌注 2 h；3 组是缺血 20 min，间歇 5 min，连续 3 次，共缺血 1 h 后再灌注 2 h。以能否引起肝细胞膜的 bleb 的形成，能否引起 calpain 的活性化，同时能否引起 talin 的分解。对 ATP 及 energy charge 进行测试，发现在间歇性缺血 1 h 后的第 3 组和 2 h 后再灌注的第 2 组和第 3 组均发现 calpain μ 和 talin 的表

达, 同时在电子及光学显微镜下发现 bleb 的形成。研究者还测得了第 3 组在再灌注 2 h 后 ATP 及能量降解, 同时在电子显微镜下观察到了线粒体水肿及膨大。

总之, 间歇性的肝温缺血 10 min, 再灌注 5 min 的连续操作的方法对于肝脏手术较为安全。在肝脏外科手术中尤其是肝癌伴有活动性肝炎(乙型或丙型)来说, 术后能否引起肝功能衰竭是至关重要的原则。我们绝对不能轻视这一点。如果不注意不重视这一个环节, 将给肝脏手术后因肝功能衰竭带来危及患者的生命。

3 静脉注射 prostaglandin E₁(PGE₁)

研究者已经确立了 PGI₂、PGE₁ 和 prednisolone 对肝温缺血再灌注损伤的保护作用。在肝脏外科及肝移植手术中, 缺血再灌注损伤是不可避免的。那么如何来抑制缺血再灌注所带来的肝脏损害, 能否较安全的延长缺血时间, 是研究中一直关注的问题。

在肝切除手术中, 研究者曾以上述同样的方法进行了 12 min 的肝门部常温阻血, 发现肝活检中 calpain μ 没有表达。研究者还发现在肝门阻血前投入 PGE₁, 缺血时间延长到 20~25 min, 其肝组织活检中 calpain μ 也未被发现。由此可见, 肝温阻血前投入 PGE₁ 后, 25 min 的肝温阻血是较为安全的时间。

近年来, 许多同行界对肝缺血再灌注损伤问题有种种看法, 尤其是对肝门部常温阻血时间纷说不一。更重要的是对肝硬化较重的同时伴有活动性肝炎的肝癌患者, 到底在肝切除后能否引起肝功能衰竭, 行多长时间的肝门部阻血较为安全, 至今没有一个明确的报道。我们从细胞膜及膜上酶系统的着眼, 较精确的科学的研究其损伤机制的全部过程, 并得到了肝安全温缺血的时间以及抑制肝温缺血再灌注损伤的方法。

4 参考文献

- 1 Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908;48:541-549
- 2 Wang KS, Monden M, Kanai T, Gotoh M, Umeshita K, Ukei T, Mori T. Protective effect of platelet-activating factor antagonist on ischemia-induced liver injury in rats. *Surgery* 1993; 113:76-83
- 3 Kobayashi J, Takeyosi T, Ohwada S, Iwanam K, Matsumoto K, Muramoto M, Morishita Y. The effects of FR167653 in extended liver resection with ischemia in dogs. *Hepatology* 1998;28:459-465
- 4 Nakano H, Monden M, Umeshita K, Murata M, Miyoshi H, Kanai T, Gotoh M. Cytoprotective effect of prostaglandin I₂ analogues on superoxide-induced hepatocyte injury. *Surgery* 1994;116:883-889
- 5 Aderem A. Signal transduction and the actin cytoskeleton: The roles of MARCKS and profiling. *Trends Biochem Sci* 1992;17:438
- 6 Nairn AC, Picciotto MR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Semin Cancer Biol* 1994;5:295-303
- 7 Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, Imajoh-Ohmi S, Fujitani K, Gotoh M, Oiki E, Kambayashi J, Monden M. Calpain is activated in hepatocyte mitochondrion during ischemia-reperfusion injury. *Hepatol Res* 1998;10:255-259
- 8 Beckerle MC, O'Halloran T, Burridge K. Demonstration of a relationship between talin and P235, a major substrate of the calcium-dependent protease in platelets. *J Cell Biochem* 1986; 30:259-270
- 9 Fox JEB, Goll DE, Reynolds CC, Phillips DR. Identification of two proteins (actin-binding protein and P235) that are hydrolyzed by endogenous Ca²⁺-dependent protease during platelet aggregation. *J Biol Chem* 1985;260:1060-1066
- 10 Chen JJ. Anti-inflammatory steroid action, basic and clinical aspects. In: Schleimer RP, Claman HN, Oronsky AL, eds. San Diego Acad Press 1989:111-131
- 11 Wang M, Sakon M, Miyoshi H, Umeshita K, Kishimoto S, Taniguchi K, Gotoh M, Imajoh-Ohmi S, Monden M. Prostacyclin Analog-suppressed ischemia-reperfusion injury of the rat liver: evaluation by calpain μ activation. *J Surg Res* 1997;73:101-106
- 12 Wang M, Sakon M, Umeshita K, Miyoshi H, Taniguchi K, Kishimoto S, Imajoh-Ohmi S, Monden M. Determination of a safe vascular clamping method for liver surgery. *Arch Surg* 1998;133:983-987
- 13 Aufan N, Didonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immuno-suppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 1995;270: 286-290
- 14 Goll DE, Kleese WC, Okitani A, Kumamoto. Historical background and current status of the Ca²⁺-dependent proteinase system. In: Mellgren RL, Murachi T, eds Calcium dependent proteolysis in mammalian cells. Boca Raton: CPC Press 1990: 3-24
- 15 Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Rebson RM, Reville WJ. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 1976;15:2150-2158
- 16 Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, Imajoh-Ohmi S, Fujitani K, Gotoh M, Oiki E, Kambayashi JI, Monden M. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tertbutyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 1996; 110:1897-1904
- 17 Wang M, Sakon M, Umeshita K, Okuyama O, Shiozaki K, Nagano H, Dohno K, Nakamori S, Monden M. Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain μ activation. *J Hepatol* 2001;34:278-283

抑制性消减杂交技术及其在感染病学中的应用

王 方, 王宇明

王方, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院感染病研究所 重庆市 400038
国家自然科学基金资助课题, No. 30170847
项目负责人: 王方, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院感染病研究所. kaixin919@163.com
电话: 023-68754289 传真: 023-65334998
收稿日期: 2003-08-30 接受日期: 2003-12-06

摘要

抑制性消减杂交技术(Suppressive subtractive hybridization, SSH)是近年来兴起的一种检测差异表达基因的方法, 广泛用于寻找疾病及肿瘤相关基因、生长和发育相关基因、药物的筛选和靶向治疗及其明确基因的功能等。本文从SSH技术的原理、效率、存在的问题和展望及其在感染病学中的应用等方面进行了综述。

王方, 王宇明. 抑制性消减杂交技术及其在感染病学中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(4):972-975

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/972.asp>

0 引言

新近人类基因组计划(human genome project, HGP)顺利完成, 通过对人类基因组结构的了解, 建立了较为系统的庞大数据库; 其他物种的基因组结构亦在不断地阐明与完善。然而, HGP 的完成仅仅是阐明人类众多基因的基础和必经之路。基因是细胞的遗传物质, 决定细胞的生物学性状。细胞的生物学功能最终是由大量的基因表达产物即蛋白质来完成的。基因表达是一个复杂而精细的网络调控过程, 细胞的生物学事件是在某一特定的时间与空间里, 多种基因表达及其相互调控的结果。明确细胞在生理与病理条件下的基因表达及其调控过程, 将对细胞的生理与病理状态的干预提供极大的帮助。高等真核生物约含有 10 万个不同基因, 但在生物体的发育过程中只有 15% 的基因得以表达, 而这大约 15 000 个基因的表达是按时间和空间顺序有序地进行着, 这种表达方式即为基因的差别表达(differential expression)。而分子生物学的首要任务之一便是要比较不同细胞或不同基因型在基因表达上的差异, 这不仅是研究生命过程分子机制的基础, 亦是分离克隆目的基因的前提。为了更有效地发现差异表达基因, 近年来发展了一系列方法, 包括差异显示PCR (differential display PCR, DD-PCR)、RNA 指纹技术(RNA fingerprinting)、抑制性消减杂交技术(suppressive subtractive hybridization, SSH)、基因系列表达分析(sequence analyses of gene expression, SAGE)、Real-time Quantitative PCR (TaqMan)、DNA 微

阵列(DNA microarray, 或 gene chip)等。尽管每一种方法均有各自的优缺点, 但总的来说筛选差异表达基因的方法已从既费时又费力的方法, 如聚丙酰胺凝胶为基础的差异显示发展到自动高通量检测方法, 如 DNA 微阵列, 但微阵列只能检测已知基因, 不能发现未知基因。消减杂交(subtractive hybridization, SH)是一种富集差异表达基因的有效方法, 这种方法最初是 60 年代中期由 Bautz 和 Reilly 使用, 用于纯化噬菌体 T4 mRNA^[1], 这种单纯杂交方法有一定的限制, 因为需要大量的 mRNA 进行杂交, 杂交后微量的 cDNA 进行克隆亦较困难。这种方法被 Duguid 和 Dinauer 进一步优化, 在 cDNA 后加接头, 可以进行选择性 PCR 扩增^[2]。Diatchenko 和 Gurskaya et al^[3-4]又进一步改进了抑制性杂交 PCR 技术, 即 SSH 方法, 经过几轮循环可以将差异表达基因扩增 1 000 倍。

1 SSH 技术的原理和方法^[3-4]

SSH 是抑制性 PCR 与消减杂交技术相结合的更简单、更快速的分离差异基因的方法。该方法运用了杂交二级动力学原理, 即丰度高的单链 DNA 在退火时产生同源杂交的速度快于丰度低的单链 DNA, 从而使原来在丰度上有差别的单链DNA相对含量达到基本一致。而抑制 PCR 则是利用链内退火优于链间退火的特点, 使非目的序列片段两端反向重复序列在退火时产生类似发卡的互补结构, 无法作为模板与引物配对, 从而选择性抑制非目的基因片段的扩增。这样既利用了消减杂交技术的消减富集, 又利用了抑制性 PCR 技术进行了高效率的动力学富集。具体操作流程见图 1。

第 1 步: SSH 技术首先将由 mRNA 逆转录来的检测子 cDNA(Tester)和驱动子 cDNA(Driver)分别用同一种识别四碱基序列的限制性内切酶 Rsa I 消化形成平均长度大于 500 bp 的 cDNA 片段, 这样可增加有差别表达基因检出的可能性, 以防止长链片段形成的复杂结构对消减杂交的干扰。

第 2 步: 连接接头(Adapter)。将 Tester cDNA 均分为两份, 分别接上接头 Adaptor 1 和 Adaptor2。Adaptor 设计十分巧妙, 由一长链(40 nt)和一短链(10 nt)组成的一端是平端的双链 DNA 片段, 且双链 5' 端均无磷酸化基团, 保证了 Adaptor 以惟一方向与 cDNA 片段连接。接头外侧序列与第 1 次 PCR 引物序列相同, 而内侧序列则与第 2 次 PCR(巢式 PCR)引物序列相同, 有利于后续 PCR 的筛选扩增。此外接头上含有 T 7 启动子序列及内

切酶识别位点, 为以后克隆和测序提供方便.

第3步: 两轮消减杂交. 用过量 Driver cDNA 样品与上述两份连有接头的 Tester cDNA 样品进行第1次消减杂交, 分别得到4种产物. 这种不充分杂交使得单链 cDNA 分子在浓度上基本相同. 同时由于 Tester cDNA 与 Driver cDNA 序列中相同片段大都形成异源双链分子 c, 使得 Tester cDNA 中差异表达基因得到第一次富集; 然后混合上述两份杂交样品, 同时加入新的变性 Driver cDNA 进行第2次消减杂交. 此次杂交只有第1次杂交后经扣除和丰度均等化的单链 Tester cDNA 能与 Driver cDNA 形成双链分子. 这一次杂交进一步富集了差异表达的 cDNA, 并且还形成了2个5'端分别接不同接头的双链分子 e.

第4步: 两次 PCR 反应. 5'端填平末端, 加入根据接头设计的引物进行两次 PCR. 第1次 PCR 基于抑制反应, 只有两端连接有2个不同接头的双链 cDNA 片段(如 e)才能得到指数扩增. 第2次 PCR 实际上是巢式 PCR, 极大地提高了扩增特异性, 使差异表达的目的基因片段得到大量富集. 然后利用接头上存在的酶切位点, 插入适当载体, 转化细菌, 初步筛选出具有插入的克隆, 再经杂交筛选出具有差异表达的克隆, 进行测序、同源分析等系列工作, 最后完成全长基因的克隆、鉴定.

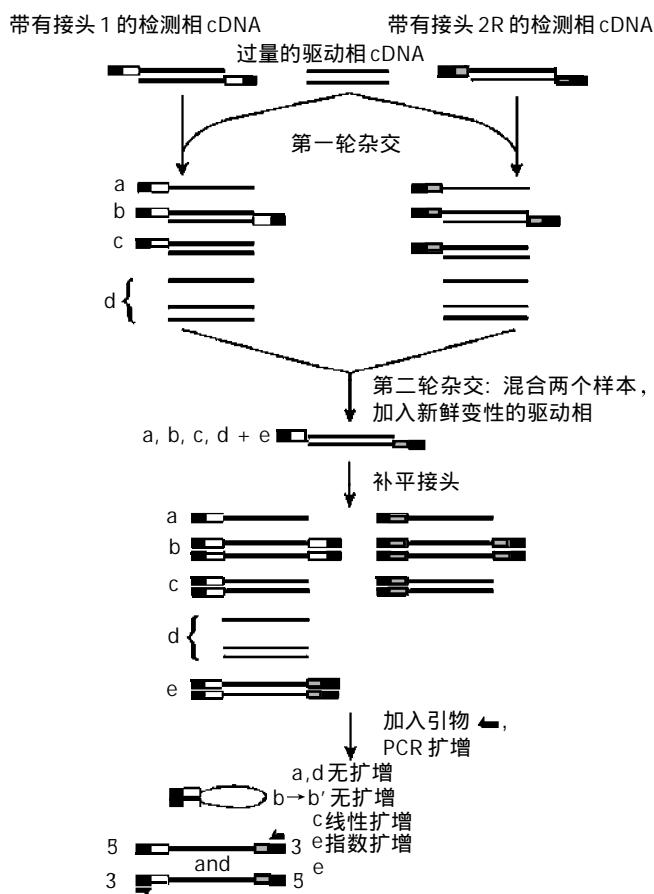


图1 SSH流程示意图.

2 SSH技术效率分析

对于一个理想的消减系统, 不管目的基因丰度如何,

均能产生有效富集, 且在耗时进行筛选之前, 就能鉴定消减效率, 以最大限度地降低假阳性. 那么, SSH 技术的消减效率究竟如何呢? 为了进一步指导 SSH 技术的应用, Ji et al^[5]首次用数学模型和实验模型全面研究了其实际的效率和局限性.

Ji et al 根据杂交二级动力学原理推算出的数学模型表明, 影响 SSH 效率的一个主要因素是靶基因的浓度和其在 Tester 和 Driver 中的比例 R, 浓度越高, 比例越大, SSH 富集的效率越高; 靶基因富集的效率和 R^3 成正比. 实验模型用来进一步证实理论模型的结论.

在实验模型中, 首先检测 SSH 富集存在于 Tester 而不存在于 Driver 中的靶基因的效率. 将 fx174 DNA 和成纤维细胞(Fibroblast)cDNA 混合后作为 Tester, Fibroblast cDNA 作为 Driver, fx174 DNA 为靶基因. 结果当 fx174 DNA 的含量大于总 Tester 的 0.01% 时, 凝胶电泳可以看到清晰的 fx174 DNA 条带; 当 fx174 DNA 含量在总 Tester 的 0.1-1% 之间时, 凝胶电泳看到 fx174 DNA 条带的清晰度同前, 说明 SSH PCR 富集 fx174 DNA 的效率同前; 而当 fx174 DNA 含量小于总 Tester 的 0.01% 时, 凝胶电泳看不到清晰的 fx174 DNA 条带, 这和理论模型不太一致, 此时富集的不是靶基因 fx174 DNA, 而是随机扩增的 Fibroblast cDNA 片段, 原因可能是当 Tester 中 fx174 DNA 含量低于 0.01% 时, 在第二次杂交时 2 条链不能有效退火, 而在后续的 PCR 扩增中双链 cDNA 是必需的. 进一步检测在 Tester 和 Driver 中均存在但丰度不同的靶基因被富集的效率. Tester 中含固定的 1% 的靶基因 fx174 DNA, 而 Driver 中所含靶基因 fx174 DNA 的浓度依次从 0% 递减到 0.1%. 结果发现当 Tester 中靶基因的含量比 Driver 中高 5 倍以上时, 凝胶电泳可以看到清晰的靶基因条带, 当 Tester 中的靶基因含量低于 Driver 中的 5 倍时, 则看不到靶基因条带; 再进一步改变靶基因在 Tester 和 Driver 中的浓度比例和丰度: Tester cDNA 中含 0.1% fx174 DNA, 而 Driver cDNA 中 fx174 DNA 的浓度依次从 0.1% 到 0, 结果和前一次相同, 有效的靶基因富集主要取决于靶基因在 Tester 和 Driver 中的浓度比, 而和靶基因的绝对含量没有关系, 即当 Tester 中 fx174 DNA 浓度大于 Driver 中的 5 倍时, 则靶基因得到有效富集.

该实验模型结果对于有效地应用 SSH 技术和合理解释 SSH PCR 的实验结果很有意义. 要获得有效的靶基因富集, 对于只存在于 Tester 中的靶基因而言, 靶基因至少应占 Tester 的 0.01%, 对于表达丰度不同的基因, 靶基因在 Tester 中的浓度应大于 Driver 中的 5 倍. 实际的 PCR 扩增效率也可能影响到 SSH PCR 的效率, 但为了简化模型, 没有在模型中考虑.

3 SSH 技术在感染病学领域中的应用

3.1 研究细菌毒力相关基因 SSH 技术可以研究细菌病原体的致病株和非致病株或弱致病株之间的基因序列

差异。这种基因序列差异可能和细菌的毒力岛(pathogenicity islands, PIs)有关。PIs是存在于致病株的基因序列，和细菌的致病性有关。PIs具有一些共同的结构特征，包括非典型的鸟嘌呤加胞嘧啶的含量百分比，侧翼区存在重复或插入序列等结构特征^[6]。

SSH技术最初由Akopyants et al^[7]应用于研究幽门螺杆菌致病株的致病基因，后来相继应用于大肠杆菌^[8]、亲水气单胞菌^[9]、B. pseudomallei 菌^[10]、肺炎杆菌的致病株毒力相关基因^[11]。Janke et al^[8]用SSH技术检测致病性大肠埃希氏杆菌株536和非致病株K-12株MG1655之间的差异表达基因，发现有22个毒力株536特异性差异表达基因，其中5个和已知毒力决定簇具有同源性，可能代表部分毒力岛基因。Reckseidler et al^[10]用SSH技术检测毒力株B. pseudomallei 和无毒株B. thailandensis 之间的差异表达基因，结果发现了B. pseudomallei 株编码荚膜多糖的糖基转移酶基因，当糖基转移酶基因被失活以后，在动物模型中B. pseudomallei 株和B. thailandensis 株的LD50值相似，说明这个糖基转移酶基因和荚膜的产生对细菌毒力很重要。Reckseidler还发现用SSH技术鉴定的消减克隆基因组具有非典型的鸟嘌呤加胞嘧啶含量百分比，而此非典型特征是PIs岛的一个特征，表明该方法对于检测细菌毒力株的特异序列十分有效。最近，Han et al^[12]用SSH技术发现从胃溃疡患者和非溃疡患者分离出的幽门螺杆菌株的基因序列存在一些特异的差别，这些差别和菌株的致病性有关。

3.2 研究病原体感染后的应答基因 徐晓春 et al^[13]将被约氏疟原虫感染的斯氏按蚊作检测子，未被感染的斯氏按蚊作驱动子，二者之间做SSH，寻找与约氏疟原虫感染相关的应答基因。表达上调的24个克隆中，12个为功能已知基因，4个为功能未知基因，7个为新基因，其中有9个基因与经过细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理的免疫细胞来源的基因序列具有同源性，表明在疟原虫感染斯氏按蚊过程中涉及多种生物化学过程，尤其与免疫系统和能量代谢有关。Patzwahl et al^[14]用SSH技术分离出相同程度病理改变的HCV感染肝组织和非病毒性肝脏疾病肝组织之间的差异应答基因，分别是 γ -干扰素(γ -IFN)诱导的化学趋化因子基因、干扰素诱导蛋白10(IP-10)基因、 α/β -IFN诱导的抗病毒MxA基因、 α/β -IFN诱导的p44基因、 $\alpha/\beta/\gamma$ -IFN诱导的IFI-56K基因，同非病毒感染引起的肝脏疾病相比，这些基因的表达增高50倍。Riemer et al^[15]用同样的方法检测瘙痒病感染后脑组织应答基因，发现有19个基因表达上调，其中有相当一部分基因的表达可以被IFN诱导，如IP-10、2'、5' - 穷核苷酸合成酶、Mx蛋白、IIGP蛋白、HLA-I和II、补体、 β -微球蛋白等，表明干扰素反应在瘙痒病的发病机制中起重要作用。

3.3 研究与病原体发育阶段相关的基因 了解病原体在不同发育期的差异表达基因对于了解病原体的生理发育和致病机制具有重要意义。Dessens et al^[16]用SSH技术

成功扩增了疟原虫子孢子在蚊子中肠期的差异表达基因。将存在于蚊子中肠期的虐原虫P. berghei ANKA 克隆234作检测子，血液中无性阶段的非配子体克隆233作驱动子，经过筛选和鉴定发现4个差异表达基因；而Matuschewski et al^[17]则发现有30个基因在唾液腺子孢子内上调表达，其中一个基因编码蛋白激酶，这些基因编码的产物可能与疟原虫在肝细胞内感染和发育有关。Bellatin et al^[18]用同样的方法发现2个基因显著表达于利什曼原虫无鞭毛体阶段：新基因A600和 β 微管蛋白基因，Northern印迹法检测到这2个基因的表达升高6倍。序列分析表明A600包含1个293 bp的开放读码框架，编码一个膜蛋白或一个分泌蛋白，可能对于无鞭毛体的分化或在吞噬溶酶体内的生存起重要作用。

3.4 研究病毒基因在肿瘤发生中的作用 刘妍 et al^[19]用SSH技术在转染HBX的pcDNA3.1(-)-X载体和空载体pcDNA3.1(-)之间寻找HBX转染相关基因。结果共有85个阳性克隆，将其中的65个克隆进行序列分析，有19个功能已知基因和15个功能未知基因，正在进一步研究其功能。刘杰 et al^[20]在转染编码HBxAg基因的重组逆转录病毒载体的HepG2 x 细胞和转染空载体的HepG2Cat细胞之间做SSH，克隆和HBxAg有关的全长基因片段，用原位杂交和Northern印迹进行差异筛选，用RACE PCR 扩增全长，结果发现一个C2基因的表达在HepG2 x 细胞被抑制，其全长为1.35 kb，编码一个含113个氨基酸的小蛋白。将C2基因导入HepG2细胞可以抑制细胞的生长，在裸鼠可以抑制肿瘤的生长。C2基因也表达于正常肝脏，但肝癌组织中无表达。结果表明HBx可以通过调节基因表达而促进或抑制细胞生长。

4 SSH存在的问题和展望

SSH综合了DD PCR 和 RDA 两种技术的特点，因此具备两项技术各自的优点且相应地改进了各自的缺点。Liu et al^[21]用DNA阵列、SSH、DD-PCR 3种方法寻找用全反式维甲酸作用于急性早幼粒细胞白血病NB4细胞系的差异表达基因。用588个已知基因构成的DNA阵列中，99个基因的信号强度大于2倍，37个表达上调，62个表达下调；用DD-PCR法检测到的30个克隆经Northern杂交分析只有13个代表差异应答基因；用SSH方法得到703个克隆，代表316个基因，其中278个表达上调，38个表达下调；159个是已知基因，132个是新序列片断。经逆向Northern印迹和半定量RT-PCR筛选，159个已知基因中63个差异表达，132个新基因中，49个差异表达。用3种不同的方法，共检测出169个差异应答基因，100个上调，69个下调，结果是可信的。如RIG-E, RIG-G和细胞色素P450基因用DD-PCR和SSH检测结果一致，有16个基因，如MCP、IL-8、Src样蛋白和Bfl-1等用cDNA阵列和SSH均得到证实。3种方法中，cDNA阵列仅含588个已知基因，范围有限，而DD-PCR仅得到部分差异表达基因，只有SSH比较全面地

检测了差异表达基因.

SSH 也存在一些缺点和不足. 既往人们普遍认为用 SSH 寻找差异表达基因时, Tester 和 Driver 之间的背景要尽可能相同, 如同一个体的病变和正常组织间, 同一组织的不同发育或治疗时期, 但我们从 Ji et al^[5]的试验模型和理论模型可以看出, SSH 检测低丰度表达的靶基因的能力是有限的. 要获得有效的靶基因富集, 对于只表达于 Tester 的基因, 靶基因含量至少应占 Tester 的 0.01%, 对于表达丰度不同的基因, Tester 中靶基因浓度应大于 Driver 的 5 倍. 所以 Ji et al 认为 SSH 方法主要用于富集高度差异表达的基因, 如病毒感染前后或 2 种不同组织中的差异表达基因谱; 而同一组织患病前后或同一组织的不同发育或治疗时期, 基因表达的变化可能和生理学变化有关, 丰度较低, 用 SSH PCR 不能有效富集, 用其他方法筛选大量 SSH PCR 文库既费时又费力. Li et al^[22]用鼠血脑屏障的毛细血管与鼠的肝和肾之间做 SSH 寻找与血脑屏障有关的特异表达基因, 以期从分子水平阐明脑血管病变的机制及发现促进药物通过血脑屏障的新靶标, 就是一个用 SSH 在不同的组织间寻找差异表达基因的典范; 而 Nagayama et al 用 SSH 在正常个体和患病个体间成功地寻找到与自身免疫性肝炎发病相关的基因 IP-10. Patzwahl et al^[14]用 SSH 在不同病因引起的病理改变基本相同的不同个体间成功地发现了与慢性 HCV 感染有关的应答基因.

除此之外, SSH 还存在一些其他缺点和不足, 如对起始材料相对要求较多, 不适于来源困难的样品, 且若用 c DNA 做 SSH 则需来源样品保持新鲜以防 RNA 降解造成信息丢失; 非酶切位点区域内的点突变, 小缺失或插入均不能有效被发现; 得到的片段尚需扩增其全长; 筛选过程较繁杂. 在实际应用中, 选择合适的内切酶消化是关键, 提高接头与片段的连接效率则是整个筛选过程有效性的保证, 选择高效的筛选方法可以提高靶基因的检出率; 用不同方法相互结合可以取长补短, 提高差异应答基因的检出率. 如 Nishizuka et al 先后用 DD-PCR 及 SSH 检测非致瘤性和致瘤性 HeLa x 纤维母细胞 CGL1 和 CGL3 细胞株间的差异应答基因, 用 SSH 筛选出了用 DD 法未筛选出的 p16 基因, 但用 DD-PCR 和 SSH 技术均未发现的 IAP 基因, 却用寡核苷酸微阵列检出了.

随着人类基因组计划和微生物全基因组测序的逐渐完成及基因芯片技术的成熟, SSH 与微阵列结合将促进差异基因的大规模快速筛选, 而且筛选到的特异序列可与相应的基因序列库中 EST 进行同源比较或通过计算机分析查找到基因的全序列, 进而推测、鉴定基因表达蛋白的功能, 进一步把基因克隆的研究推向基因功能的研究.

5 参考文献

- 1 Bautz EK, Reilly E. Gene-specific messenger RNA: isolation by the deletion method. *Science* 1966;151:328-330
- 2 Duguid JR, Dinauer MC. Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res* 1990;18:2789-2792
- 3 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6025-6030
- 4 Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED. Equalising cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 1996;240:90-97
- 5 Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* 2002;3:12
- 6 Winstanley C. Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J Med Microbiol* 2002;51:459-467
- 7 Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L, Hill JE, Siebert PD, Lukyanov SA, Sverdlov ED, Berg DE. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 13108-13113
- 8 Janke B, Dobrindt U, Hacker J, Blum-Oehler G. A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655. *FEMS Microbiol Lett* 2001;199:61-66
- 9 Zhang YL, Ong CT, Leung KY. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* 2000;146 (Pt 4): 999-1009
- 10 Reckseidler SL, DeShazer D, Sokol PA, Woods DE. Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. *Infect Immun* 2001;69:34-44
- 11 Lai YC, Yang SL, Peng HL, Chang HY. Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 2000;68:7149-715
- 12 Han FC, Gong M, Ng HC, Ho B. Identification of *H pylori* strain specific DNA sequences between two clinical isolates from NUD and gastric ulcer by SSH. *World J Gastroenterol* 2003;9: 1747-1751
- 13 徐晓春, 翟逢伊, 宋关鸿. 蚊媒感染疟原虫后应答性表达增高基因的富集和筛选. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 2001;19:325-329
- 14 Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, Mihm S. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *J Virol* 2001;75:1332-1338
- 15 Riemer C, Queck I, Simon D, Kurth R, Baier M. Identification of upregulated genes in scrapie-infected brain tissue. *J Virol* 2000; 74:10245-10248
- 16 Dessens JT, Margos G, Rodriguez MC, Sinden RE. Identification of differentially regulated genes of *Plasmodium* by suppression subtractive hybridization. *Parasitol Today* 2000;16:354-356
- 17 Matuschewski K, Ross J, Brown SM, Kaiser K, Nussenzweig V, Kappe SH. Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. *J Biol Chem* 2002;277:41948-41953
- 18 Bellatin JA, Murray AS, Zhao M, McMaster WR. *Leishmania mexicana*: identification of genes that are preferentially expressed in amastigotes. *Exp Parasitol* 2002;100:44-53
- 19 刘妍, 成军, 陆萌英, 王刚, 章劲松, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因克隆化的研究. 中华肝脏病杂志 2003; 11:5-7
- 20 刘杰, 连兆瑞, 潘静波. 乙型肝炎病毒 X 抗原转导细胞差示表达全长基因 C2 的克隆及初步功能研究. 中华医学杂志 2000;80: 456-460
- 21 Liu TX, Zhang JW, Tao J, Zhang RB, Zhang QH, Zhao CJ, Tong JH, Lanotte M, Waxman S, Chen SJ, Mao M, Hu GX, Zhu L, Chen Z. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 2000;96:1496-1504
- 22 Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. Blood-brain barrier genomics. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:61-68

• 文献综述 •

评价幽门螺杆菌根除治疗效果的检查方法和时机选择

苏 菁, 孙为豪

苏菁, 孙为豪, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
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, 210009, 江苏省南京市, 东南大学附属中大医院消化
科. weihaojun@hotmail.com
电话: 025-83272034 传真: 025-83272011
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2003-12-16

摘要

幽门螺杆菌(Hp)根除治疗后, 因细菌数量减少和尿素酶活性受抑制或其他产尿素酶的细菌过度生长, 常导致多种Hp检测方法出现假阴性或假阳性, 影响对 Hp 根除治疗效果的评价. 本文对根除治疗后Hp检查方法和时机的选择加以综述, Hp 根除治疗后 6 mo, 尿素酶依赖性试验(RUT 或¹³C-UBT)评价根除治疗效果准确性高, 粪便 Hp 抗原(Hp SA)试验在根除治疗后 6 mo 仍有一定的假阳性, 准确性不如尿素酶依赖性试验.

苏菁, 孙为豪. 评价幽门螺杆菌根除治疗效果的检查方法和时机选择. 世界华人消化杂志 2004;12(4):976-978

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/976.asp>

0 引言

自 1983 年 Warren 和 Marshall 从胃黏膜活检标本中成功地分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)以来, 大量研究结果证明, Hp 是慢性活动性胃炎和消化性溃疡的主要病因, 长期感染可导致胃黏膜萎缩、肠上皮化生及异型增生, 是胃黏膜相关淋巴样组织(mucosa associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤和胃癌发生的高危因素. 诊断 Hp 感染的检查方法有很多, 大致分为利用胃镜钳取胃黏膜组织的侵入性检查和不需要胃镜检查的非侵入性检查两大类. 前者包括快速尿素酶试验(rapid urease test, RUT)、病理组织学检查、Hp 培养、聚合酶链反应(PCR)技术和胃内指示药喷洒染色法. 后者包括血清 Hp 抗体测定、同位素标记尿素呼气试验(urea breath test, UBT)和粪便 Hp 抗原(*Helicobacter pylori*-specific antigens in the stool, Hp SA)试验.

Hp 感染的根除(eradication)治疗, 是指抗 Hp 治疗停药至少 4 wk 以后复查 Hp 阴性, 即 Hp 消失, 也称 Hp 感染治愈, 停药后不易复发. 及时有效地根除 Hp 可促进溃疡愈合减少复发^[1], 在一定程度上阻止慢性胃炎发生萎缩、肠化及阻断已形成的萎缩、肠化的进一步发展^[2], 对低度恶性 MALT 淋巴瘤的疗效已被临床证实^[3]. 精确的检查方法是评价 Hp 根除治疗效果的关键, 常用的 Hp 检查方法在用于未治疗人群时, 其敏感性和

特异性都非常高; 但用于已经进行抗菌药物治疗的患者时, 由于细菌数目急剧减少, 其敏感性会相应下降, 导致假阴性. 本文对近年来国内外有关评价 Hp 根除治疗效果的研究进展加以综述.

1 RUT

RUT 的基础在于 Hp 具有极强的尿素酶活性, 水解尿素而产生氨和二氧化碳, 氨引起 pH 值增高, 从而使 pH 指示剂改变颜色. RUT 因其简便、可靠和快速提供实验结果, 是侵入性检查中诊断 Hp 感染的首选方法, 文献报道 RUT 诊断 Hp 感染的敏感性为 89-96.3%, 特异性达 97.9-100%^[4-5]. 活检标本的尿素酶活性主要与感染的 Hp 数量有关, 细菌数量过少或尿素酶活性受到抑制都可能导致 RUT 假阴性. 以 Hp 培养为标准, 当活检组织中细菌量大于 10⁵ 菌落形成单位(colony forming unit, CFU)时, RUT 的阳性率为 100%, 当细菌量在 10³-10⁴ CFU 时, RUT 的阳性率降低, 如果细菌量在 10³ CFU 以下则 RUT 阴性^[6]. 未经治疗的 Hp 感染者每块活检标本中细菌量可达 10⁶ CFU, 故 RUT 阳性反应强烈, 敏感性高. 抗 Hp 治疗后因细菌量减少或尿素酶活性降低, 假阴性增加. 因此, 传统的观念认为在评价 Hp 根除效果时不宜单独使用 RUT.

使用质子泵抑制剂(PPI)和抗生素治疗 Hp 感染, 可导致 Hp 重新分布到胃的近端. 因此, Hp 根除治疗后复查, 应取胃窦及胃体部多个活检组织进行 RUT. 近年来研究发现, 根除治疗后 RUT 检测 Hp 的敏感性降低^[4, 7]. Nakshabendi et al^[8]研究结果显示, 十二指肠溃疡患者口服奥美拉唑 20 mg, 2 次/d, 连续 8 wk, 不但明显减少胃窦部 Hp 菌量, 而且显著抑制 Hp 尿素酶活性. 可能是 Hp 在生存环境不利时发生形态变异, 常由 S 型缩卷成球形, 其尿素酶活性减低. 但在停药后 3-6 mo 又可恢复其典型形态, 尿素酶活性恢复. 丹麦学者 Rune^[9]提出如果使用 RUT 评价 Hp 根除效果, 应在抗 Hp 治疗停药后 6-12 mo 进行, 以避免假阴性结果的出现. 日本学者 Murata et al^[10]以细菌培养和组织切片 HE 染色为“金标准”, 探讨 RUT 评价 Hp 根除效果的准确性. 结果显示根除治疗后 RUT 检测 Hp 的敏感性和特异性分别为 58.8% 和 97.8%. 然而, 如果抗 Hp 治疗停药 4 mo 以上复查, RUT 的敏感性和特异性均达 100%. 但是, 该研究病例数偏少, 4 mo 以内复查者 47 例, 4 mo 以上复查者只有 16 例. 我们对 127 例 Hp 根除治疗后复查的研究结果表明, 以细菌培养和组织切片改良 Giemsa 染色

为“金标准”，RUT 检测 Hp 的敏感性只有 64.3%。根除治疗停药后 1 mo RUT 敏感性 55.6%，准确性 84.4%；停药后 2 mo RUT 敏感性 42.9%，准确性 86.7%。然而，如果在完成 Hp 根除治疗后 6 mo 以上复查，RUT 检测 Hp 结果则与“金标准”完全一致^[11]。因此，在 Hp 根除治疗后 6 mo 以上复查，RUT 可以正确判断 Hp 根除效果。对于 Hp 根除治疗后临床上有上消化道出血、消瘦和体重减轻等“报警”症状的患者，胃镜检查必要的情况下，选择合适的时机(6 mo 以上)，RUT 可作为评价 Hp 根除效果的首选方法。

2 UBT

UBT 的原理是利用 Hp 产生的尿素酶水解同位素¹³C 或¹⁴C 标记的尿素，生成¹³CO₂ 或¹⁴CO₂ 后弥散入血，经肺呼出体外。¹³C 是存在于自然界的稳定的非放射性同位素，其优点是对人体无害，适用于任何人(包括孕妇和儿童)；但缺点是¹³C-UBT 需用质谱仪分析，费用高，一般医院尚未普及应用。¹⁴C-UBT 具有一定放射性，不适于孕妇及儿童，且半衰期长可污染环境。UBT 由于无创无痛、操作简便和安全可靠，具有较高的敏感性和特异性，可以反映全胃 Hp 感染状况而避免了活检误差。UBT 是目前评价 Hp 是否根除的最佳方法，常作为“金标准”评价其他检查方法的敏感性和特异性。对消化性溃疡或功能性消化不良者，Hp 根除治疗后若无“报警”症状，则 UBT 为评价 Hp 根除效果的首选方法。

由于 UBT 也是尿素酶依赖性检查方法之一，在根除治疗后的早期因尿素酶活性减低可能出现假阴性结果。同时由于抑酸剂的应用使胃酸分泌锐减，致胃内其他产尿素酶的细菌过度生长而出现较高的假阳性。Slomianski et al^[12] 报道根除治疗后 6 wk^[13] C-UBT 检测 Hp 的特异性为 71%。Tokunaga et al^[13] 对 109 例 Hp 感染者根除治疗后随访 6 mo，采用细菌培养、组织学检查和¹³C-UBT 联合检查 Hp。治疗后 31-90 d 进行第一次检查，治疗后 6 mo 行第二次检查。结果第一次检查认为 Hp 已根除的患者有 4.6% 复发，考虑其主要原因是第一次检查结果为假阴性。另一方面，¹³C-UBT 检查结果显示根除失败的 6 例，没有继续治疗的情况下，6 mo 时复查 Hp 自动转阴，考虑第一次检查结果可能为假阳性。

Miwa et al^[14] 报道，199 例 Hp 感染者根除治疗后 1 mo 和 6 mo 分别进行¹³C-UBT 和侵入性检查。将 1 mo 和 6 mo 时的¹³C-UBT 值进行比较，截止点设在 0.5%。治疗后 1 mo 检查时有 94.9% 的患者¹³C-UBT 值低于 0.5%，即 Hp 阴性，6 mo 时复查仍为阴性。而¹³C-UBT 值高于 0.5% 的患者中有 60.9% 在 6 mo 复查时已低于 0.5%，被认为 Hp 已根除。¹³C-UBT 评价 Hp 根除效果，根除治疗后 1 mo 检查的可靠性虽达 94.6%，但假阳性率较高。因此，UBT 最好在 Hp 根除治疗后 6 mo 检查，以降低其假阳性率。Yoshimura et al^[15] 研究结果显示 Hp 根除治疗

后 6 mo 复查，UBT 与以活检为基础的侵入性检查的准确性无统计学差异。Epple et al^[16] 报道 Hp 根除治疗后 6 mo UBT 的准确性达 98.9%。

¹³C-UBT 可有效评估 Hp 根除治疗效果，但遗憾的是¹³C-UBT 检查需昂贵的仪器和试剂，通常只有少数医疗中心可以进行。故仍需寻找一种价廉、敏感和特异的非侵入性检查方法评价 Hp 根除效果，新近开展的 Hp SA 试验基本达到上述要求。

3 Hp SA 试验

Hp SA 试验是通过酶联免疫方法(enzyme immunoassay, EIA)检测粪便中 Hp 抗原，反映消化道 Hp 感染状况。其优点为仅需粪便标本，90 min 即可出结果，且相对价廉，并有较高的敏感性和特异性。Varia et al^[17] 对 501 例患者的研究结果显示，Hp SA 诊断 Hp 感染，敏感性和特异性分别为 94.1% 和 91.8%。Hp SA 已被美国 FDA 批准用于监测有症状的成年 Hp 感染者的诊断和 Hp 根除治疗效果的评价。具有国际权威性的欧洲 Hp 研究组(EHPSG) Maastricht2-2000 共识报告^[18] 认为，评价 Hp 根除效果首选 UBT，如果不能进行 UBT，选择 Hp SA。Hp 根除治疗后，虽然 Hp 已被杀死，但其抗原仍存在于粪便中，以及其他细菌抗原的交叉反应等原因，Hp SA 存在很高的假阳性，使其在根除治疗后的准确性明显降低。Bilardi et al^[19] 用组织学检查、RUT 及培养作为“金标准”比较了三联杀菌治疗后 Hp SA 及¹³C-UBT 监测 Hp 根除治疗的效果，结果发现二者敏感性相似，但 Hp SA 的假阳性率明显高于¹³C-UBT，阳性预测值明显低于¹³C-UBT。Makristathis et al^[20] 报道，55 例 Hp 感染者在抗菌治疗 35 d 后，41 例证实已根除的患者中有 13 例 HpSA 阳性，敏感性和特异性分别为 68.3% 和 85.7%，提示 Hp 根除治疗后 1 mo 检测 Hp SA 为时过早。Caselli et al^[21] 在 Makristathis 的研究基础上将随访时间延长，结果 72 例已根除的患者 HpSA 检测有 13 例假阳性(18%)，其中 3 例 6 mo 复查时 HpSA 转阴，而¹³C-UBT 只有 1 例假阳性。因此，Hp SA 应该在根除治疗后至少 6 mo 进行，且其准确性不及¹³C-UBT。

虽然正常胃黏膜不到 1 wk 即更换 1 次，但当合并其他消化道炎症如阑尾炎或憩室炎时，黏膜更换延迟^[18]。有关根除治疗后 Hp SA 在体内存留的时间，尚未见详细报道，故 Hp SA 在根除治疗后的诊断时机及其准确性有待进一步研究和证实。

总之，Hp 根除治疗后 6 mo 行 RUT 或¹³C-UBT 评价根除效果均有很高的准确性，可根据复查时是否需要内镜检查来进行选择。Hp SA 试验在 Hp 根除治疗后 6 mo 仍有一定的假阳性，准确性不如前 2 种方法，但随着对其研究的深入，其有望成为评价 Hp 根除效果的简单、经济而又准确的新方法。Hp 根除后血清中 Hp IgG 和 Hp IgA 抗体可持续存在，故不宜用血清学方法评价 Hp 根除治疗效果。

4 参考文献

- 1 Hopkins RJ, Girardi LS, Turney EA. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: A review. *Gastroenterology* 1996;110: 1244-1252
- 2 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
- 3 Arima N, Tsudo M. Extragastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma showing the regression by *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Br J Haematol* 2003;120:790-792
- 4 Nishikawa K, Sugiyama T, Kato M, Ishizuka J, Kagaya H, Hokari K, Asaka M. A prospective evaluation of new rapid urease tests before and after eradication treatment of *Helicobacter pylori*, in comparison with histology, culture and ¹³C-urea breath test. *Gastointest Endosc* 2000;51:164-168
- 5 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
- 6 Xia HX, Keane CT, O'Morain CA. Pre-formed urease activity of *Helicobacter pylori* as determined by a viable cell count technique-clinical implications. *J Med Microbiol* 1994;40:435-439
- 7 Laine L, Suchower L, Johnson E, Ronca P, Neil G. Accuracy of CLOtest after *Helicobacter pylori* therapy. *Gastointest Endosc* 1998;47:250-253
- 8 Nakshabendi IM, Zhang QB, Mokhashi M, Gemmell CG, Lee FD, Russell RI. Effect of omeprazole therapy on the survival of *Helicobacter pylori*, urease activity, and antral gastric histology in patients with duodenal ulcer. *Helicobacter* 1996;1:155-158
- 9 Rune SJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. When to use which test and why. *Scand J Gastroenterol* 1996;215 (Suppl): 63-65
- 10 Murata H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, Sawaoka H, Iijima H, Kawai N, Hori M. Evaluation of the PyloriTek test for detection of *Helicobacter pylori* infection in cases with and without eradication therapy. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2102-2105
- 11 孙为豪, 胡家华, 曹大中. 幽门螺杆菌根除治疗前后快速尿素酶试验诊断的准确性. 中华消化内镜杂志 2003;20:104-106
- 12 Slomianski A, Schubert T, Cutler AF. ¹³C-urea breath test to confirm eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1995;90:224-226
- 13 Tokunaga K, Hoshiya S, Watanabe K, Tanaka A, Ninomiya H, Wada S, Shingaki M, Itoh T, Ishida H, Takahashi S. A study on the appropriate time point for the assessment of *Helicobacter pylori* eradication-evaluation from the re-positive rate of *H pylori* after successful eradication and delayed decrease of ¹³C-urea breath test levels. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2000;97:1143-1150
- 14 Miwa H, Ohkura R, Nagahara A, Murai T, Ogihara T, Watanabe S, Hirai S, Sato N. ¹³C-urea breath test for assessment of cure of *Helicobacter pylori* infection at 1 month after treatment. *J Clin Gastroenterol* 1998;27(Suppl 1):S150-S153
- 15 Yoshimura N, Tajiri H, Sawada A, Kozaiwa K, Ida S, Fujisawa T, Konno M, Kato S. A ¹³C-urea breath test in children with *Helicobacter pylori* infection: assessment of eradication therapy and follow-up after treatment. *J Gastroenterol* 2001;36:606-611
- 16 Epple HJ, Kirstein FW, Bojarski C, Frege J, Fromm M, Riecken EO, Schulzke JD. ¹³C-urea breath test in *Helicobacter pylori* diagnosis and eradication. Correlation to histology, origin of 'false' results, and influence of food intake. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:308-314
- 17 Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon AT, Deltenre M, Hirsch AM, Gasbarrini G, O'Morain C, Garcia JM, Quina M, Tytgat GN. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA. European study group. *Lancet* 1999; 354:30-33
- 18 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. European *Helicobacter Pylori* Study Group (EHPG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:167-180
- 19 Bilardi C, Biagini R, Dulbecco P, Iiritano E, Gambaro C, Mele MR, Borro P, Tessieri L, Zentilin P, Mansi C, Vigneri S, Savarino V. Stool antigen assay (HpSA) is less reliable than urea breath test for post-treatment diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1733-1738
- 20 Makristathis A, Pasching E, Schutze K, Wimmer M, Rotter ML, Hirsch AM. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1998;36:2772-2774
- 21 Caselli M, Zaffoni E, Trevisani L, Sartori S, Alvisi V. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by Hp SA test. *Lancet* 1999; 354:1209-1210

• 文献综述 •

肿瘤干细胞与实体肿瘤

冯 波, 刘炳亚, 陆爱国, 郑民华

冯波, 刘炳亚, 陆爱国, 郑民华, 上海第二医科大学附属瑞金医院普外科, 上海消化外科研究所 上海市 200025
项目负责人: 郑民华, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海瑞金医院普外科, zmhtiger@yeah.net
电话: 021-64370045-664558 传真: 021-64333548
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

摘要

人急性粒细胞性白血病干细胞(LSC)的分离、鉴定及功能研究认为肿瘤起源于干细胞, 是一种干细胞疾病。虽然有证据表明, 实体肿瘤也存在类似的肿瘤干细胞, 但基于条件限制长久以来没有得到分离鉴定。最近具有自我更新和分化能力以及特异表面标志的乳腺癌、脑肿瘤干细胞相继被分离鉴定, 提出实体肿瘤是干细胞疾病的理念, 认为肿瘤是功能异质性的, 只有小部分肿瘤干细胞才有成瘤及维持恶性显型的作用, 因此肿瘤的治疗关键应是针对肿瘤干细胞的治疗, 这对传统的肿瘤治疗方式提出了巨大的挑战。作为新课题, 实体肿瘤干细胞的起源、研究方法、研究内容及进一步研究方向尚需探讨, 但是肿瘤干细胞研究对实体肿瘤发生发展机制的阐明、治疗新靶点的发现等将产生深远影响。

冯波, 刘炳亚, 陆爱国, 郑民华. 肿瘤干细胞与实体肿瘤. 世界华人消化杂志 2004;12(4):979-982
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/979.asp>

0 引言

干细胞(stem cells)是一类未分化的细胞或原始细胞, 多潜能分化及自我更新能力是其两个主要生物学特性^[1-8]。继造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)的发现^[9-13], 许多学者提出肿瘤干细胞假说, 即肿瘤起源于正常干细胞遗传突变的积累^[10, 14-15]。1994年 Lapidot et al^[16]首次通过特异细胞表面标志分离出了人急性粒细胞性白血病干细胞(leukemic stem cells, LSC), 发现只有 LSC 才具有不断自我更新维持其恶性显型的作用, 证明了肿瘤干细胞的客观存在。最近乳腺癌^[17]和脑瘤^[18]中相继分离纯化出了具有特异表面标志的肿瘤干细胞, 开创了实体肿瘤干细胞研究的新局面, 并提出实体肿瘤也是一种干细胞疾病的理念^[17-18]。

1 理论依据

1.1 Stochastic 与 Hierarchy 学说 许多肿瘤移植动物实验表明, 只有当注射(皮下或股部)肿瘤细胞数大于 10^6 时才能在局部形成肿瘤, 由此产生了两种肿瘤形成学说, 即 Stochastic 与 Hierarchy 学说^[19], 分别解释了为何不

是每个肿瘤细胞都能再接种形成移植瘤。Stochastic 学说认为所有肿瘤细胞是功能同质的, 每个肿瘤细胞都有再形成肿瘤的能力, 但其进入细胞周期增生分裂是由一些低概率的随机事件控制。因此, 要阐明肿瘤的生物学特性必须研究全部肿瘤细胞。而 Hierarchy 学说认为, 肿瘤细胞在功能上存在很大的异质性, 只有极小部分肿瘤起源细胞(tumor-initiating cell, T-IC)才有成瘤能力, 且成瘤率较高。这种 T-IC 即为肿瘤干细胞, 与其他肿瘤细胞不同, 其具有自我更新和分化能力, 因此应该成为肿瘤研究的靶点。

1.2 造血系统肿瘤干细胞 造血系统是研究干细胞较好的模式, 目前研究较为深入。早在 1960 年代就曾发现一些来自小鼠腹水的骨髓瘤细胞只有很少一部分(1/10 000-1/100)能在体外克隆形成试验形成克隆, 只有 1-4% 的移植白血病细胞能在脾脏形成克隆^[19-20]。肿瘤细胞克隆形成能力的差异提示造血系统肿瘤是异质的, 可能存在为数极少的肿瘤干细胞, 只有后者才有成瘤能力。而近年来一种以 CD34⁺CD38⁻ 为特异表面标志的细胞在急性粒细胞白血病(AML)中得到分离纯化, 能转移入 AML 至 NOD/SCID 小鼠, 在其体内形成 AML, 被命名为 SCID 白血病起源细胞(SCID leukemia-initiating cells, SL-IC)^[16, 21-22], 这种细胞即人 LSC。

1.3 实体肿瘤的复发和转移 目前临幊上对实体肿瘤的治疗都是针对其全部的肿瘤细胞, 而评价治疗手段的有效与否一般都是以肿瘤的消退或缓解程度为标准。虽然肿瘤能达到消退或缓解, 但往往在一段时间后会复发, 这也是肿瘤患者 5 a 生存率低的主要原因^[23-24]。这可能与肿瘤干细胞的存在有关, 因为干细胞相对于已分化细胞或成熟细胞对凋亡更不敏感, 继续存活而成为复发的根源^[25-26]。大约 30% 乳腺癌患者临幊确诊时已经存在骨髓的微转移, 但 5 a 后其中只有 50% 的患者显示转移征象, 这可能与转移的肿瘤细胞是不是肿瘤干细胞有关^[17, 26]。

2 实体肿瘤干细胞的发现及起源

2.1 实体肿瘤干细胞的发现 早在 1960/1970 年代, 许多学者业已找到实体肿瘤干细胞存在的实验依据: 实体肿瘤细胞存在异质性, 只有小部分细胞有克隆形成能力。Hamburger et al^[27]发现只有 1/1 000-1/5 000 的肺癌、卵巢癌与神经母细胞瘤细胞有能力在体外软琼脂培养基上形成克隆(细胞克隆培养), 这与 LSC 有很大的相似性, 是一种“癌干细胞(cancer stem cells)”。但是由

于当时实验技术等的限制尚未对其进行分离纯化。最近, Al-Hajj et al [17]通过特异性的细胞表面标志率先在人乳腺癌中分离纯化出“乳腺癌干细胞(breast cancer initiating cells, BCa-IC)”,这种细胞以 Lin⁻ESA⁺CD44⁺CD24^{-/low}为特异细胞表面标志,只占肿瘤细胞的2%。通过有限稀释分析发现其在NOD/SCID小鼠的成瘤能力至少是其他肿瘤细胞的50倍,即使少于100个细胞也能在小鼠体内成瘤,而且能体内连续传代。研究还发现由这种BCa-IC形成的小鼠移植瘤与原先BCa-IC来源的人乳腺癌组织具有相同的显型,即移植瘤既含有这种BCa-IC又具有其他肿瘤细胞。提示极强的自我复制更新能力与不断分化能力是BCa-IC两个主要特性。BCa-IC的发现证实了实体肿瘤干细胞的存在,为其他实体肿瘤干细胞的发现提供了理论支持^[28-29]。Singh et al [18]在包括成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、室管膜细胞瘤及神经节神经胶质瘤等一系列脑部肿瘤中分离出CD133⁺的“脑肿瘤干细胞(brain tumor stem cells, BTSC)”。研究发现各种病理类型脑肿瘤的BTSC体外培养均能形成神经球样克隆(neurosphere-like colonies),称为肿瘤球(tumor spheres)。BTSC与BCa-IC相似,具有很强的自我更新和分化能力,其形成肿瘤球的细胞显型与原位肿瘤是一样的。此外,BTSC还存在染色体的异常,即10号,16号染色体缺失,18号染色体增加,核型为45 XY^[18]。提示BTSC已经从其正常来源的细胞发生遗传转变,可以解释其恶性增生和分化。

2.2 实体肿瘤干细胞的起源 正常组织干细胞与肿瘤细胞存在很多共同点^[30]。迄今,肿瘤干细胞起源于何种细胞尚未有定论,目前有两种假说^[30, 14]: (1)由于正常干细胞,包括HSC已经存在被激活的自我更新机制,获得较少突变即有可能恶性转化,而且干细胞存活时间较长,有更多的突变机会形成肿瘤干细胞; (2)一些已经开始分化的原始细胞或成熟细胞也有可能在癌变以前重新获得自我更新能力,经历突变形成肿瘤干细胞(图1)。正常HSC表面标志为Lin⁻CD34⁺CD38⁻Thy-1⁺,而LSCs为Lin⁻CD34⁺CD38⁻Thy-1⁻,二者的差别只在于Thy-1的表达与否,因此Thy-1⁻的原始细胞或者丢失Thy-1表达的HSC都有可能经历突变而恶性转化为肿瘤干细胞^[31-32]。此外,Notch细胞信号转导途径的激活^[33-37]、Wnt信号途径的失调^[38-41]、Shh-Gli途径的下调^[42-46]等诸多信号转导途径与造血系统、表皮组织、乳腺组织以及肠上皮组织的干细胞自我更新、增生、分化失调而致恶性转化有关,而这些研究尚处于初始阶段。

3 研究方法和意义

3.1 肿瘤干细胞的分离纯化 近年来,干细胞研究的发展很大程度上依赖于细胞分化抗原的研究进展。细胞表面特异性标志的确定是肿瘤干细胞分离的第一步。一般原则为结合谱系标志(Lineage-),正常干细胞特异标志(如分离BTSC的CD133与分离LSCs的CD34)以及正常

组织特异性标志(如上皮特异性标志ESA)等综合评价,很多学者认为结合阳性标志和阴性标志可以更有效的分离干细胞(如BCa-IC为CD44⁺CD24⁻)。研究发现Sca-1与keratin-6^[47]、integrin β1^[48] Musashi-1与Hes1^[49-50]等表面标志可作为肠干细胞分离的标志,也可作为结肠癌干细胞分离的参考。目前高通量的细胞分选系统主要有:磁性细胞分选系统和流式细胞技术(FACS)。分离过程主要分为两步^[17]:首先分别按各细胞表面标志进行细胞群(包括细胞表面分子+与-细胞)的筛选,各细胞群按不同细胞浓度接种NOD/SCID小鼠,观察肿瘤生长,比较各组成瘤能力,筛选出优势细胞表面标志。其次针对几种优势细胞表面标志进行组合(例如A+B-C+),筛选出各组合的细胞群,各按不同浓度组接种NOD/SCID小鼠,比较各细胞群成瘤能力,确定目的细胞。

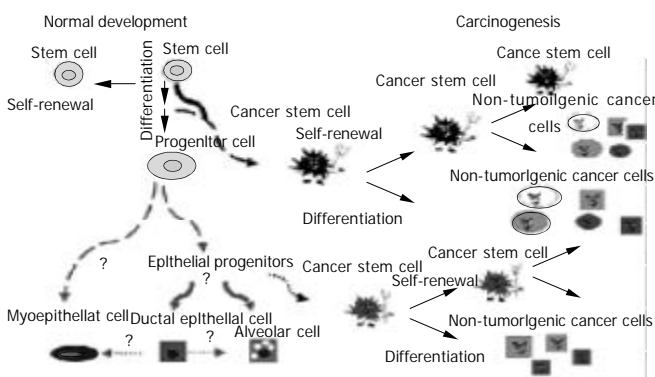


图1 干细胞在正常乳腺生长与乳腺癌发生中的作用(Dontu et al.)。

3.2 肿瘤干细胞的鉴定 目前尚不能从形态学来鉴定干细胞,而尝试从功能学方法,即对其自我更新能力与不断分化能力两个主要特性进行评价是干细胞鉴定的主要方法^[51]。Al-Hajj et al [17]将人原位或胸水转移癌细胞根据细胞表面标志进行筛选,将筛选的特定细胞群以不同浓度在NOD/SCID小鼠乳腺脂肪板进行体内接种,发现Lin⁻ESA⁺CD44⁺CD24^{-/low}细胞不仅有很强的成瘤能力,而且可以在小鼠体内连续传代,表明其自我更新复制能力;而体外培养显现极强的肿瘤球形成能力亦可评价BTSC自我复制的能力^[18]。对BCa-IC与BTSC分化能力的评价是通过对形成的移植瘤或体外肿瘤球细胞显型的分析。研究发现这种移植瘤或肿瘤球中含有与原BCa-IC、BTSC一样的干细胞是其自我更新的结果,而大量无特异表面标志的其他异质肿瘤细胞则是其异常分化的产物。

3.3 未来研究方向 (1)加强对正常组织干细胞生物学行为、细胞表面标志的研究,为更多实体肿瘤干细胞的分离鉴定提供理论支持; (2)最近研究表明,成体干细胞、造血干细胞、神经干细胞还有胚胎干细胞的基因表达谱存在很大的重叠性,包括激活的TGF-β、生长激素与凝血酶受体信号途径以及ABC家族膜转运蛋白等的高表达,这赋予了这些细胞的“干细胞性”^[15, 52-53]。Dontu et al [54]用基因芯片研究比较了正常乳腺干细胞样

细胞与其分化的成熟乳腺细胞的基因表达谱也发现这种干细胞样细胞存在类似基因的高表达, 有证据已经表明这些基因的失调控与乳腺癌的发病有关。因此研究实体肿瘤干细胞与正常组织干细胞及其他异质肿瘤细胞的基因表达谱, 并对其差异基因进行功能研究, 可以阐明肿瘤干细胞的起源以及肿瘤发生发展的基本机制, 从而可以寻找实体肿瘤治疗的新靶点; (3)Notch^[33-37]、Wnt^[38-41]、Shh-Gli^[42-46]及 BMI1^[55-56]等细胞信号转导途径与造血系统、表皮组织、乳腺组织以及肠上皮组织的干细胞自我更新、增生、分化有关, 也与肿瘤的发生发展有关, 研究实体肿瘤干细胞与其他肿瘤细胞这些信号转导途径的差异有助于阐明肿瘤的发病机制; (4)实体肿瘤干细胞的含量极少且不断分化, 所以发展高效的体外培养系统、细胞扩增技术以及维持干细胞未分化状态技术是今后研究的艰巨任务^[54]。

3.4 实体肿瘤干细胞的研究意义 (1)乳腺癌和脑瘤干细胞的发现、分离及鉴定证明了 Hierarchy 学说的正确性, 即只有小部分肿瘤干细胞才有成瘤能力并维持肿瘤显型。干细胞表达 MDR1 与 ABC 转运蛋白等耐药分子^[57-58], 对化疗与凋亡不敏感^[59-60]。如果肿瘤干细胞高表达这类分子, 也有可能对治疗耐受, 这解释了肿瘤治疗后的复发转移^[17, 26]。(2)肿瘤的发病机制尚未阐明^[61-62], 对实体肿瘤干细胞遗传属性、生物学行为、信号转导等进行系统研究, 有助于从根本上阐明肿瘤的发生发展机制。(3)传统肿瘤治疗都是针对所有的肿瘤细胞, 而且认为肿瘤细胞具有功能同质性。而实际上如果肿瘤是源于肿瘤干细胞, 是一种干细胞疾病, 我们先前诸多关于肿瘤发生发展机制、细胞信号途径等的研究成果需要重新评价, 因为肿瘤干细胞的生物学行为与其他肿瘤细胞可能存在质的差别。最新研究表明, 联合黄胆素与蛋白酶抑制剂能选择性杀伤 LSC, 但对正常 HSC 无影响^[63], 有效的治疗需要选择性杀伤肿瘤干细胞^[31], 这对传统治疗提出极大的挑战。(4)通过对肿瘤干细胞基因表达谱、生物学行为以及功能的不断深入研究, 可以阐明其遗传机制、恶性转化路径, 从而发掘针对干细胞的治疗新靶点, 为临床彻底根治肿瘤展示了新希望。

总之, 实体肿瘤干细胞的发现无疑给全世界学者一个很大的惊喜, 而就像对待其他新事物一样我们需要对其进行更多的研究。尝试从胃肠道肿瘤、肺肿瘤、皮肤肿瘤等分离出类似的肿瘤干细胞并对其进行系统的研究是我们努力的方向。

4 参考文献

- 1 姜佳丽, 万小平, 张琳, 展玉涛. 胰腺干细胞. 世界华人消化杂志 2003;11:1740-1742
- 2 展玉涛, 任继萍. 肝脏干细胞. 世界华人消化杂志 2003;11:1735-1737
- 3 姜佳丽, 王虹, 展玉涛. 肠道干细胞. 世界华人消化杂志 2003;11:1730-1732
- 4 王天佑, 展玉涛. 胃干细胞. 世界华人消化杂志 2003;11:1727-1730
- 5 王宇明, 陈耀凯. 肝干细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:337-342
- 6 万东君, 李六金, 王春雨. 肝干细胞研究现状. 世界华人消化杂志 2002;10:452-454
- 7 张刚庆, 方驰华. 干细胞研究的问题与对策. 世界华人消化杂志 2003;11:2011-2014
- 8 Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003;9:201-204
- 9 Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58-62
- 10 Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-245
- 11 Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58-62
- 12 Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994;1:661-673
- 13 Lecuyer E, Hoang T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* 2004;32:11-24
- 14 Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11842-11849
- 15 Marx J. Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 2003;301:1308-1310
- 16 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645-648
- 17 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983-3988
- 18 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-5828
- 19 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111
- 20 Bruce WR, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation *in vivo*. *Nature* 1963;199:79-80
- 21 Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 1997;89:3104-3112
- 22 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-737
- 23 卿三华. 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11:1760-1763
- 24 Harris GJ, Senagore AJ, Lavery IC, Church JM, Fazio VW. Factors affecting survival after palliative resection of colorectal carcinoma. *Colorectal Dis* 2002;4:31-35
- 25 Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3547-3549
- 26 Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:895-902
- 27 Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977;197:461-463
- 28 Waterworth A. Introducing the concept of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res* 2004;6:53-54
- 29 Welm AL. AACR Special Conference: Advances in breast cancer research—genetics, biology, and clinical implications, huntington beach, California, USA, 8-12 October 2003. *Breast Cancer Res* 2004;6:E6
- 30 Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 2003;36(Suppl 1):59-72
- 31 Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 2000;97:7521-7526
- 32 Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T, Akashi T, Takenaka K, Mizuno S, Gondo H, Okamura T, Dohy H, Niho Y. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 1996;87:4789-4796
- 33 Soriano JV, Uyttendaele H, Kitajewski J, Montesano R. Expression of an activated Notch4(int-3) oncogene disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in mammary epithelial cells *in vitro*. *Int J Cancer* 2000;86:652-659
- 34 Clarke RB, Anderson E, Howell A, Potten CS. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2003;36(Suppl 1):45-58
- 35 Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, Baltimore D. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* 1996;183:2283-2291
- 36 Varnum-Finney B, Xu L, Brashe Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS, Bernstein ID. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* 2000;6:1278-1281
- 37 Henrique D, Hirsinger E, Adam J, Le Roux I, Pourquie O, Ish-Horowicz D, Lewis J. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* 1997;7:661-670
- 38 Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:15-21
- 39 Zhu AJ, Watt FM. Beta-catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development* 1999;126:2285-2298
- 40 Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448-452
- 41 Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:409-414
- 42 Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2002;2:361-372
- 43 Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 1999;22:103-114
- 44 Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002;31:306-310
- 45 Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nat Neurosci* 2003;6:21-27
- 46 Wetmore C. Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:34-42
- 47 Welm B, Behbod F, Goodell MA, Rosen JM. Isolation and characterization of functional mammary gland stem cells. *Cell Prolif* 2003;36(Suppl 1):17-32
- 48 Fujimoto K, Beauchamp RD, Whitehead RH. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology* 2002;123:1941-1948
- 49 Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 2003;535:131-135
- 50 Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 2003;71:28-41
- 51 Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000;287:1442-1446
- 52 Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science* 2002;298:601-604
- 53 Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002;298:597-600
- 54 Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003;17:1253-1270
- 55 Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;423:302-305
- 56 Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 2003;423:255-260
- 57 Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991;66:85-94
- 58 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosfeld GC, Osawa M, Nakuchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001;7:1028-1034
- 59 Pallis M, Russell N. P-glycoprotein plays a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway. *Blood* 2000;95:2897-2904
- 60 Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* 1999;93:1075-1085
- 61 李洁, 刘芝华. 食管癌中的等位基因缺失. 世界华人消化杂志 2003;11:1777-1781
- 62 Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull* 2002;64:27-43
- 63 Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, Jordan CT. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16220-16225

• 文献综述 •

胃肠功能障碍患者胃黏膜内 pH 值的监测方法和意义

李建忠, 余飞飞, 岳茂兴

李建忠, 余飞飞, 岳茂兴, 中国人民解放军第 306 医院特种病科、腹部外科中心 北京市 100101
项目负责人: 岳茂兴, 100101, 北京市, 中国人民解放军解放军第 306 医院
特种病科、腹部外科中心
电话: 010-66354547 传真: 010-66354546
收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

摘要

胃肠功能障碍容易诱发多器官功能障碍综合征(MODS), 胃黏膜内 pH(pHi)值作为研究胃肠功能障碍患者病情变化的主要检测指标, 能够敏感反映 MODS 发生过程中最容易受累的胃肠黏膜缺氧情况, 较其他临床指标更早提示患者病情的变化。目前测定胃 pHi 的方法主要有张力计法和胃管法, 二者均能够连续测定胃 pHi 值, 及时准确地反映胃肠功能障碍患者的病情变化。本文通过查阅大量文献资料并结合临床经验, 系统阐述了胃肠功能障碍患者胃 pHi 的监测方法、意义和需要注意的问题, 为及早采取相应治疗措施, 预防 MODS 的发生提供理论依据和临床参考。

李建忠, 余飞飞, 岳茂兴. 胃肠功能障碍患者胃黏膜内 pH 值的监测方法和意义. 世界华人消化杂志 2004;12(3):983-984
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/983.asp>

0 引言

胃肠功能障碍易诱发多器官功能障碍综合征(MODS), 但目前临幊上还没有十分明确的用于预警胃肠功能障碍患者病情变化的检测指标。胃黏膜内 pH(pHi)值能够敏感反映 MODS 发生过程中最容易受累的胃肠黏膜缺氧情况, 可以作为研究胃肠功能障碍患者病情变化的主要检测指标, 进而为及早采取相应措施, 预防 MODS 的发生提供依据^[1-3]。现就测定胃肠功能障碍患者胃 pHi 的方法、意义和需要注意的问题综述如下。

1 监测 pHi 的临床意义

机体在维持其内环境和行使功能时所需要的能量直接来源于 ATP 的分解即 ATP → ADP+Pi+H⁺ 能量。当机体遭受创伤、失血感染等因素后, 组织细胞氧供缺乏, 可导致 ATP 的合成小于其分解而产生多余的 H⁺, 大量的 H⁺ 存在于胃黏膜内, 从而引起 pHi 值下降, 严重时可引发胃肠功能障碍直至并发 MODS。组织细胞缺氧程度越严重, 胃 pHi 值下降越显著。因此胃 pHi 值提供了部分器官组织氧合充分与否的判定依据, 而这些器官如胃肠道的完整性对于患者的存活率十分重要。胃 pHi 测定值低于正常, 可提示黏膜通透性增加, 黏膜损伤并

出现重复性灌注, 即细菌、毒素入侵、菌血症和多器官功能障碍或衰竭。根据此原理, 测定胃 pHi 值可以作为复苏过程中有临床价值的一个重要指标。临床研究发现, 以 pHi 值诊断胃肠道慢性缺氧, 其敏感性为 95%, 特异性为 100%; 在诊断腹主动脉瘤术后缺氧性结肠炎中, 其敏感性为 100%, 特异性为 87%; 在早期发现休克中, 其敏感度远高于乳酸^[3-5]。

2 测定 pHi 的方法

2.1 张力计法 用生理盐水将 TRIP-NGS 导管远端的聚硅酮膜水囊内的气体完全排空, 再将生理盐水抽空。以三通管锁闭水囊、防止气体混入。然后采用常规经鼻饲插胃管的方法, 将导管前端送入胃腔内, 并经 X 线检查证实导管的水囊确实在胃腔内。将 2.5 mL 室温生理盐水经三通管开关注入水囊, 防止气体混入。之后关闭开关, 开始计算平衡时间。60 min 后用注射器缓慢抽出 1.0 mL 囊内液体弃掉, 再抽取囊内所剩液体, 立即用血气分析仪测定 PCO₂。同时抽取动脉血, 测定 HCO₃⁻。利用 Herderson-Hasselbach 方程 pHi = 6.1 + lg(HCO₃⁻ / PCO₂ × K × 0.03), 求出 pHi 值(K 为校正系数, 60 min 时 K=1.13)。聚硅酮膜对 CO₂ 等分子有良好的通透性。但不能透过 H⁺。Herderson-Hasselbach 方程成立是基于以下理论: (1)测得的 PCO₂ 等于胃黏膜内实际 PCO₂; (2)组织中 HCO₃⁻ 等于动脉血 HCO₃⁻^[4-8]。

2.2 胃管法 患者经鼻插入胃管, 吸尽胃内容物后, 向胃内注入 30 mL 生理盐水, 夹闭胃管, 定时抽取胃液, 弃去前 10 mL, 留取后 2 mL。所得标本立即用 ABL-300 血气分析仪测定胃肠道二氧化碳分压(PCO₂)。同时经动脉采血测定 HCO₃⁻ 浓度, 根据下列公式计算 pHi [pHi = 6.1 + lg (HCO₃⁻ / PCO₂ × K × 0.03)(K 为校正系数, 60 min 时 K=1.13)]。胃管法测定 pHi 值不仅简单方便、经济实用, 而且测定结果准确可靠^[6-10]。

3 测定 pHi 值应注意的问题

3.1 影响 pHi 值的因素 (1)反渗: 胃黏膜分泌 H⁺, 与胰腺分泌的 HCO₃⁻ 反应, 可引起胃内 PCO₂ 增高, 导致 pHi 降低; 相反分泌 H⁺ 引起的“碱潮”又可使动脉 HCO₃⁻ 升高, 以上两种情况均不直接反映氧代谢情况。(2)全身性酸中毒: 代谢性或呼吸性酸中毒均可使 pHi 降低, 干扰 pHi 的准确测定。(3)CO₂ 排出减少: 当组织灌注减少, 但又不伴有细胞缺氧时, 就不会造成组织 CO₂ 蓄积。有关实验表明只有当出现无氧代谢时, CO₂ 才显

著升高^[7-12].

3.2 改良措施 (1)针对反渗: 使用H₂受体阻断剂或质子泵阻断剂, 如甲氰咪胍、雷尼替丁、洛塞克等, 可达到抑制胃酸分泌的作用。另外长期禁食的患者胃酸分泌也很少, 以上措施可显著减少对临床判读pHi的干扰。(2)针对全身性酸中毒: 将pHi标准化即pHi=7.40-Lg(PCO₂/PaCO₂), 可避免诸如肺通气障碍或肾功能不全等对测定结果的影响^[8-15]。

3.3 需要注意的问题 (1)对于长期保留胃管的禁食患者, 持续测定pHi值还存在很大困难。另外对于没有禁食水的患者, 在测定胃pHi值, 应至少禁食水1 h以上, 所获得的结果较为理想。若患者有胃积血的现象, 则不适宜测定胃pHi值。(2)采用胃管法进行pHi值的计算, 对于已经出现血液动力学异常和酸碱与电解质平衡紊乱的患者, 并无实际临床意义。(3)外伤手术患者由于发病急、术后插管较多, 如何及时准确地测定胃pHi值尚待进一步研究。(4)也有研究表明: 部分非胃肠功能障碍患者也可能出现pHi降低的现象, 但无临床症状出现。确定此类人群pHi值的实际意义, 可做进一步检查, 防止干扰临床诊断。(5)技术人员、测定设备也可影响胃pHi值的测定结果。通过严格培训的技术人员能更准确地测定胃pHi值, 不同型号的血气分析仪对所测定的结果误差有显著性, 以上总体失误率在可达34%。(6)使用磷酸缓冲液, 可以提高测定数据的可靠性, 比使用生理盐水更能增加胃pHi值的精确度。(7)对胃pHi值正常下限值的理解对于判定所测定的胃pHi值意义有直接的影响, 部分学者采用7.32, 也有一些专家采用7.35。事实上, 想获得精确的胃pHi值正常下限值是很困难的, 在利用胃pHi值判断患者病情时一定要结合当时患者的具体病情。(8)测定胃pHi值时, 一定要注意操作过程中避免与空气接触, 排气和排液过程应充分利用三通开关和另一侧开口, 在形成负压后要立即关闭开口^[9-17]。

总之, 胃肠道是血液灌流减少发生最早、最明显且恢复最迟的脏器。而胃肠道黏膜的逆向微循环特点, 使胃肠黏膜在缺血缺氧时更易受损伤。胃肠黏膜的缺血缺氧增加了胃肠黏膜的通透性, 削弱了其免疫、屏障功能, 导致肠道细菌、内毒素移位, 是全身炎症反应综合征(SIRS)的重要原因, 成为病情向多器官功能障碍(MODS)演变的重要因素。胃肠黏膜血流的减少, 引起局部组织氧供的下降, 导致胃肠黏膜局部以无氧代谢为主, 形成局部高碳酸血症, 且胃肠黏膜局部碳酸血症的程度与胃肠道血流的减少相关。常规监测中pHa、PaO₂/FiO₂的改变常明显迟于pHi的改变, 反映组织水平上氧代谢平衡的pHi可作为评定全身性氧代谢平衡指标的

替代方法。在临床工作中上, 胃张力计和胃管法均能够连续测定胃pHi值, 比较准确地反映胃肠功能障碍患者的病情变化, 进一步为及早采取治疗措施提供临床诊断依据。但由于患者的疾病种类不同、病情变化复杂, 在测定胃pHi值时需要综合分析技术操作细节, 部分患者的具体测定方法和实际意义尚待进一步讨论和评价。

4 参考文献

- 岳茂兴, 李学彪, 李成林, 张连春, 张圭显, 张诗琳. 73例腹部外科多器官功能衰竭患者的救治体会. 中国普通基础与临床杂志 1998;5:180-182
- 岳茂兴. 多器官功能障碍及衰竭的诊断标准. 中国全科医学杂志 1999;2:235-236
- 曾东竹, 余配武, 蔡志民. 28例严重腹部创伤、感染患者胃黏膜pHi的变化. 中华创伤杂志 2001;17:559-560
- 侯百东, 陈德昌. 胃黏膜内pH(pHi)值测定及其临床意义. 国外医学外科学分册 1997;24:84-86
- Cerny V, Cvachovec K. Gastric tonometry and intramucosal pH-theoretical principles and clinical application. *Physiol Res* 2000;49:289-297
- Mandli T, Gondos T. Intramucosal pH monitoring during liver transplantation. *Clin Transplant* 2003;17:358-362
- 张颖, 于学忠. 急性重症胰腺炎患者生长抑素干预后pHi监测及其临床意义. *Chinese Critical Care Medicine* 2002;14:368-369
- 张颖, 马遂. 急性重症胰腺炎患者pHi和APACHEII评分相关性研究. 中国误诊学杂志 2002;6:823-824
- Huang CC, Shih MJ, Tsai YH, Chang YC, Tsao TC, Hsu KH. Effects of inverse ratio ventilation versus positive end-expiratory pressure on gas exchange and gastric intramucosal PCO(2) and pH under constant mean airway pressure in acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 2001;95:1182-1188
- Yamaura K, Okamoto H, Akiyoshi K, Irita K, Taniyama T, Takahashi S. Effect of low-dose milrinone on gastric intramucosal pH and systemic inflammation after hypothermic cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2001;15:197-203
- 王凤学, 张铁铮, 周锦, 姚婧. 胃张力计法与胃管法检测pHi的相关性. 中华麻醉学杂志 2000;20:218-220
- 陈惠德, 王小文, 李文雄, 赵松, 万力. 持续监测pHi值对于评价感染性休克患者预后的意义. 中国医刊 1999;34:21-22
- Hamilton G, Mathur R, Allsop JM, Forton DM, Dhanjal NS, Shaw RJ, Taylor-Robinson SD. Changes in brain intracellular pH and membrane phospholipids on oxygen therapy in hypoxic patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Metab Brain Dis* 2003;18:95-109
- Wahl ML, Owen JA, Burd R, Herlands RA, Nogami SS, Rodeck U, Berd D, Leeper DB, Owen CS. Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 2002;1:617-628
- 于学忠, 徐腾达, 王厚力, 邵孝宏. pHi监测在急性重症胰腺炎患者中的应用及意义. 急诊医学 2000;9:233-235
- Chao CM, Jin JS, Tsai CS, Tsai Y, Chen WH, Chung CC, Loh SH. Effect of hydrogen peroxide on intracellular pH in the human atrial myocardium. *Chin J Physiol* 2002;45:123-129
- Kishimoto T, Fujino Y, Nishimura S, Taenaka N, Mashimo T. Validity of gastric intramucosal pH (pHi) for circulatory evaluation in pediatric patients. *J Clin Monit Comput* 2002;17:87-92

• 研究快报 •

c-MYC 与大肠癌血管生成的关系及临床意义

陈立平, 邓长生, 吴江

陈立平, 邓长生, 吴江, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
项目负责人: 陈立平, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路 73 号, 武汉大学中南医院消化内科.

电话: 027-87330294
收稿日期: 2003-08-26 接受日期: 2003-11-06

摘要

目的: 探讨 c-MYC 与大肠癌血管生成的关系、可能机制及与临床病理特征间的关系.

方法: 采用免疫组化 S-P 法对 50 例大肠癌组织, 16 例正常大肠组织的 c-MYC、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 及 CD34 进行检测.

结果: c-MYC 与 VEGF 的表达之间存在显著相关性($\chi^2 = 9.232$, $P = 0.002$), c-MYC、VEGF 阳性组及 c-MYC、VEGF 双阳性组的 MVD 值(43.3 ± 9.6 、 42.3 ± 9.2 、 42.6 ± 8.9) 均显著高于 c-MYC、VEGF 阴性组及双阴性组的 MVD 值($t = 2.253$ 、 2.105 、 2.301 , $P < 0.05$); c-MYC、VEGF 及双阳性组大肠癌的淋巴结转移率明显高于阴性组($\chi^2 = 6.879$ 、 5.711 , $P < 0.05$), 且以双阳性组最高(68.9%); c-MYC、VEGF 及双阳性组的阳性率随 Dukes 分期而增加($\chi^2 = 9.306$ 、 6.330 、 6.953 , $P < 0.05$); 而 c-MYC、VEGF 的阳性率与大肠癌的组织学类型及分化程度无关($P > 0.05$).

结论: c-MYC 与大肠癌的血管生成相关, 并可能是通过 VEGF 引起的, 这为以 c-MYC 为靶点的基因治疗提供了理论依据.

陈立平, 邓长生, 吴江. c-MYC 与大肠癌血管生成的关系及临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(4):985-987

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/985.asp>

0 引言

血管生成对肿瘤的生长、侵袭、转移起着重要作用. 其出现在肿瘤发展的早期, 如没有血管生成, 肿瘤因得不到充足的血液供应而不能持续生长.c-MYC 不仅在细胞的增生与生长方面发挥重要作用, 而且其还是血管生成的重要调节者^[1]. 血管内皮生长因子是一个重要的血管生成因子, 在肿瘤的血管生成中发挥着重要作用. 为探讨 c-MYC 在大肠癌血管生成中的作用、可能机制及与临床病理特征间的关系, 我们采用免疫组化方法对 50 例大肠癌及 16 例正常标本的 c-MYC、VEGF、MVD 进行检测, 分析 c-MYC 与 VEGF 的表达及 MVD 间的关系, 现报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料 中、晚期大肠癌标本 50 例, 正常大肠黏膜标本(癌旁 5-10 cm)16 例取自武汉大学中南医院 2002/

2003 新鲜手术标本. 50 例大肠癌中, 男 24 例, 女 26 例, 年龄最大 69 岁, 最小 24 岁, 平均年龄 50.28 岁. 所有患者手术前均未接受放疗与化疗. 根据全国大肠癌病理研究统一规范, 按组织学类型分为腺癌、黏液腺癌、印戒细胞癌; 按组织学分化程度分为高、中、低分化; 按 Dukes 分期分为 A、B、C 三期. 所有标本经 100 mL/L 的甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 切片厚 4 μm. 鼠抗人 c-MYC、VEGF、CD34 单克隆抗体以及超敏 S-P 试剂盒均购自福州迈新公司.

1.2 方法

1.2.1 超敏 S-P 免疫组化染色法 一抗工作浓度为 1:50, 以乳腺癌切片作为 c-MYC 的阳性对照, 大肠癌切片作为 VEGF 的阳性对照, PBS 代替一抗作为阴性对照.
1.2.2 结果判定 MVD 计数: 在光镜下计数微血管, 凡染成棕色, 明显与微血管分开的内皮细胞或内皮细胞簇也可视为微血管(图 1). 先在低倍镜下找出微血管最丰富区, 在 200 倍视野下随机计数 5 个视野, 取平均数为此标本的 MVD 计数; 对 c-MYC、VEGF, 在高倍镜(400 倍)下随机数 5 个视野, 每视野连续数 100 个细胞, 数胞质或胞核染成棕黄色的细胞, 按平均率有 10% 以上细胞呈棕黄色定为阳性, 染色细胞数小于 10% 者为阴性.

统计学处理 统计分析使用 SPSS11.5 统计软件, 采用 χ^2 检验、确切概率法、t 检验对所得结果进行分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 c-MYC 与 VEGF 的表达特点及相关性 c-MYC 主要位于细胞质, 少数位于细胞核(图 2); VEGF 的表达主要位于细胞质, 也可见于细胞膜(图 3). 大肠癌组织中, c-MYC 表达主要位于细胞质, 也见于细胞核(图 4); VEGF 表达主要位于细胞质(图 5). 在大多数癌组织中, c-MYC 呈均一性表达, 在一些癌组织中则呈异质性表达, VEGF 亦如此. 正常大肠黏膜偶见黏膜上皮细胞表达 c-MYC, 但阳性细胞率低于 10%; 正常大肠黏膜未见 VEGF 表达. 在所检测的大肠癌标本中, c-MYC 与 VEGF 的表达之间存在显著相关性($\chi^2 = 9.232$, $P = 0.002$)(表 1).

表 1 c-MYC 与 VEGF 表达之间的关系

VEGF	c-MYC		合计
	阳性	阴性	
阳性	29	10	39
阴性	2	9	11
合计	31	19	50

$P < 0.01$.

2.2 c-MYC、VEGF与MVD、大肠癌临床病理特征间的关系 c-MYC、VEGF阳性组的MVD值显著高于阴性组的MVD值;同样c-MYC、VEGF双阳性组的MVD值也显著高于双阴性组。c-MYC、VEGF阳性组大肠癌淋巴结转移率明显高于阴性组;双阳性组大肠癌的淋巴结转移率明显高于双阴性组;双阳性组与单阳性组的转移率之间无显著性差异,但双阳性组的转移率高于单阳性组的转移率。总体上,c-MYC、VEGF及双阳性组的阳性率随Dukes分期而增加,但Dukes A、B期间的c-MYC阳性率及Dukes B、C期间的VEGF阳性率差异无显著性,并且双阳性组Dukes B、C期的比率高于单阳性组;c-MYC、VEGF及双阳性组的阳性率与大肠癌的组织学类型及分化程度无关(表2)。

表2 c-MYC、VEGF与MVD、大肠癌临床病理特征间的关系

项目	c-MYC		VEGF		c-MYC、VEGF共表达	
	阳性	阴性	阳性	阴性	双阳性	双阴性
组织学类型						
腺癌	24	16	32	8	22	7
黏液腺癌	5	2	5	2	5	1
印戒细胞癌	2	1	2	1	2	1
分化程度						
高	12	4	14	2	11	2
中	17	12	21	8	16	6
低	2	3	4	1	2	1
淋巴结转移						
有	20	5 ^b	23	2 ^a	20	2 ^a
无	11	14	16	9	9	7
Dukes						
A期	4	9 ^a	7	6 ^a	4	5 ^a
B期	9	6	12	3	8	2
C期	18	4	20	2	14	2
MVD值	43.3 ± 9.6	34.7 ± 8.3 ^a	42.3 ± 9.2	34.4 ± 8.1 ^a	42.6 ± 8.9	34.9 ± 6.2 ^a

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 阳性组。

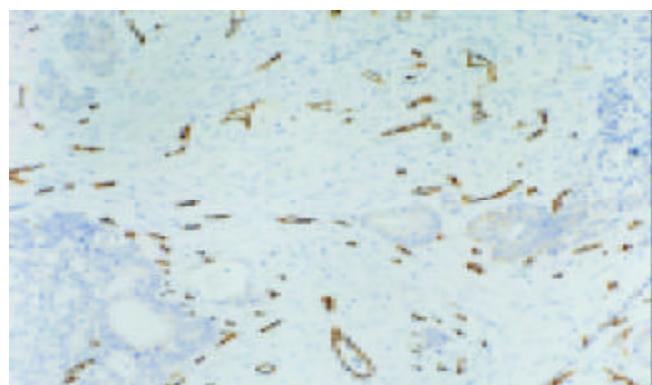


图1 肿瘤微血管。

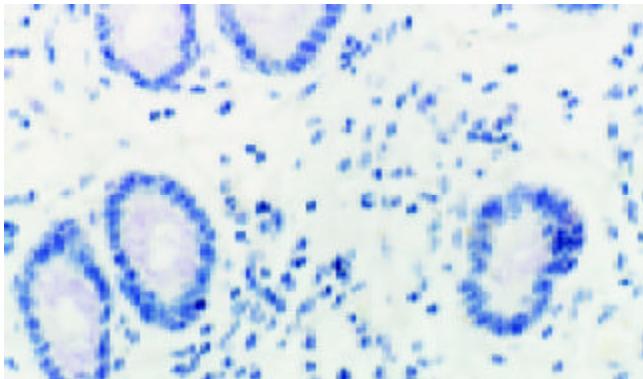


图2 正常c-MYC。

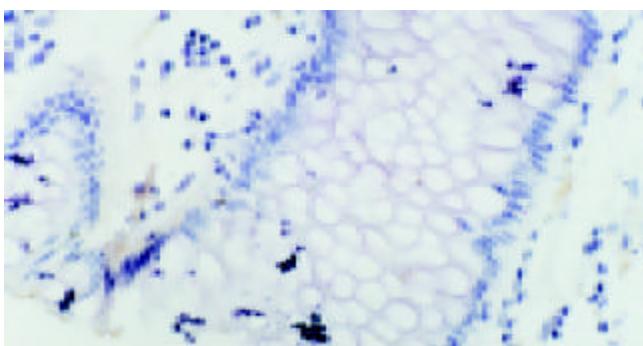


图3 正常VEGF。

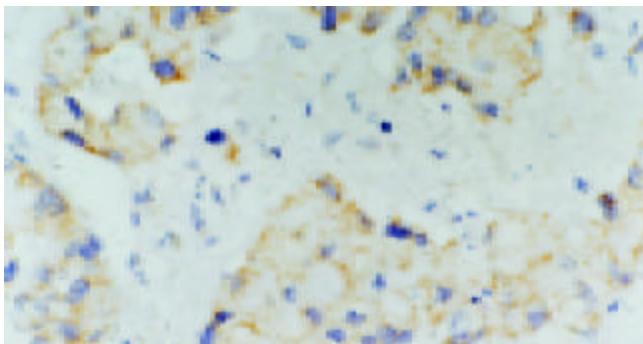


图4 c-MYC阳性 ×400。

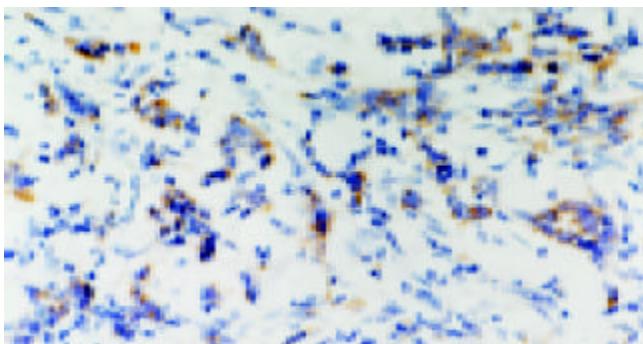


图5 VEGF阳性 ×400。

3 讨论

在许多肿瘤组织,如大肠癌、乳腺癌、小细胞肺癌、黑色素细胞癌等组织中均能检测到癌基因产物c-MYC的表达增加,并且其与肿瘤的侵袭性、分化及患者的

预后密切相关^[2-5]。近年来，研究人员发现c-MYC活化时也具有促进肿瘤血管生成的作用。Baudino et al^[6]发现，c-MYC^{-/-}的胚胎干细胞和卵黄囊内皮细胞VEGF表达减少，c-Myc^{-/-}的胚胎有明显的血管生成障碍，并且c-MYC^{-/-}的肿瘤细胞移植到SCID鼠后，形成的肿瘤明显减小。此外c-MYC^{-/-}的小鼠的表型与VEGF或其受体Flk-1缺失的小鼠相似，并且加入VEGF能恢复c-MYC^{-/-}的卵黄囊内皮细胞的生长缺陷。此外，Pelengaris et al^[1]发现c-MYC活化的转化细胞在恶变成癌时，能更早的形成血管及发生转移。VEGF也叫血管通透因子(VFP)，是一种强效血管生成因子，可促进血管内皮细胞增生，提高血管通透性，改变细胞外基质，从而促进血管生成。国内外学者^[7-10]研究发现VEGF与胃癌、大肠癌、肺癌等多种肿瘤的MVD、浸润、转移相关，并且与他们的发生、发展及患者的预后密切相关。经过VEGF受体反义核酸处理的胃癌细胞在移植到裸鼠后，癌细胞凋亡明显增加，腹腔转移率下降；并且人化的抗VEGF单克隆抗体(rhuMab VEGF)与常规化疗药物联合使用治疗已经发生转移的大肠癌患者，能改善其预后，延长患者的存活时间^[11-12]。我们的研究提示：c-MYC与VEGF的表达之间存在密切相关性，c-MYC可能不仅通过促进细胞的增生，抑制细胞分化而在大肠癌的发生、发展中发挥作用，而且还能经VEGF促进大肠癌血管的生成，进而有利于大肠癌的生长、转移。同时我们的研究还表明：并不是所有的VEGF的表达都依赖c-MYC。已有研究^[13-15]发现许多生长因子，如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF-α, TGF-β)、纤维母细胞生长因子(FGF)、组织因子(TF)等均能促进VEGF mRNA的表达，而且c-MYC阳性的大肠癌组织，也有少数的VEGF的表达是阴性的，这充分说明大肠癌发生的复杂性-机体的生理功能不是基因、蛋白之间单纯的线性关系决定的，一种基因或蛋白的表达总是受到许多基因或蛋白的调控，且一种生理功能也可经由许多种不同的途径而产生。但在一个肿瘤患者身上，可能某一功能的调控途径暂时是固定的，这鼓励我们应该深入研究他们之间的关系，从而可以为患者选择更好的个体化治疗方法。

4 参考文献

1 Pelengaris S, Khan M, Evan GI. Suppression of Myc-induced

- apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 2002;109:321-334
- 2 Cheah PY, Choo PH, Yao J, Eu KW, Seow-Choen F. A survival-stratification model of human colorectal carcinomas with beta-catenin and p27kip1. *Cancer* 2002;95:2479-2486
- 3 Schlagbauer-Wadl H, Griffioen M, Van Elsas A, Schrier PI, Pustelnik T, Eichler HG, Wolff K, Pehameberger H, Janser B. Influence of increased c-Myc expression on the growth characteristics of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999;112: 332-336
- 4 Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 2000;83:1688-1695
- 5 Volm M, Koomagi R. Prognostic relevance of c-Myc and caspase-3 for patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2000; 7:95-98
- 6 Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, Davis AC, Ihle JN, Cleveland JL. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 2002;16: 2530-2543
- 7 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 8 Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1227-1230
- 9 Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 2000;36:748-753
- 10 Yuan A, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT, Yang PC. Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2000; 89:475-483
- 11 Kamiyama M, Ichikawa Y, Ishikawa T, Chishima T, Hasegawa S, Hamaguchi Y, Nagashima Y, Miyagi Y, Mitsuhashi M, Hyndman D, Hoffman RM, Ohki S, Shimada H. VEGF receptor antisense therapy inhibits angiogenesis and peritoneal dissemination of human gastric cancer in nude mice. *Cancer Gene Ther* 2002;9:197-201
- 12 Kabbavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:60-65
- 13 Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arii S, Imamura M. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer* 2000;88:295-301
- 14 Breier G, Blum S, Peli J, Groot M, Wild C, Risau W, Reichmann E. Transforming growth factor-β and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2002;97:142-148
- 15 Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002;21:2000-2008

• 研究快报 •

胃肠道间质瘤端粒酶活性与细胞凋亡及 p53、Bcl-2 表达的关系

王强, 孙威, 秦晔, 于泽成, 朱健

王强, 孙威, 中国医科大学附属二院普外三科 辽宁省沈阳市 110004
 秦晔, 辽宁中医药大学附属医院普通外科 辽宁省沈阳市 110032
 于泽成, 沈阳市第一人民医院外科 辽宁省沈阳市 110041
 朱健, 沈阳市第五人民医院外科 辽宁省沈阳市 110023
 项目负责人: 王强, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院普外三科. wangqiang2003_31
 电话: 024-83955060 传真: 024-23929897
 收稿日期: 2003-10-30 接受日期: 2003-12-16

摘要

目的: 探讨端粒酶活性、细胞凋亡及 p53、Bcl-2 基因表达与胃肠道间质瘤(GIST)生物学行为的关系。

方法: 分别采用端粒酶活性试剂盒、原位末端标记和免疫组织化学的方法对38例GIST标本进行端粒酶活性、细胞凋亡和p53、Bcl-2基因表达的检测，并结合临床病理资料进行分析。

结果: GIST端粒酶活性阳性率在恶性中为85%(17/20), 在潜在恶性中为22.8%(2/9), 在良性中为0(0/9)(P<0.01); GIST细胞凋亡指数在恶性中为 11.7 ± 5.4 , 在潜在恶性中为 30.2 ± 5.6 , 在良性中为 45.2 ± 7.2 (P<0.05); 端粒酶阳性组细胞凋亡指数为 9.5 ± 5.7 , 阴性组为 22.9 ± 8.4 (P<0.01); 端粒酶阳性组p53阳性表达率为78.9%, 阴性组为40.0% (P<0.05); 端粒酶阳性组Bcl-2阳性表达率为84.2%, 阴性组为40.0% (P<0.05)。

结论: 端粒酶活性、细胞凋亡与GIST良恶性有关，他们的检测有助于GIST的临床病理诊断。

王强, 孙威, 秦晔, 于泽成, 朱健. 胃肠道间质瘤端粒酶活性与细胞凋亡及 p53、Bcl-2 表达的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(4):995-997
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/995.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)这一概念由Mazur et al [1]于1983年首先提出, 认为此类肿瘤起源于胃肠道固有肌层和黏膜肌层, 由梭形细胞和上皮细胞组成, 并根据其分化的不同及免疫组织化学检查结果分为肌肉型、神经型、混合型和未定型。GIST最终诊断有赖于术后标本的病理学检查和具有特征的免疫组织化学标记物酪氨酸激酶生长因子受体(CD117或C-Kit)和骨髓干细胞抗原(CD34)的检测。近年来国内外对其研究逐渐增多[1-7]。本文通过检测GIST中端粒酶活性、细胞凋亡及调节基因p53、Bcl-2表达, 探讨其临床病理意义以及他们之间的相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 从我院1996-06/2002-06手术切除的GIST病例中选择诊断明确、病历完整者38例。本组病例标本重新调出后, 均经同一病理医师进行复查并作免疫组织化学检测CD117和CD34, 结果CD117阳性率为92.1%(35/38), CD34阳性率为86.8%(33/38)。本组中男23例, 女15例, 27-74岁, 平均52.6岁。肿瘤部位: 胃17例, 小肠11例, 结直肠10例。按纪小龙 et al [8]提出的GIST分类标准, 区分为良性GIST9例, 潜在恶性GIST9例, 恶性GIST20例。另取10例正常胃肠道平滑肌组织(NSMT)作为对照, 取自胃肠道良性病变手术切除标本, 远离病变部位取材, 其中胃标本5例、肠标本5例。标本一部分放置-80℃低温冰箱保存, 一部分标本经100mL/L甲醛溶液固定、石蜡包埋、制成5μm厚组织切片。(1)试剂: 端粒酶检测试剂购于军事医学科学院放射医学研究所; 细胞凋亡检测试剂、p53、Bcl-2单克隆抗体、生物素标记二抗购于武汉博士德生物工程公司; S-P试剂盒为ZYME公司产品。(2)方法: 端粒酶活性检测: 按试剂盒说明进行操作, 具体步骤: 取约30-50mg组织, 剪碎, 裂解, 离心, 取上清。在反应管中依次加入TRAP混合物25μL, Taq酶0.2μL, 细胞提取液1μL, 混匀, 30℃保温30min, 反向引物0.5μL, 在DNA合成仪上进行PCR扩增。反应条件为: 94℃变性30s, 35℃退火30s, 72℃延伸30s, 循环30次。PCR反应产物在120mg/L聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 硝酸银染色。细胞凋亡检测: 采用原位末端标记法, 具体步骤: 玻片预先用0.1g/L多聚赖氨酸处理; 切片常规脱蜡至水化, 30mL/L H₂O₂10min, 蒸馏水洗3次; TBS1:100稀释的蛋白酶K, 37℃, 15min, 蒸馏水洗2min×3次; TdT和DIG-dUTP湿盒中37℃, 90min; TBS冲洗6min, 封闭液20min; 1:100抗-DIG-BIOTIN37℃, 湿盒中30min, TBS洗3min×3次; DAB显色避光10-30min, 水洗; 苏木精复染后脱水、透明、明胶封固。p53、Bcl-2检测: 采用免疫组织化学S-P法, 按试剂盒说明进行操作。结果判断: 端粒酶活性判断标准: 出现“梯形”条带者为阳性; 细胞凋亡判断标准: 以细胞核中有棕黄色颗粒、背景清晰者为阳性细胞, 由于后期DNA片段可透过核膜扩散至胞质, 故胞质亦可呈阳性。400倍显微镜下, 在标记良好区域选择10个视野计数, 每个视野计数100个细胞。凋亡指数(API)=阳性细胞总和/1000×100%; p53、Bcl-2判断标准: p53蛋白表达于细胞核, Bcl-2蛋白表达于细胞质, 均显示为棕黄色, 以着色细胞大于20%为阳性表达。

统计学处理 采用 χ^2 、t检验.

2 结果

2.1 端粒酶及细胞凋亡表达的检测结果 恶性GIST端粒酶阳性表达率明显高于潜在恶性GIST、良性GIST和NSMT(χ^2 检验, $P < 0.01$); 从NSMT、良性GIST、潜在恶性GIST到恶性GIST, 其API依次明显递减(先行方差齐性检验, 本组数据方差齐, 然后行t检验, $P < 0.05$) (表1).

表1 端粒酶活性、细胞凋亡在NSMT、GIST中的表达

组别	n	端粒酶		API (mean±SD)
		阳性(n)	阳性率(%)	
NSMT	10	-	-	72.1 ± 9.3
良性GIST	9	-	-	45.2 ± 7.2
潜在恶性GIST	9	2	22.8	30.2 ± 5.6
恶性GIST	20	17	85.0	11.7 ± 5.4

2.2 GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及p53、Bcl-2表达的关系 GIST中端粒酶阳性组API明显低于阴性组(先行方差齐性检验, 本组数据方差齐, 然后行t检验, $P < 0.01$), 二者间呈显著负相关; GIST中端粒酶阳性组p53阳性表达率明显高于阴性组(χ^2 检验, $P < 0.05$), 二者间呈显著正相关; GIST中端粒酶阳性组Bcl-2阳性表达率明显高于阴性组(χ^2 检验, $P < 0.05$), 二者间呈显著正相关(表2).

表2 GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及p53、Bcl-2表达的关系

组别	n	API (mean±SD)	p53阳性表达率	Bcl-2阳性表达率
端粒酶阳性组	19	9.5 ± 5.7 ^a	78.9% ^b	84.2% ^b
端粒酶阴性组	19	22.9 ± 8.4	40.0%	40.0%

^aP < 0.01, ^bP < 0.05 vs 阴性组.

3 讨论

端粒酶是一种包含自身模板RNA的核蛋白体. 活性状态下能发挥逆转录酶的作用, 特异性延长染色体末端端粒的重复DNA序列, 从而抵消或延缓端粒在正常情况下随细胞分裂次数的增加而不断短缩的变化, 使细胞发生永生化或恶变^[9-13]. 近年来大量实验研究表明, 多数恶性肿瘤端粒酶活性阳性^[14-18], 而良性肿瘤和正常体细胞中除少数生殖细胞、造血干细胞、生发层细胞具有端粒酶活性外, 均检测不到端粒酶活性^[19-23]. 端粒酶的这一特性使其敏感性和特异性超过以往任何肿瘤指标, 提示其在临床鉴别诊断和推测预后方面作用巨大. 有关端粒酶与GIST的研究较少, 本组中20例恶性GIST组织中端粒酶阳性表达率为85% (17 / 20), 这一结果与Shay et al^[15]报道的人类肿瘤平均端粒酶阳性率相近, 说明端粒酶也是恶性GIST较为理想的标记物. 15%(3/20)

的恶性GIST组织未检测到端粒酶阳性表达, 可能是因为存在“端粒酶旁路”机制或者可能端粒的短缩尚不足以激活端粒酶^[16-17]. 在潜在恶性GIST中有2例检测到端粒酶阳性表达, 对这2例标本进行了必要的重复检测及稀释后检测, 其结果一致, 不是假阳性, 因此对这2例应密切追踪观察, 以注意其有无恶变. 上述研究结果说明端粒酶活性检测可以鉴别良恶性GIST.

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是指在一定生理和病理情况下, 机体为维护内环境稳定, 通过基因调控而使细胞自动消亡的过程. 细胞凋亡在维持组织、器官的正常形态和功能方面起着重要的作用. 若基因突变使凋亡调控信号下调, 则发生突变的细胞得以生存, 并可异常增生, 最终形成肿瘤. 有研究表明^[24-30]: 细胞凋亡与肿瘤的发生、发展和转归密切相关. 有关GIST细胞凋亡的研究较少, 本研究显示细胞凋亡与GIST良恶性呈显著的负相关, 即随着GIST良恶性的改变, 其细胞凋亡越来越少.

细胞每分裂一次, 端粒的长度就相应的缩短, 但端粒缩短到一定程度时, 一方面细胞失去分裂能力而发生凋亡, 而另一方面细胞中的端粒酶可能被激活, 使端粒功能得以恢复^[31], 这就是端粒酶与凋亡之间内在和必然的联系. 我们将二者结合起来进行研究显示: GIST端粒酶活性与细胞凋亡之间呈显著负相关, 即肿瘤细胞端粒酶活性越高, 其细胞凋亡越少; 相反, 肿瘤细胞端粒酶活性降低, 其细胞凋亡则增加.

本研究同时还显示凋亡调节基因p53、Bcl-2表达与端粒酶活性呈显著正相关, 即p53、Bcl-2过表达时端粒酶活性增强, 这一结果与有的文献^[17, 21]报道相符, 但也有的文献^[22-23]报道其表达水平与端粒酶活性无关.

总之, 通过GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及调节基因的检测, 可为其良恶性鉴别及预后判断提供帮助. 同样以端粒酶和细胞凋亡为靶点, 筛选合适的治疗方式针对性地治疗GIST也可望成为一大措施. 当然, 由于本组病例数较少, 加之端粒酶活性与细胞凋亡之间的联系可能十分复杂, 其具体情况如何尚有待于我们今后通过细胞系的研究来进一步加以证实.

4 参考文献

- Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors: reappraisal of histogenesis. *Am J Pathol* 1983;7:507-519
- 万德森. 提高对胃肠道间质瘤的诊治水平. 中华胃肠外科杂志 2003;6:285-287
- 万德森, 伍小军, 梁小曼, 罗容珍, 潘忠志, 陈功, 卢震海, 丁培荣. 胃肠道间质瘤的外科治疗. 中华胃肠外科杂志 2003;6:288-291
- 张成武, 赵大建, 邹寿椿, 裴华森. 胃肠道间质瘤的诊断和治疗. 中华胃肠外科杂志 2003;6:292-294
- 张森, 万德森. 胃肠道间质瘤的诊治进展. 中华胃肠外科杂志 2003;6:347-349
- Yan H, Marchettini P, Acherman YI, Gething SA, Brun E, Sugarbaker PH. Prognostic assessment of gastrointestinal stromal tumor. *Am J Clin Oncol* 2003;26:221-228
- Kitamura Y, Hirota S, Nishida T. Gastrointestinal stromal tumors(GIST): A model for molecule-based diagnosis and treatment of solid tumors. *Cancer Sci* 2003;94:315-320

- 8 纪小龙, 赵海潞. 胃肠道平滑肌肿瘤的新认识. 华人消化杂志 1998;6:625-627
- 9 方向明, 于皆平, 罗和生. 大肠癌 hTERT 和 P16 表达与端粒酶活性的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:12-14
- 10 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
- 11 李贵新, 李国庆, 赵常在, 徐功立. 胃癌组织端粒酶 hTERT 与抑癌基因 P53 和 P16 表达的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:591-593
- 12 于会生, 郑国升, 孙金珍, 鄢群熬, 许迎霞, 刘红凌, 李华, 任冬霞, 李素敏, 黄明周. 食管癌前病变中端粒酶的检测及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:342-343
- 13 Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:781-786
- 14 Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem* 1997;43:708-714
- 15 Shay JW, Baccetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-791
- 16 Zaki VA. Life and cancer without telomerase. *Cell* 1997;91:1-3
- 17 马晋平, 詹文华. 端粒、端粒酶与消化道肿瘤. 国外医学外科分册 1997;24:194-197
- 18 Nowak J, Janusziewicz D, Lewandowski K, Nowicka-Kujawska K, Pernak M, Rembowska J, Nowak T, Wysocki J. Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:75-80
- 19 Usselmann B, Newbold M, Merris AG, Nwokolo CU. Telomerase activity and patient survival after surgery for gastric and oesophageal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:903-908
- 20 Goymola FA, Samper E, Martin-Caballero J, Finnon P, Herrera E, Flores JM, Bouffler SD, Blasco MA. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med* 2000;192:1625-1636
- 21 Mandal M, Kumar R, Poucock RE. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem* 1997;272:14183-14187
- 22 Milas M, Yu D, Sun D, Poucock RE. Telomerase activity of sarcoma cell lines and fibroblasts is independent of p53 status. *Clin Cancer Res* 1998;4:1573-1579
- 23 Oishi T, Kigawa J, Minagawa Y, Shimada M, Takahashi M, Terakawa N. Alteration of telomerase activity associated with development and extension of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998;91:568-571
- 24 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501
- 25 Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 1995;146:67-74
- 26 全俊, 胡国龄, 范学工, 谭德明. 丙型肝炎病毒核心区蛋白和细胞凋亡对 HepG₂ 细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:350-352
- 27 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 高晋华, 王振华. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡和增生与 p53 基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:1265-1268
- 28 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:526-530
- 29 王剑明, 邹倩, 邹生泉. 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
- 30 袁荣文, 丁庆, 姜汉英, 覃修福, 邹生泉, 夏穗生. 胰腺癌 Bcl-2, p53 蛋白表达和细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:851-854
- 31 Wright WE, Brasiskyte D, Piatyszek MA, Shay JW. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal normal cell hybrids. *EMBO J* 1996;15: 1734-1741

不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳, 川北医学院附属医院普外科
四川省南充市 637000
四川省卫生厅 2001 年 /2004 年度科学基金资助课题, No. 2001(41)
项目负责人: 王崇树, 637000, 四川省南充市, 川北医学院附属医院普外科.
chongs-wang@163.com
电话: 0817-2262082
收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2003-07-08

摘要

目的:通过常见消化道癌对不同抗癌药物以及不同联合用药方案的敏感性作比较,以期寻找各自的合理的化疗用药方案,从而指导不同消化道癌的化疗。

方法:通过肿瘤细胞体外药敏试验(即四甲基偶氮唑盐着色法. MTT),对97例食管癌、116例胃癌、34例肝癌以及169例大肠癌新鲜标本进行化疗药物敏感性检测,并对其结果作比较。

结果:除对丝裂霉素(mitomycin C, MMC)、顺氯氨铂(cisplatin, DDP)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)加DDP的敏感性无差异外($P > 0.05$),对其余所有药物的敏感

性均有显著性差异($P < 0.01$),其中,食管癌、胃癌及大肠癌均对 5-FU 加羟基喜树碱(hydroxycamptothecine, HCPT, OPT)、5-FU 加 MMC 最敏感,其敏感率分别为 79.4% 和 73.2%、78.4% 和 62.7%、60.4% 和 55.6%,肝癌则对 5-FU 加 MMC 及 5-FU 加柔红霉素(aunorubicin, DNR)最敏感,其敏感率分别为 70.5% 和 79.4%。

结论:不同的消化道肿瘤对不同抗癌药物的敏感性存在差异,且联合药物的敏感性优于单药。

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳. 不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):997-999

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/997.asp>

0 引言

如何选择对某一种具体肿瘤有效的抗癌药物,提高术后化疗效果,并寻找用药规律,一直是临床肿瘤化疗界关注的问题。我们采用 MTT 法对 416 例不同消化道癌

中，一方面可致气滞血瘀，结而成块；另一方面，又可随气升降流行附注于其他部位形成新的病灶，这一特点与肿瘤的生物学行为非常相类似。因此痰瘀交阻与肿瘤的形成和转移密切相关。消痰散结方主要由半夏、南星等燥湿化痰药组成，针对肿瘤痰瘀互结的特性，以化痰除痞、散结聚、消除肿块为目的，进而阻断肿瘤的生长和转移^[13-14]。中医辨证发现，临床患者均具有不同程度的痰瘀互结的现象，采用消痰散结中药治疗一段时间后，病情可得到不同程度的缓解，血清VEGF水平明显下降^[2]。本研究结果发现，中药组远处脏器转移率明显低于荷瘤对照组及5-FU化疗组，且中药组、荷瘤对照组在目的基因片断处均出现DNA条带，但中药组条带的宽窄及深浅与对照组均不一致，经计算机图像分析其面积灰度值表明，消方可使VEGF121、VEGF165、KDRmRNA表达水平显著下降，且在消方组中癌组织内VEGF、KDRmRNA表达量较化疗组癌组织表达量亦明显下降。提示消方可能通过下调VEGF、KDR基因进而起到抑制胃癌的生长及转移的作用，也有可能通过竞争性地抑制VEGF与其受体KDR的结合来抑制新生血管形成，来达到抑制肿瘤的生长转移。

4 参考文献

- 1 李相勇, 魏品康. 金龙蛇口服液治疗晚期胃癌的疗效观察. 湖北中医杂志 2001;23:3-5
- 2 魏品康, 许玲, 秦志丰, 张申, 李相勇, 郭晓东, 王建平, 李峻, 肖艳, 施俊, 刘咏英. 胃癌从痰论治的机制与临床研究. 中国中医基础医学杂志 2002;3:18-20
- 3 Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58-61
- 4 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
- 5 Kamei S, Kono K, Amemiya H, Takahashi A, Sug Ichihara F, Fujii H, Matsumoto Y. Evaluation of VEGF and VEGF-C expression in gastric cancer cells producing alpha-fetoprotein. *J Gastroenterol* 2003;38:540-547
- 6 Gururaj AE, Belakavadi M, Salimath BP. Antiangiogenic effects of butyric acid involve inhibition of VEGF/KDR gene expression and endothelial cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 2003;243:107-112
- 7 Lewy-Trenda I, Wierzchniewska-Lawska A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human thyroid tumors. *Pol J Pathol* 2002;53:129-132
- 8 Tang K, Breen EC, Wagner PD. Hu protein R-mediated post-transcriptional regulation of VEGF expression in rat gastrocnemius muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1497-1504
- 9 Mintz M, Blomgren B, Falconer C, Palmbiad J. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family in human endometrial blood vessels. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62:167-175
- 10 Wang D, Lehman RE, Donner DB, Matli MR, Warren RS, Welton ML. Expression and endocytosis of VEGF and its receptors in human colonic vascular endothelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G1088-1096
- 11 Waltenberger J, Claessen-Welsch L, Siegbahn A, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995
- 12 徐伯平. 痰瘀同源与癌瘤. 中医杂志 1997;38:378
- 13 王庆才. 恶性肿瘤从痰论治初探. 辽宁中医杂志 1996;23:209-211
- 14 钱彦方. 肿瘤从痰论治探讨. 中国中医基础医学杂志 1999;5:42-44

肝纤维化大鼠肝细胞凋亡和增生的关系

曲宝戈, 严茂祥, 陈芝芸, 项柏康

曲宝戈, 山东省泰山慢性病医院 山东省泰安市 271000
 严茂祥, 陈芝芸, 项柏康, 浙江省中医院消化研究室 浙江省杭州市 310006
 浙江省教委资助, No. 19990360
 项目负责人: 严茂祥, 310006, 浙江省杭州市邮电路54号, 浙江省中医院消化研究室. meshyale@sohu.com
 电话: 0571-87071380 传真: 0571-87077785
 收稿日期: 2003-05-10 接受日期: 2003-06-04

摘要

目的: 在四氯化碳诱导的实验性肝纤维化大鼠中研究肝细胞凋亡及Fas抗原和Bcl-2蛋白表达与增生细胞核抗原(PCNA)的关系。

方法: 将SD大鼠44只随机分成2组, 每组22只, 分别造模. 常规石蜡切片, TUNEL原位标记法检测细胞凋亡指数, 免疫组织化学法检测Fas抗原、Bcl-2蛋白和PCNA.

结果: 病理模型组实验大鼠肝组织细胞凋亡指数(AI)明显低于正常对照组(0.31 ± 0.12 vs 0.49 ± 0.10), $P < 0.01$ 。与正常对照组相比, 病理模型组实验大鼠肝组织Fas阳性表达计分明显降低(2.72 ± 0.47 vs 1.75 ± 0.67), $P < 0.01$ 。Fas与Bcl-2呈明显负相关($r = -0.67$, $P < 0.05$)。AI与Bcl-2($r = -0.28$, $P > 0.05$)、PI($r = -0.33$, $P > 0.05$)和Fas($r = 0.31$, $P > 0.05$)均无相关性。

结论: Fas和Bcl-2参与肝纤维化的发生过程中, 二者在其中起着相反的作用, 细胞凋亡在肝纤维化中明显低下, 而细胞增生无明显变化, 表明在肝纤维化中存在细胞凋亡和增生失衡。

曲宝戈, 严茂祥, 陈芝芸, 项柏康. 肝纤维化大鼠肝细胞凋亡和增生的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(4):990-993

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/990.asp>

0 引言

细胞增生和凋亡是相互伴随的，高增生时伴有凋亡指数增高。肝细胞中也存在着不同程度的增生和凋亡，但二者之间在肝纤维化中所起的作用尚不清楚。本研究通过检测在四氯化碳(CCl_4)诱发的大鼠肝纤维化肝组织中的细胞凋亡指数及相关基因表达产物(Fas抗原及Bcl-2蛋白)与增生细胞核抗原(PCNA)以便了解肝细胞凋亡和细胞增生在肝纤维化中的作用，对进一步阐明肝纤维化的发病机制具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 SD封闭群，清洁级大鼠44只，由西安实验动物中心提供，雌雄各半，体质量 90 ± 10 g。 CCl_4 分析纯由浙江荧光化工有限公司生产，批号：980512。CD95(Fas)多克隆抗体3 mL, Bcl-2多克隆抗体3 mL, 美国Santa Cruz公司产品；PCNA单克隆抗体3 mL, 美国ZYME公司产品；TUNEL细胞凋亡检测试剂盒APoPTag TM试剂盒，美国Intergen(Oncor)公司生产；DAKO Envision显色系统DAKO公司生产。病理切片机(LEICARM2025, 上海生产)、生物组织自动脱水机(S-12F, 武汉生产)、生物组织冷冻包埋机(BM-VI, 武汉生产)、Olympus光学显微镜(日本Olympus株式会社生产)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和造模 SD大鼠44只，自由饮水，标准饲料饲养。随机分成2组，每组22只：(1)正常对照组：以等量生理盐水皮下注射9 wk，并用等量生理盐水灌胃9 wk；(2)病理模型组：造模同时，用等量生理盐水灌胃9 wk；造模方法为：前4 wk各组动物按0.3 mL/100 g皮下注射400 mL/L CCl_4 (用色拉油稀释)，2次/wk，首次用量加倍。后5 wk各组动物按0.2 mL/100 g皮下注射体重400 mL/L CCl_4 ，2次/wk，共9 wk。正常对照组以等量生理盐水皮下注射。末次给药后24 h处死大鼠，取肝脏左叶以100 mL/L甲醛固定，石蜡切片用于检测。

1.2.2 HE染色 石蜡包埋后制成4 μ m厚连续切片，常规HE染色进行病理诊断。

1.2.3 TUNEL原位细胞凋亡检测方法 按APoPTag TM试剂盒操作说明进行。镜下观察阳性细胞，操作步骤中省略TdT酶作阴性对照。

1.2.4 免疫组化染色 检测细胞凋亡相关基因表达产物：Fas抗原及Bcl-2蛋白与PCNA。免疫组化染色采用二步法Envision工作程序。分别以TBS替代Fas多克隆抗体、Bcl-2多克隆抗体和PCNA单克隆抗体作阴性对照，以已知阳性的淋巴瘤组织切片作阳性对照。

1.3 观察指标

1.3.1 计算细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)及细胞增生指数(PCNA Index, PI)在光镜下观察TUNEL染色及PCNA免疫组化染色的显色反应，数5个以上高倍视野，每个视野计数100个细胞中的阳性细胞(染色的阳性物质呈棕黄色)数，取其平均值分别作为AI及PI。

1.3.2 Fas及Bcl-2蛋白 Fas免疫阳性反应颗粒位于胞膜和胞质，而Bcl-2位于胞质；为棕黄色颗粒。Fas以每个高倍视野阳性细胞数来计算：无阳性细胞表达为(-)，1-25为(±)，26-50为(+)，大于50为(++)，分别记为0、1、2、3分。Bcl-2参考Reiner et al [1]的标准加以改进分别为：无阳性细胞表达为(-)，小于10%为(±)，小于1/3为(+)，小于2/3为(++)，大于2/3为(++)，分别记为0、1、2、3、4分。

统计学处理 采用SPSS for window 10.0统计分析软件进行t检验和Spearman相关系数分析。

2 结果

2.1 大鼠肝组织 AI和PI 大鼠肝组织细胞凋亡表现为核固缩或破碎，与周围细胞连接松散，阳性细胞分布在小叶内，多散在于中央静脉周围及汇管区。PCNA阳性细胞散在于纤维间隔内或其周围，呈单个或散在不规则分布，阳性物质位于核内，呈棕黄色细小颗粒。病理模型组大鼠肝组织AI明显低于正常对照组，有非常显著的统计学意义($P < 0.01$)；两组大鼠肝组织PI对比则无统计学差异($P > 0.05$)（表1）。

表1 大鼠肝组织细胞的AI和PI(mean ± s, %)

组别	n	AI	PI
正常对照组	19	0.49 ± 0.10	0.47 ± 0.17
病理模型组	12	0.31 ± 0.12 ^a	0.46 ± 0.19

^a $P < 0.01$ vs 正常对照组。

2.2 大鼠肝组织Fas和Bcl-2表达情况 大鼠肝组织Fas表达以肝细胞质为主，呈弥漫性着色，部分表达在肝细胞膜上，阳性细胞呈灶状或团块状分布于肝小叶周边，主要在碎屑状坏死处密集。Bcl-2弥散分布于假小叶及其边缘，部分散在分布于中央静脉周围及汇管区。病理模型组大鼠肝组织Fas阳性表达较正常对照组明显降低($P < 0.01$)；病理模型组大鼠肝组织Bcl-2阳性表达较正常对照组明显增高，有显著的统计学差异($P < 0.01$)（表2）。

表2 大鼠肝组织Fas和Bcl-2阳性表达计分(mean ± s, %)

组别	n	Fas	Bcl-2
正常对照组	19	2.72 ± 0.47	1.55 ± 0.93
病理模型组	12	1.75 ± 0.67 ^a	2.92 ± 1.00

^a $P < 0.01$ vs 正常对照组。

2.3 病理模型组肝纤维化实验大鼠肝组织细胞凋亡和细胞增生相关基因表达产物之间的关系 Fas与Bcl-2呈明显负相关($r = -0.67$, $P < 0.05$)；AI与Bcl-2($r = -0.28$, $P > 0.05$)及Fas($r = 0.31$, $P > 0.05$)均无相关性；PI与AI($r = -0.33$, $P > 0.05$)和Bcl-2($r = 0.07$, $P > 0.05$)无相关性。

3 讨论

3.1 细胞凋亡在肝纤维化中的作用 细胞凋亡可能是不同类型肝病细胞死亡的共同通路^[2], 严重慢性病毒性肝炎患者肝细胞凋亡明显增加, 提示凋亡细胞的死亡可能参与慢性肝炎和肝硬化性肝损伤的发生^[3]. PBC患者肝中肝细胞和胆管上皮细胞凋亡率增加^[4]. 凋亡发生在CCl₄引起的肝硬化, 并参与肝硬化受损肝组织的再生反应^[5]. 本实验结果显示: 大鼠肝组织细胞凋亡表现为核固缩或破碎, 与周围细胞连接松散, 阳性细胞分布在小叶内, 多散在于中央静脉周围及汇管区. 病理模型组大鼠肝组织AI明显低于正常对照组, $P < 0.01$. 表明在CCl₄造模诱发肝纤维化大鼠中存在细胞凋亡不足.

Fas是介导细胞凋亡的细胞表面蛋白, 是凋亡因子受体. 细胞膜上的Fas起凋亡“按钮”的作用, Fas及FasL相互作用是介导肝细胞凋亡的主要途径^[6-7]. Fas和FasL可表达于不同的细胞导致凋亡(所谓trabs型凋亡), 也可以表达于同一细胞导致凋亡(所谓cis型凋亡)^[8]. Hiramatsu et al^[9]研究显示: 慢性肝炎Fas抗原阳性组其门脉周围、门脉区和小叶内炎症坏死程度均比阴性组严重. 本实验大鼠肝组织Fas阳性细胞表达的分布也具有上述类似特点. 本实验结果显示, 与正常对照组相比, 病理模型组实验大鼠肝组织Fas阳性表达计分明显降低, $P < 0.01$, 表明Fas参与肝纤维化发生. 但本实验结果表明AI和Fas无相关性($r = 0.31$, $P > 0.05$), 可能和细胞凋亡过程中Fas表达与染色质断裂发生的时相不同及凋亡细胞在组织中存在时间很短有关.

Bcl-2基因编码一个26 kD蛋白, Bcl-2过表达可抑制细胞凋亡, 从而使细胞增生和凋亡不平衡, 即细胞增生速度虽无改变, 但由于凋亡细胞的减少会导致细胞的相对增多^[10]. Bcl-2家族参与慢性肝病细胞凋亡的调节^[11]. 慢性肝炎门脉小胆管区Bcl-2阳性, 在新形成处, 尤其是活动性慢性肝炎和活动性肝硬化中Bcl-2表达最多^[12]. 肝细胞增生带中Bcl-2蛋白表达明显高于肝细胞坏死带^[13]. 本实验结果显示, 病理模型组大鼠肝组织Bcl-2阳性表达计分较正常对照组明显增高, $P < 0.01$, 表Bcl-2在肝纤维化中起一定的作用.

有研究显示, Bcl-2的过度表达可部分抑制Fas蛋白介导细胞凋亡信号的传导^[7]. 肝硬化中也见到FasL表达, 可见引起肝细胞变化的因素可能触发FasL表达, 并促进Fas/FasL介导的细胞凋亡的发生^[14]. 有人^[15]认为Bcl-2蛋白在细胞凋亡中起着与Fas抗原相反的作用. 肝硬化Bcl-2表达增加与肝癌发生有关^[16]. 本实验结果显示Fas与Bcl-2呈明显负相关($r = -0.67$, $P < 0.05$), 从而支持上述观点.

3.2 细胞增生在肝纤维化中的作用 PCNA是近年来发展的原位检测细胞增生活性的新型探针, 他是DNA聚合酶的辅助蛋白, 在细胞周期的G1期开始表达, S期达高峰, G2M期下降, 其量的变化与DNA合成一致, 能够反映细胞的增生活性^[17]. 有关PCNA表达与肝硬化或

肝纤维化关系的观点不一. Wyllie et al^[17]报道PCNA的表达增加说明肝细胞存在异常增生, 可能与其他基因异常(如p53、ras和myc等原癌基因突变)有关. Kawakita和Ojanguren et al^[18-19]发现肝硬化时, 肝细胞的增生能力相当低下. 而本实验结果与上述结论并不完全一致, 因而有待于进一步的探讨.

肝硬化小胆管和胆小管细胞增生活性增加与Bcl-2高表达相关^[20]. 但本实验结果表明PI和Bcl-2无相关性($r = 0.07$, $P > 0.05$), 因此认为Bcl-2对肝细胞增生的影响不明显.

3.3 肝纤维化大鼠肝组织细胞凋亡和增生的关系 Chen et al^[21]报道给予CCl₄72 h后肝细胞凋亡明显增加. 给予CCl₄15 wk后, 造模组肝细胞凋亡较对照组更明显. CCl₄引起的大鼠肝硬化中肝细胞增生持续存在, 尤其在CCl₄造模的实验中期更明显. 本实验未进行Fas抗原和PCNA免疫组化双染色, 因而无法知道其分布规律. 但本实验结果显示Fas和Bcl-2与PI无相关性($r = 0.30$, $P > 0.05$ $r = 0.07$, $P > 0.05$). 因此Fas和Bcl-2和细胞增生的确切关系尚待进一步研究.

正常情况下, 细胞凋亡和增生的平衡维持着细胞群体数量的相对恒定, 细胞凋亡调节着机体细胞增生与死亡之间的平衡, 维持组织器官正常生理功能及细胞数量的稳定, 细胞增生和/或凋亡的异常与许多疾病发生有密切的关系. 本实验结果显示: PI和AI呈负相关, 表明在肝纤维化中存在细胞凋亡和增生的失衡.

4 参考文献

- 1 Reiner A, Reiner G, Spona J, Schemper M, Holzner JH. Histopathologic characterization of human breast cancer in correlation with estrogen receptor status. *Cancer* 1988;61:1149-1154
- 2 Jiang Z, Liu Y, Savas L, Smith L, Bonkovsky H, Baker S, Banner B. Frequency and distribution of DNA fragmentation as a marker of cell death in chronic liver diseases. *Virchows Arch* 1997;431:189-194
- 3 Papakyriakou P, Tzardi M, Valatas V, Kanavaros P, Karydi E, Notas G, Xidakis C, Kouroumalis E. Apoptosis and apoptosis related proteins in chronic viral liver disease. *Apoptosis* 2002;7:133-141
- 4 Sakisaka S, Koga H, Sasatomi K, Mimura Y, Kawaguchi T, Tanikawa K. Biliary secretion of endotoxin and pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Yale J Biol Med* 1997; 70:403-408
- 5 Masson S, Scotte M, Garnier S, Francois A, Hiron M, Teniere P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats. *Apoptosis* 2000;5:173-179
- 6 Mochizuki K, Hayashi N, Hiramatsu N, Katayama K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Fas antigen expression in liver tissue of patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1996;24:1-7
- 7 Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monocloned antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245:301-304
- 8 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267: 1449-1456
- 9 Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;19:1354-1356

- 10 Kennedy MM, Lamb D, King G, Kerr KM. Cell proliferation, cell loss and expression of bcl-2 and P53 in human pulmonary neoplasms. *Br J Cancer* 1997;75:545
- 11 Chen N, Deng T, Chen P, Li L. The regulation of apoptosis by Bcl-2, bcl-X(L), Bcl-2alpha and Bax in chronic liver disease. *Zhonghua Neike Zazhi* 2000;39:808-810
- 12 Nakopoulou L, Stefanaki K, Vourlakou C, Manolaki N, Gkiopoulou H, Michalopoulos G. Bcl-2 protein expression in acute and chronic hepatitis cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 1999;195:19-24
- 13 Zhang B, Zhang D, Ma Y. Expressions of Bcl-2, Bax and Bak proteins in liver tissues of hepatitis B patients and their significance. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1999;7:74-76
- 14 Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251
- 15 Luo KX, Zhu YF, Zhang LX, He HT, Wang XS, Zhang L. In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases. *J Viral Hepat* 1997;4:303-307
- 16 Frommel TO, Yong S, Zarling EJ. Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 gene family expression in liver of hepatitis C and cirrhotic patients: a novel mechanism to explain the high incidence of hepatocarcinoma in cirrhotics. *Am J Gastroenterol* 1999;94:178-182
- 17 Wyllie AH. Apoptosis. Death gets a brakse. *Nature* 1994;369:272-273
- 18 Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H, Yanai A, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Monna T. Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver disease fixed in formaldehyde. *Am J Pathol* 1992;140:513-520
- 19 Ojanguren I, Ariza A, Llatjos M, Castella E, Mate JL, Navas-Palacios JJ. Proliferating cell nuclear antigen expression in normal regenerative and neoplastic liver, a fine-needle aspiration cytology and biopsy study. *Hum Pathol* 1993;24:905-908
- 20 Gapany C, Zhao M, Zimmermann A. The apoptosis protector, bcl-2 protein, is downregulated in bile duct epithelial cells of human liver allografts. *J Hepatol* 1997;26:535-542
- 21 Chen L, Yang Z, Qiu F. Studies on hepatocyte apoptosis, proliferation and oncogene c-fos expression in carbon tetrachloride-induced cirrhotic rat liver. *J Tongji Med Univ* 1999;19:53-55

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 •

大肠组织中 PTEN 表达在大肠癌诊断与预后中的临床意义

孙文洲, 武春龙, 于丽波, 潘林娜

孙文洲, 武春龙, 于丽波, 潘林娜, 哈尔滨医科大学第三临床医学院
黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人: 孙文洲, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号, 哈尔滨医科大学第三临床医学院 sunwenzhou2003@yahoo.com.cn
电话: 0451-86677580-2022
收稿日期: 2003-11-05 接受日期: 2003-12-06

摘要

目的: 探讨 PTEN 的表达在大肠癌发生、发展中的作用及其在预后判断中的临床意义。

方法: 采用免疫组化 S-P 方法对 12 例正常大肠组织, 45 例大肠癌组织进行 PTEN 蛋白表达的研究。

结果: 大肠癌组织中 PTEN 蛋白阳性表达率(42.22%), 明显低于正常大肠组织(91.67%), 两组比较有显著性差异($P < 0.05$). PTEN 蛋白表达与大肠癌肿瘤大小、患者年龄、组织分级、临床分期无关。PTEN 蛋白的表达与大肠癌淋巴结转移、远处脏器转移及预后有关。

结论: PTEN 蛋白的异常表达参与了大肠癌的癌变过程, PTEN 可以作为判断大肠癌浸润和转移的分子学指标, 并对大肠癌预后有一定的参考价值。

孙文洲, 武春龙, 于丽波, 潘林娜. 大肠组织中 PTEN 表达在大肠癌诊断与预后中的临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(4):993-994
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/993.asp>

0 引言

PTEN 是近年来发现的一种新的抑癌基因, 具有双重特异性磷酸酶活性, 人类多种肿瘤中存在 PTEN 的异常表达, 国内外关于 PTEN 基因突变分析方面的文献较多, 但关于 PTEN 基因在大肠癌组织中表达的文献较少, 本文采用免疫组化 S-P 方法研究正常大肠组织、大肠癌组织 PTEN 蛋白表达, 分析其与临床病理特征、患者预后的关系, 初步探讨 PTEN 在大肠癌进展中的作用机制, 为大肠癌的临床治疗、预后判断提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院外科 1994-01/1997-10 手术标本存档蜡块, 大肠癌组织 45 例, 上述实验标本蜡块存档完好, 临床病理资料完整, 并均获 5 a 以上的随访, 病理分型和组织分级按 WHO 分类标准, 分期按 TNM 标准。患者年龄 25-71 岁, 平均 58 岁。男 31 例, 女 14 例。肿瘤位于右半结肠 8 例, 左半结肠 6 例, 横结肠 2 例, 直肠 29 例。术前未接受化疗及放疗。选取 45 例大肠癌组织中 12 例癌旁组织, 经病理学检查确诊为正常组织, 作为正常对照组。蜡块常规制备 4 μm 连续切片 2 张, 1 张行 HE 染色复查诊断, 另 1 张行免疫组化检测。

- 10 Kennedy MM, Lamb D, King G, Kerr KM. Cell proliferation, cell loss and expression of bcl-2 and P53 in human pulmonary neoplasms. *Br J Cancer* 1997;75:545
- 11 Chen N, Deng T, Chen P, Li L. The regulation of apoptosis by Bcl-2, bcl-X(L), Bcl-2alpha and Bax in chronic liver disease. *Zhonghua Neike Zazhi* 2000;39:808-810
- 12 Nakopoulou L, Stefanaki K, Vourlakou C, Manolaki N, Gkiopoulou H, Michalopoulos G. Bcl-2 protein expression in acute and chronic hepatitis cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 1999;195:19-24
- 13 Zhang B, Zhang D, Ma Y. Expressions of Bcl-2, Bax and Bak proteins in liver tissues of hepatitis B patients and their significance. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1999;7:74-76
- 14 Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251
- 15 Luo KX, Zhu YF, Zhang LX, He HT, Wang XS, Zhang L. In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases. *J Viral Hepat* 1997;4:303-307
- 16 Frommel TO, Yong S, Zarling EJ. Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 gene family expression in liver of hepatitis C and cirrhotic patients: a novel mechanism to explain the high incidence of hepatocarcinoma in cirrhotics. *Am J Gastroenterol* 1999;94:178-182
- 17 Wyllie AH. Apoptosis. Death gets a brakse. *Nature* 1994;369:272-273
- 18 Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H, Yanai A, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Monna T. Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver disease fixed in formaldehyde. *Am J Pathol* 1992;140:513-520
- 19 Ojanguren I, Ariza A, Llatjos M, Castella E, Mate JL, Navas-Palacios JJ. Proliferating cell nuclear antigen expression in normal regenerative and neoplastic liver, a fine-needle aspiration cytology and biopsy study. *Hum Pathol* 1993;24:905-908
- 20 Gapany C, Zhao M, Zimmermann A. The apoptosis protector, bcl-2 protein, is downregulated in bile duct epithelial cells of human liver allografts. *J Hepatol* 1997;26:535-542
- 21 Chen L, Yang Z, Qiu F. Studies on hepatocyte apoptosis, proliferation and oncogene c-fos expression in carbon tetrachloride-induced cirrhotic rat liver. *J Tongji Med Univ* 1999;19:53-55

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 •

大肠组织中 PTEN 表达在大肠癌诊断与预后中的临床意义

孙文洲, 武春龙, 于丽波, 潘林娜

孙文洲, 武春龙, 于丽波, 潘林娜, 哈尔滨医科大学第三临床医学院
黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人: 孙文洲, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号, 哈尔滨医科大学第三临床医学院. sunwenzhou2003@yahoo.com.cn
电话: 0451-86677580-2022
收稿日期: 2003-11-05 接受日期: 2003-12-06

摘要

目的: 探讨 PTEN 的表达在大肠癌发生、发展中的作用及其在预后判断中的临床意义.

方法: 采用免疫组化 S-P 方法对 12 例正常大肠组织, 45 例大肠癌组织进行 PTEN 蛋白表达的研究.

结果: 大肠癌组织中 PTEN 蛋白阳性表达率(42.22%), 明显低于正常大肠组织(91.67%), 两组比较有显著性差异($P < 0.05$). PTEN 蛋白表达与大肠癌肿瘤大小、患者年龄、组织分级、临床分期无关. PTEN 蛋白的表达与大肠癌淋巴结转移、远处脏器转移及预后有关.

结论: PTEN 蛋白的异常表达参与了大肠癌的癌变过程, PTEN 可以作为判断大肠癌浸润和转移的分子学指标, 并对大肠癌预后有一定的参考价值.

孙文洲, 武春龙, 于丽波, 潘林娜. 大肠组织中 PTEN 表达在大肠癌诊断与预后中的临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(4):993-994
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/993.asp>

0 引言

PTEN 是近年来发现的一种新的抑癌基因, 具有双重特异性磷酸酶活性, 人类多种肿瘤中存在 PTEN 的异常表达, 国内外关于 PTEN 基因突变分析方面的文献较多, 但关于 PTEN 基因在大肠癌组织中表达的文献较少, 本文采用免疫组化 S-P 方法研究正常大肠组织、大肠癌组织 PTEN 蛋白表达, 分析其与临床病理特征、患者预后的关系, 初步探讨 PTEN 在大肠癌进展中的作用机制, 为大肠癌的临床治疗、预后判断提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院外科 1994-01/1997-10 手术标本存档蜡块, 大肠癌组织 45 例, 上述实验标本蜡块存档完好, 临床病理资料完整, 并均获 5 a 以上的随访, 病理分型和组织分级按 WHO 分类标准, 分期按 TNM 标准. 患者年龄 25-71 岁, 平均 58 岁. 男 31 例, 女 14 例. 肿瘤位于右半结肠 8 例, 左半结肠 6 例, 横结肠 2 例, 直肠 29 例. 术前未接受化疗及放疗. 选取 45 例大肠癌组织中 12 例癌旁组织, 经病理学检查确诊为正常组织, 作为正常对照组. 蜡块常规制备 4 μm 连续切片 2 张, 1 张行 HE 染色复查诊断, 另 1 张行免疫组化检测.

1.2 方法 免疫组化染色采用S-P法, 免单克隆抗PTEN蛋白抗体为美国NEOMARKER公司产品, S-P试剂盒由福州迈新生物技术公司提供。用已知的阳性切片作为阳性对照, 用PBS代替一抗作阴性对照。实验严格按试剂盒说明书操作。结果判定: 用光学显微镜检查显色反应。PTEN的阳性染色主要定位于细胞质中, 偶可见于细胞核或细胞膜, 以出现棕黄色颗粒为阳性信号。判断标准: 每例均随机观察5个高倍视野, 用半定量积分法判断结果, 每张切片阳性细胞数小于5%为0分, 6~25%为1分, 26~50%为2分, 51~75%为3分, 大于75%为4分; 阳性强度黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。二者积分相乘, 0分为阴性(-), 1~4分为弱阳性(+), 5~8分为中度阳性(++)+, 9~12分为强阳性(++++)。

统计学处理 数据经SAS软件处理, 采用 χ^2 检验进行统计学分析。

2 结果

PTEN在正常大肠组织中阳性率为91.67%, 大肠癌组织中PTEN表达率为42.22%, 大肠癌组织中PTEN蛋白表达与正常大肠组织有显著性差异($P < 0.05$, 表1)。

患者的年龄、肿瘤的大小、病理分级、临床分期与PTEN的表达无关。伴有3个以上淋巴结转移、有远处脏器转移的肿瘤, PTEN的表达与对照组比较明显下降, 有显著差异($P < 0.05$)。存活5 a以上者的PTEN蛋白阳性表达率58.33%(14/24), 明显高于死亡者23.81%(5/21), 两组之间有显著差异($P < 0.05$, 表2)。

表1 PTEN在不同大肠组织的表达

组别	n	PTEN				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
正常大肠组织	12	1	6	3	2	91.67
大肠癌组织	45	26	18	1	0	42.22

表2 大肠癌组织中PTEN的表达与临床及病理学特征之间的关系

临床病理因素	n	PTEN		P值
		(-)	(+ - ++)	
年龄(年)				> 0.05
≤ 50	19	9	10	
> 50	26	17	9	
肿瘤大小(cm)				> 0.05
≤ 3	14	7	7	
> 3	31	19	12	
淋巴结转移				< 0.05
0~3	19	7	12	
> 3	26	19	7	
组织分化				> 0.05

高, 中	25	13	12
低	20	13	7
TNM分期			> 0.05
I+ II	10	4	6
III+ IV	35	22	13
远处转移			< 0.05
无	36	18	18
有	9	8	1
生存时间(年)			< 0.05
≥ 5	24	10	14
< 5	21	16	5

3 讨论

PTEN基因是1997年发现并命名的一种抑癌基因, 立即成为癌变机制研究的热点, 其定位于10q23.3, 研究发现, 人体多种肿瘤有第10q23.3染色体的杂合性丢失, 并与肿瘤的发生、发展有关。PTEN有促进细胞凋亡、参与细胞周期调控、抑制细胞黏附等重要的生物学功能^[1~4]。PTEN基因的异常表达使PTEN的正常功能减弱, 导致癌细胞黏附力下降、细胞分化降低、从而侵袭性增强, 发生淋巴结转移。

本研究结果表明, PTEN在正常大肠组织、大肠癌组织中的表达逐级降低, 大肠癌组织中的表达为42.22%, 与国内报道的结果类似^[5]。Gu et al^[6]利用基因转染实验研究发现, PTEN可使FAK脱磷酸化, 从而阻止整合素介导的细胞迁移和局灶黏附的形成, 也可阻断Shc/MAOK通路, 抑制细胞的无方向性随机迁移。PTEN失活或突变有利于肿瘤细胞的浸润和转移的发生。本研究结果表明与此相符, 有多个淋巴结转移、远处脏器转移的肿瘤中, PTEN的表达明显下降。侵袭转移导致的恶性发展, 使患者的生存期缩短, 本研究发现, PTEN表达减弱伴有患者生存期的缩短, 提示PTEN表达的下降参与大肠癌的进展, 可能对预测患者的预后有一定的价值。

4 参考文献

- 1 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280:1614~1617
- 2 Liliental J, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zheng Y, Sun H, Wu H. Genetic deletion of the PTEN tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol* 2000;10:401~404
- 3 Hwang PH, Yi HK, Kim DS, Nam SY, Kim JS, Lee DY. Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Cancer Lett* 2001;172:83~91
- 4 Haier J, Nicolson GL. PTEN regulates tumor cell adhesion of colon carcinoma cells under dynamic conditions of fluid flow. *Oncogene* 2002;21:1450~1460
- 5 林震, 张桂英. 大肠黏膜癌变过程中PTEN和P27的表达及相关性研究. 中国现代医学杂志 2002;12:29~32
- 6 Gu JG, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 1998;143:1375~1383

• 研究快报 •

胃肠道间质瘤端粒酶活性与细胞凋亡及 p53、Bcl-2 表达的关系

王强, 孙威, 秦晔, 于泽成, 朱健

王强, 孙威, 中国医科大学附属二院普外三科 辽宁省沈阳市 110004
 秦晔, 辽宁中医药大学附属医院普通外科 辽宁省沈阳市 110032
 于泽成, 沈阳市第一人民医院外科 辽宁省沈阳市 110041
 朱健, 沈阳市第五人民医院外科 辽宁省沈阳市 110023
 项目负责人: 王强, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院普外三科. wangqiang2003_31
 电话: 024-83955060 传真: 024-23929897
 收稿日期: 2003-10-30 接受日期: 2003-12-16

摘要

目的: 探讨端粒酶活性、细胞凋亡及 p53、Bcl-2 基因表达与胃肠道间质瘤(GIST)生物学行为的关系。

方法: 分别采用端粒酶活性试剂盒、原位末端标记和免疫组织化学的方法对38例GIST标本进行端粒酶活性、细胞凋亡和p53、Bcl-2基因表达的检测，并结合临床病理资料进行分析。

结果: GIST端粒酶活性阳性率在恶性中为85%(17/20), 在潜在恶性中为22.8%(2/9), 在良性中为0(0/9)(P<0.01); GIST细胞凋亡指数在恶性中为 11.7 ± 5.4 , 在潜在恶性中为 30.2 ± 5.6 , 在良性中为 45.2 ± 7.2 (P<0.05); 端粒酶阳性组细胞凋亡指数为 9.5 ± 5.7 , 阴性组为 22.9 ± 8.4 (P<0.01); 端粒酶阳性组p53阳性表达率为78.9%, 阴性组为40.0% (P<0.05); 端粒酶阳性组Bcl-2阳性表达率为84.2%, 阴性组为40.0% (P<0.05)。

结论: 端粒酶活性、细胞凋亡与GIST良恶性有关，他们的检测有助于GIST的临床病理诊断。

王强, 孙威, 秦晔, 于泽成, 朱健. 胃肠道间质瘤端粒酶活性与细胞凋亡及 p53、Bcl-2 表达的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(4):995-997
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/995.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)这一概念由Mazur et al [1]于1983年首先提出, 认为此类肿瘤起源于胃肠道固有肌层和黏膜肌层, 由梭形细胞和上皮细胞组成, 并根据其分化的不同及免疫组织化学检查结果分为肌肉型、神经型、混合型和未定型。GIST最终诊断有赖于术后标本的病理学检查和具有特征的免疫组织化学标记物酪氨酸激酶生长因子受体(CD117或C-Kit)和骨髓干细胞抗原(CD34)的检测。近年来国内外对其研究逐渐增多[1-7]。本文通过检测GIST中端粒酶活性、细胞凋亡及调节基因p53、Bcl-2表达, 探讨其临床病理意义以及他们之间的相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 从我院1996-06/2002-06手术切除的GIST病例中选择诊断明确、病历完整者38例。本组病例标本重新调出后, 均经同一病理医师进行复查并作免疫组织化学检测CD117和CD34, 结果CD117阳性率为92.1%(35/38), CD34阳性率为86.8%(33/38)。本组中男23例, 女15例, 27-74岁, 平均52.6岁。肿瘤部位: 胃17例, 小肠11例, 结直肠10例。按纪小龙 et al [8]提出的GIST分类标准, 区分为良性GIST9例, 潜在恶性GIST9例, 恶性GIST20例。另取10例正常胃肠道平滑肌组织(NSMT)作为对照, 取自胃肠道良性病变手术切除标本, 远离病变部位取材, 其中胃标本5例、肠标本5例。标本一部分放置-80℃低温冰箱保存, 一部分标本经100mL/L甲醛溶液固定、石蜡包埋、制成5μm厚组织切片。(1)试剂: 端粒酶检测试剂购于军事医学科学院放射医学研究所; 细胞凋亡检测试剂、p53、Bcl-2单克隆抗体、生物素标记二抗购于武汉博士德生物工程公司; S-P试剂盒为ZYME公司产品。(2)方法: 端粒酶活性检测: 按试剂盒说明进行操作, 具体步骤: 取约30-50mg组织, 剪碎, 裂解, 离心, 取上清。在反应管中依次加入TRAP混合物25μL, Taq酶0.2μL, 细胞提取液1μL, 混匀, 30℃保温30min, 反向引物0.5μL, 在DNA合成仪上进行PCR扩增。反应条件为: 94℃变性30s, 35℃退火30s, 72℃延伸30s, 循环30次。PCR反应产物在120mg/L聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 硝酸银染色。细胞凋亡检测: 采用原位末端标记法, 具体步骤: 玻片预先用0.1g/L多聚赖氨酸处理; 切片常规脱蜡至水化, 30mL/L H₂O₂10min, 蒸馏水洗3次; TBS1:100稀释的蛋白酶K, 37℃, 15min, 蒸馏水洗2min×3次; TdT和DIG-dUTP湿盒中37℃, 90min; TBS冲洗6min, 封闭液20min; 1:100抗-DIG-BIOTIN37℃, 湿盒中30min, TBS洗3min×3次; DAB显色避光10-30min, 水洗; 苏木精复染后脱水、透明、明胶封固。p53、Bcl-2检测: 采用免疫组织化学S-P法, 按试剂盒说明进行操作。结果判断: 端粒酶活性判断标准: 出现“梯形”条带者为阳性; 细胞凋亡判断标准: 以细胞核中有棕黄色颗粒、背景清晰者为阳性细胞, 由于后期DNA片段可透过核膜扩散至胞质, 故胞质亦可呈阳性。400倍显微镜下, 在标记良好区域选择10个视野计数, 每个视野计数100个细胞。凋亡指数(API)=阳性细胞总和/1000×100%; p53、Bcl-2判断标准: p53蛋白表达于细胞核, Bcl-2蛋白表达于细胞质, 均显示为棕黄色, 以着色细胞大于20%为阳性表达。

统计学处理 采用 χ^2 、t检验.

2 结果

2.1 端粒酶及细胞凋亡表达的检测结果 恶性GIST端粒酶阳性表达率明显高于潜在恶性GIST、良性GIST和NSMT(χ^2 检验, $P < 0.01$); 从NSMT、良性GIST、潜在恶性GIST到恶性GIST, 其API依次明显递减(先行方差齐性检验, 本组数据方差齐, 然后行t检验, $P < 0.05$) (表1).

表1 端粒酶活性、细胞凋亡在NSMT、GIST中的表达

组别	n	端粒酶		API (mean±SD)
		阳性(n)	阳性率(%)	
NSMT	10	-	-	72.1 ± 9.3
良性GIST	9	-	-	45.2 ± 7.2
潜在恶性GIST	9	2	22.8	30.2 ± 5.6
恶性GIST	20	17	85.0	11.7 ± 5.4

2.2 GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及p53、Bcl-2表达的关系 GIST中端粒酶阳性组API明显低于阴性组(先行方差齐性检验, 本组数据方差齐, 然后行t检验, $P < 0.01$), 二者间呈显著负相关; GIST中端粒酶阳性组p53阳性表达率明显高于阴性组(χ^2 检验, $P < 0.05$), 二者间呈显著正相关; GIST中端粒酶阳性组Bcl-2阳性表达率明显高于阴性组(χ^2 检验, $P < 0.05$), 二者间呈显著正相关(表2).

表2 GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及p53、Bcl-2表达的关系

组别	n	API (mean±SD)	p53阳性表达率	Bcl-2阳性表达率
端粒酶阳性组	19	9.5 ± 5.7 ^a	78.9% ^b	84.2% ^b
端粒酶阴性组	19	22.9 ± 8.4	40.0%	40.0%

^aP < 0.01, ^bP < 0.05 vs 阴性组.

3 讨论

端粒酶是一种包含自身模板RNA的核蛋白体. 活性状态下能发挥逆转录酶的作用, 特异性延长染色体末端端粒的重复DNA序列, 从而抵消或延缓端粒在正常情况下随细胞分裂次数的增加而不断短缩的变化, 使细胞发生永生化或恶变^[9-13]. 近年来大量实验研究表明, 多数恶性肿瘤端粒酶活性阳性^[14-18], 而良性肿瘤和正常体细胞中除少数生殖细胞、造血干细胞、生发层细胞具有端粒酶活性外, 均检测不到端粒酶活性^[19-23]. 端粒酶的这一特性使其敏感性和特异性超过以往任何肿瘤指标, 提示其在临床鉴别诊断和推测预后方面作用巨大. 有关端粒酶与GIST的研究较少, 本组中20例恶性GIST组织中端粒酶阳性表达率为85% (17 / 20), 这一结果与Shay et al^[15]报道的人类肿瘤平均端粒酶阳性率相近, 说明端粒酶也是恶性GIST较为理想的标记物. 15%(3/20)

的恶性GIST组织未检测到端粒酶阳性表达, 可能是因为存在“端粒酶旁路”机制或者可能端粒的短缩尚不足以激活端粒酶^[16-17]. 在潜在恶性GIST中有2例检测到端粒酶阳性表达, 对这2例标本进行了必要的重复检测及稀释后检测, 其结果一致, 不是假阳性, 因此对这2例应密切追踪观察, 以注意其有无恶变. 上述研究结果说明端粒酶活性检测可以鉴别良恶性GIST.

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是指在一定生理和病理情况下, 机体为维护内环境稳定, 通过基因调控而使细胞自动消亡的过程. 细胞凋亡在维持组织、器官的正常形态和功能方面起着重要的作用. 若基因突变使凋亡调控信号下调, 则发生突变的细胞得以生存, 并可异常增生, 最终形成肿瘤. 有研究表明^[24-30]: 细胞凋亡与肿瘤的发生、发展和转归密切相关. 有关GIST细胞凋亡的研究较少, 本研究显示细胞凋亡与GIST良恶性呈显著的负相关, 即随着GIST良恶性的改变, 其细胞凋亡越来越少.

细胞每分裂一次, 端粒的长度就相应的缩短, 但端粒缩短到一定程度时, 一方面细胞失去分裂能力而发生凋亡, 而另一方面细胞中的端粒酶可能被激活, 使端粒功能得以恢复^[31], 这就是端粒酶与凋亡之间内在和必然的联系. 我们将二者结合起来进行研究显示: GIST端粒酶活性与细胞凋亡之间呈显著负相关, 即肿瘤细胞端粒酶活性越高, 其细胞凋亡越少; 相反, 肿瘤细胞端粒酶活性降低, 其细胞凋亡则增加.

本研究同时还显示凋亡调节基因p53、Bcl-2表达与端粒酶活性呈显著正相关, 即p53、Bcl-2过表达时端粒酶活性增强, 这一结果与有的文献[17, 21]报道相符, 但也有的文献[22-23]报道其表达水平与端粒酶活性无关.

总之, 通过GIST中端粒酶活性与细胞凋亡及调节基因的检测, 可为其良恶性鉴别及预后判断提供帮助. 同样以端粒酶和细胞凋亡为靶点, 筛选合适的治疗方式针对性地治疗GIST也可望成为一大措施. 当然, 由于本组病例数较少, 加之端粒酶活性与细胞凋亡之间的联系可能十分复杂, 其具体情况如何尚有待于我们今后通过细胞系的研究来进一步加以证实.

4 参考文献

- Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors: reappraisal of histogenesis. *Am J Pathol* 1983;7:507-519
- 万德森. 提高对胃肠道间质瘤的诊治水平. 中华胃肠外科杂志 2003;6:285-287
- 万德森, 伍小军, 梁小曼, 罗容珍, 潘忠志, 陈功, 卢震海, 丁培荣. 胃肠道间质瘤的外科治疗. 中华胃肠外科杂志 2003;6:288-291
- 张成武, 赵大建, 邹寿椿, 裴华森. 胃肠道间质瘤的诊断和治疗. 中华胃肠外科杂志 2003;6:292-294
- 张森, 万德森. 胃肠道间质瘤的诊治进展. 中华胃肠外科杂志 2003;6:347-349
- Yan H, Marchettini P, Acherman YI, Gething SA, Brun E, Sugarbaker PH. Prognostic assessment of gastrointestinal stromal tumor. *Am J Clin Oncol* 2003;26:221-228
- Kitamura Y, Hirota S, Nishida T. Gastrointestinal stromal tumors(GIST): A model for molecule-based diagnosis and treatment of solid tumors. *Cancer Sci* 2003;94:315-320

- 8 纪小龙, 赵海潞. 胃肠道平滑肌肿瘤的新认识. 华人消化杂志 1998;6:625-627
- 9 方向明, 于皆平, 罗和生. 大肠癌 hTERT 和 P16 表达与端粒酶活性的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:12-14
- 10 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
- 11 李贵新, 李国庆, 赵常在, 徐功立. 胃癌组织端粒酶 hTERT 与抑癌基因 P53 和 P16 表达的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:591-593
- 12 于会生, 郑国升, 孙金珍, 鄢群熬, 许迎霞, 刘红凌, 李华, 任冬霞, 李素敏, 黄明周. 食管癌前病变中端粒酶的检测及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:342-343
- 13 Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:781-786
- 14 Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem* 1997;43:708-714
- 15 Shay JW, Baccetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-791
- 16 Zaki VA. Life and cancer without telomerase. *Cell* 1997;91:1-3
- 17 马晋平, 詹文华. 端粒、端粒酶与消化道肿瘤. 国外医学外科分册 1997;24:194-197
- 18 Nowak J, Janusziewicz D, Lewandowski K, Nowicka-Kujawska K, Pernak M, Rembowska J, Nowak T, Wysocki J. Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:75-80
- 19 Usselmann B, Newbold M, Merris AG, Nwokolo CU. Telomerase activity and patient survival after surgery for gastric and oesophageal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:903-908
- 20 Goymola FA, Samper E, Martin-Caballero J, Finnon P, Herrera E, Flores JM, Bouffler SD, Blasco MA. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med* 2000;192:1625-1636
- 21 Mandal M, Kumar R, Poucock RE. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem* 1997;272:14183-14187
- 22 Milas M, Yu D, Sun D, Poucock RE. Telomerase activity of sarcoma cell lines and fibroblasts is independent of p53 status. *Clin Cancer Res* 1998;4:1573-1579
- 23 Oishi T, Kigawa J, Minagawa Y, Shimada M, Takahashi M, Terakawa N. Alteration of telomerase activity associated with development and extension of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998;91:568-571
- 24 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501
- 25 Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 1995;146:67-74
- 26 全俊, 胡国龄, 范学工, 谭德明. 丙型肝炎病毒核心区蛋白和细胞凋亡对 HepG₂ 细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:350-352
- 27 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 高晋华, 王振华. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡和增生与 p53 基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:1265-1268
- 28 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:526-530
- 29 王剑明, 邹倩, 邹生泉. 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
- 30 袁荣文, 丁庆, 姜汉英, 覃修福, 邹生泉, 夏穗生. 胰腺癌 Bcl-2, p53 蛋白表达和细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:851-854
- 31 Wright WE, Brasiskyte D, Piatyszek MA, Shay JW. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal normal cell hybrids. *EMBO J* 1996;15: 1734-1741

不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳, 川北医学院附属医院普外科
四川省南充市 637000
四川省卫生厅 2001 年 /2004 年度科学基金资助课题, No. 2001(41)
项目负责人: 王崇树, 637000, 四川省南充市, 川北医学院附属医院普外科.
chongs-wang@163.com
电话: 0817-2262082
收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2003-07-08

摘要

目的:通过常见消化道癌对不同抗癌药物以及不同联合用药方案的敏感性作比较,以期寻找各自的合理的化疗用药方案,从而指导不同消化道癌的化疗。

方法:通过肿瘤细胞体外药敏试验(即四甲基偶氮唑盐着色法. MTT),对97例食管癌、116例胃癌、34例肝癌以及169例大肠癌新鲜标本进行化疗药物敏感性检测,并对其结果作比较。

结果:除对丝裂霉素(mitomycin C, MMC)、顺氯氨铂(cisplatin, DDP)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)加DDP的敏感性无差异外($P > 0.05$),对其余所有药物的敏感

性均有显著性差异($P < 0.01$),其中,食管癌、胃癌及大肠癌均对 5-FU 加羟基喜树碱(hydroxycamptothecine, HCPT, OPT)、5-FU 加 MMC 最敏感,其敏感率分别为 79.4% 和 73.2%、78.4% 和 62.7%、60.4% 和 55.6%,肝癌则对 5-FU 加 MMC 及 5-FU 加柔红霉素(aunorubicin, DNR)最敏感,其敏感率分别为 70.5% 和 79.4%。

结论:不同的消化道肿瘤对不同抗癌药物的敏感性存在差异,且联合药物的敏感性优于单药。

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳. 不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):997-999

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/997.asp>

0 引言

如何选择对某一种具体肿瘤有效的抗癌药物,提高术后化疗效果,并寻找用药规律,一直是临床肿瘤化疗界关注的问题。我们采用 MTT 法对 416 例不同消化道癌

- 8 纪小龙, 赵海潞. 胃肠道平滑肌肿瘤的新认识. 华人消化杂志 1998;6:625-627
- 9 方向明, 于皆平, 罗和生. 大肠癌 hTERT 和 P16 表达与端粒酶活性的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:12-14
- 10 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
- 11 李贵新, 李国庆, 赵常在, 徐功立. 胃癌组织端粒酶 hTERT 与抑癌基因 P53 和 P16 表达的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:591-593
- 12 于会生, 郑国升, 孙金珍, 鄢群熬, 许迎霞, 刘红凌, 李华, 任冬霞, 李素敏, 黄明周. 食管癌前病变中端粒酶的检测及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:342-343
- 13 Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:781-786
- 14 Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem* 1997;43:708-714
- 15 Shay JW, Baccetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-791
- 16 Zaki VA. Life and cancer without telomerase. *Cell* 1997;91:1-3
- 17 马晋平, 詹文华. 端粒、端粒酶与消化道肿瘤. 国外医学外科分册 1997;24:194-197
- 18 Nowak J, Janusziewicz D, Lewandowski K, Nowicka-Kujawska K, Pernak M, Rembowska J, Nowak T, Wysocki J. Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:75-80
- 19 Usselmann B, Newbold M, Merris AG, Nwokolo CU. Telomerase activity and patient survival after surgery for gastric and oesophageal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:903-908
- 20 Goymola FA, Samper E, Martin-Caballero J, Finnon P, Herrera E, Flores JM, Bouffler SD, Blasco MA. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med* 2000;192:1625-1636
- 21 Mandal M, Kumar R, Poucock RE. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem* 1997;272:14183-14187
- 22 Milas M, Yu D, Sun D, Poucock RE. Telomerase activity of sarcoma cell lines and fibroblasts is independent of p53 status. *Clin Cancer Res* 1998;4:1573-1579
- 23 Oishi T, Kigawa J, Minagawa Y, Shimada M, Takahashi M, Terakawa N. Alteration of telomerase activity associated with development and extension of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998;91:568-571
- 24 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501
- 25 Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 1995;146:67-74
- 26 全俊, 胡国龄, 范学工, 谭德明. 丙型肝炎病毒核心区蛋白和细胞凋亡对 HepG₂ 细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:350-352
- 27 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 高晋华, 王振华. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡和增生与 p53 基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:1265-1268
- 28 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11:526-530
- 29 王剑明, 邹倩, 邹生泉. 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
- 30 袁荣文, 丁庆, 姜汉英, 覃修福, 邹生泉, 夏穗生. 胰腺癌 Bcl-2, p53 蛋白表达和细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:851-854
- 31 Wright WE, Brasiskyte D, Piatyszek MA, Shay JW. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal normal cell hybrids. *EMBO J* 1996;15: 1734-1741

不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳, 川北医学院附属医院普外科
四川省南充市 637000
四川省卫生厅 2001 年 /2004 年度科学基金资助课题, No. 2001(41)
项目负责人: 王崇树, 637000, 四川省南充市, 川北医学院附属医院普外科.
chongs-wang@163.com
电话: 0817-2262082
收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2003-07-08

摘要

目的:通过常见消化道癌对不同抗癌药物以及不同联合用药方案的敏感性作比较,以期寻找各自的合理的化疗用药方案,从而指导不同消化道癌的化疗。

方法:通过肿瘤细胞体外药敏试验(即四甲基偶氮唑盐着色法. MTT),对97例食管癌、116例胃癌、34例肝癌以及169例大肠癌新鲜标本进行化疗药物敏感性检测,并对其结果作比较。

结果:除对丝裂霉素(mitomycin C, MMC)、顺氯氨铂(cisplatin, DDP)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)加DDP的敏感性无差异外($P > 0.05$),对其余所有药物的敏感

性均有显著性差异($P < 0.01$),其中,食管癌、胃癌及大肠癌均对 5-FU 加羟基喜树碱(hydroxycamptothecine, HCPT, OPT)、5-FU 加 MMC 最敏感,其敏感率分别为 79.4% 和 73.2%、78.4% 和 62.7%、60.4% 和 55.6%,肝癌则对 5-FU 加 MMC 及 5-FU 加柔红霉素(aunorubicin, DNR)最敏感,其敏感率分别为 70.5% 和 79.4%。

结论:不同的消化道肿瘤对不同抗癌药物的敏感性存在差异,且联合药物的敏感性优于单药。

王崇树, 魏寿江, 赵国刚, 侯华芳. 不同消化道癌对化疗药物敏感性的应用研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):997-999

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/997.asp>

0 引言

如何选择对某一种具体肿瘤有效的抗癌药物,提高术后化疗效果,并寻找用药规律,一直是临床肿瘤化疗界关注的问题。我们采用 MTT 法对 416 例不同消化道癌

进行体外原代细胞培养和药物持续作用法, 检测其对化疗药物的敏感性, 并进行比较, 以期指导消化道肿瘤患者的临床化疗用药.

1 材料和方法

1.1 材料 消化道恶性肿瘤(均经病理学证实, 且术前、术中未使用抗癌药物)416例, 食管癌97例, 男71例, 女26例, 年龄29~77岁; 胃癌116例, 男85例, 女31例, 年龄25~73岁; 原发性肝细胞癌34例, 男25例, 女9例, 年龄28~69岁; 大肠癌169例, 男97例, 女72例, 年龄20~79岁. CO₂细胞培养箱(美国Forma Scientific生产); 96孔细胞培养板(丹麦Nunc公司生产); 100 mL/L 小牛血清(购自杭州四季青公司); MTT(美国Sigma公司); 二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO 购自重庆东风试剂厂); RPMI1640(美国GIBCO公司); 5-FU(上海旭东海普药业公司); MMC(日本协和发酵工业株式会社), HCPT(湖北美尔雅美升药业有限公司提供); 阿霉素(doxorubicin, 浙江海正药业股份有限公司); CDDP(山东齐鲁制药厂).

1.2 方法 术中切除消化道恶性肿瘤后, 自癌细胞生长旺盛的肿瘤边缘处切取约1.5 cm³瘤组织, 放入适量的双抗液(含青霉素100 kU/mL、链霉素100 mg/L)中, 常规修剪去除肿瘤周围坏死组织及非肿瘤组织, 尔后剪碎肿瘤组织并用200目不锈钢滤网制成肿瘤单细胞悬液, 离心后弃上清夜(1000 r/min, 10 min, 以下同), 用含100 mL/L 小牛血清的RPMI1640液调整细胞浓度为 $5 \times 10^{7-8}/L$, 种植于无菌96孔培养板上, 每孔200 μL(重庆医科大学学报, 1992;17(2): 103). 癌细胞药敏试验设试剂对照(含100 mL/L小牛血清的RPMI1640液各200 μL分别加入培养板第1列的8个平行孔, 在结果判断时以排除试剂对实验的影响), 肿瘤细胞阴性对照(未加抗癌药物的肿瘤单细胞悬液各200 μL分别加入培养板第2列的8个平行孔), 各种抗癌药物试验组(每种药物

有3个平行孔), 每孔加药量为20 μL, 终浓度为各抗癌药物血峰浓度的1/10. 将培养板置于37 °C 100 mL/L CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中培养68 h后, 取出离心弃上清液, 每孔加入不完全培养液200 μL, MTT(5 g/L)20 μL, 继续培养4 h, 取出再离心弃上清液, 每孔加DMSO 200 μL, 微量振荡器振荡5 min, 在578 nm波长自动酶标仪上进行比色、读数, 测出每孔吸光度(A)值. 药物对肿瘤细胞抑制率=[1-(药物孔平均A值/肿瘤细胞阴性对照孔平均A值)]×100%, 大于70%为敏感, 50~70%为中度敏感, 小于50%为不敏感(耐药); 中度敏感和敏感归为阳性, 不敏感归为阴性, 敏感率(%)则为阳性病例与该组总病例相除的百分率.

统计学处理 采用SAS统计软件对本组计数资料进行 χ^2 检验.

2 结果

本组4种不同的消化道癌除对DDP, MMC及5-FU加DDP的敏感性差异无统计学意义外($P > 0.05$), 对其余所有药物的敏感性差异均有显著性统计学意义($P < 0.01$). 其中, 食管癌、胃癌及大肠癌对单药组的敏感性均以HCPT和MMC为好, 其敏感率分别为61.9%和57.7%、59.5%和53.4%、48.5%和51.0%, 对联合药物组的敏感性均以5-FU加HCPT和5-FU加MMC为好, 其敏感率分别为79.4%和73.2%、78.4%和62.7%、60.4%和55.6%; 而肝癌对单药组的敏感性则以MMC和DNR为好, 其敏感率分别为50.0%和55.9%, 对联合药物组的敏感性则以5-FU加HCPT, 5-FU加MMC和5-FU加DNR为好, 其敏感率分别为70.5%、79.4%、79.4%. (表1).

3 讨论

消化道癌是人类最常见的恶性肿瘤^[1~5], 在我国不同地区食管癌^[6]、胃癌^[7~8]、原发性肝癌^[9~10]、大肠癌^[11~12]的发病率尚在逐年增加, 其死亡率仍居高不下; 治疗原

表1 消化道癌416例对化疗药物的敏感性(n, %)

测试药物	食管癌(n=97)		胃癌(n=116)		肝癌(n=34)		大肠癌(n=169)		χ^2 值	P值
	敏感数	敏感率	敏感数	敏感率	敏感数	敏感率	敏感数	敏感率		
5-FU	25	25.77	48	41.38	7	20.59	64	37.87	12.48	0.006
HCPT	60	61.86	69	59.48	11	32.35	82	48.52	16.67	0.001
DDP	39	40.21	32	27.59	13	38.24	58	34.32	4.06	0.255
MMC	56	57.73	62	53.45	17	50.00	86	50.89	1.31	0.728
DOX	15	15.46	26	22.41	16	47.06	40	23.67	14.13	0.003
DNR	24	24.74	46	39.66	19	55.88	51	30.18	15.82	0.001
5-FU+HCPT	77	79.38	91	78.45	24	70.59	102	60.36	16.71	0.001
5-FU+DDP	45	46.39	50	43.10	14	41.18	85	50.30	1.95	0.582
5-FU+MMC	71	73.20	72	62.07	27	79.41	94	55.62	13.98	0.003
5-FU+DOX	23	23.71	39	33.62	23	67.65	46	27.22	25.00	0.001
5-FU+DNR	31	31.96	57	49.14	27	79.41	79	46.75	23.37	0.001

则仍是以手术为主的综合治疗，而化疗疗效并不甚理想。研究表明^[13-15]，肿瘤细胞体外药敏试验结果与体内疗效的符合率高达80%以上，MTT试验结果为阴性者，用药不敏感(耐药)，我们采用MTT法实验，结合近年临床消化道肿瘤常用的以5-FU、HCPT等为代表的6种抗癌药物及其各种组合方案，对我院近年收治的416例临床消化道癌实施肿瘤细胞体外药敏筛选，并将不同种类的消化道肿瘤对同一种药物或方案的敏感性差异进行比较，结果显示：本组4种不同的消化道肿瘤除对DDP、MMC及5-FU加DDP的敏感性无差异外($P > 0.05$)，对其余所有药物的敏感性均有显著性差异($P < 0.01$)；其中，食管癌、胃癌及大肠癌对单药组的敏感性均以HCPT和MMC为好，其敏感率分别为61.9%和57.7%，59.5%和53.5%，48.5%和51.0%，对联合药物组的敏感性均以5-FU加HCPT和5-FU加MMC为好，其敏感率分别为79.4%和73.0%，78.5%和62.7%，60.4%和55.6%，而肝癌对单药组的敏感性则以MMC和DNR为好，其敏感率分别为50.0%和55.9%，对联合药物组的敏感性则以5-FU加HCPT，5-FU加MMC和5-FU加DNR为好，其敏感率分别为70.5%，79.4%，79.4%；本结果表明：不同的消化道肿瘤对同一种化疗药物或同一种化疗药物组合方案的敏感性存在差异，单药组间，食管癌及胃癌均以对HCPT的敏感性最好，肝癌以对DNR的敏感性最好，大肠癌以对MMC的敏感性最好；联合药物组间，食管癌、胃癌及大肠癌均以对5-FU加HCPT的敏感性最好，肝癌以对5-FU加MMC和5-FU加DNR的敏感性最好；联合药物组的敏感性均明显优于单药组的敏感性，表明对消化道肿瘤患者进行化疗时应尽量选择联合用药的方案；单一使用5-FU、DDP及DOX的敏感性均低，与唐亚辉 et al^[15]的结果差异较大，是否与实验操作方法、选择肿瘤细胞浓度甚至肿瘤患者的地区差异(肿瘤耐药性的个体差异)等因素有关尚不清楚，应引起临床

消化道肿瘤医师的重视；有3例食管癌、5例胃癌、2例肝癌及6例大肠癌对所有受试药物均不敏感(耐药)，具体原因不清楚，尚待深入研究。

4 参考文献

- 1 Chen B, Zhang XY, Zhang XJ, Zhou P, Gu Y, Fan DM. Antisense to cyclin D1 reverses the transformed phenotype of human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:18-21
- 2 Cai Q, Lu HF, Sun MM, Du X, Fan YZ, Shi DR. Expression of CD44V3 and V6 proteins in human colorectal carcinoma and its relevance prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1255-1258
- 3 Chen KN, Xu GW. Diagnosis and treatment of esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:196-202
- 4 司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平. KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1341-1344
- 5 Zhang LL, Zhang ZS, Zhang YL, Guo W, Zhou DY. The background of growth in multiple primary colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:450-452
- 6 毛友生, 赵晓航, 张德超, 汪良俊. 食管癌肿瘤标志物研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:1321-1323
- 7 Cheng SD, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Guo QS. Abnormal drug accumulation in multidrug resistant gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:131-134
- 8 房静远. 胃癌发生中后生修饰的异常. 世界华人消化杂志 2002;10:749-752
- 9 Worman HJ, Lin F, Mamiya N, Mustacchia PJ. Molecular biology and the diagnosis and treatment of liver disease. *World J Gastroenterol* 1998;4:185-191
- 10 He XX, Wang JL. The current status and prospect in the gene therapy of liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:158-159
- 11 Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. P16 gene methylation in colorectal cancers is associated with Duke's staging. *World J Gastroenterol* 2001;7:722-725
- 12 Xiao B, Jing B, Zhang YL, Zhou DY, Zhang WD. Tumor growth inhibition effect of Hif-6 on colon cancer cells transfected with the target gene by retroviral vector. *World J Gastroenterol* 2000;6:89-92
- 13 李孟达, 李艳芳, 李俊东, 刘富元, 刘继红. 卵巢恶性肿瘤体外药物敏感试验及其临床意义. 癌症 2000;19:1155-1157
- 14 瓣昭, 辛华雯, 周新瑾. 运用MTT法测定胃癌体外对化疗药物的敏感性及其临床适用价值的评估. 中国综合临床 1998;14:539-540
- 15 唐亚辉, 马葵, 韩居然, 袁淑雯, 王卉. MTT药物敏感性实验在指导胃癌及原发肝癌化疗中的作用. 肿瘤防治研究 2001;28:37-38

直肠癌根治术联合放化疗的临床疗效比较

刘福坤, 祁晓平, 陈彻, 许哲, 李国立, 黎介寿

刘福坤, 祁晓平, 陈彻, 许哲, 李国立, 黎介寿, 南京军区南京总医院普通外科研究所 江苏省南京市 210002
项目负责人: 刘福坤, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 南京军区南京总医院普通外科研究所. wt_mygod@sohu.com
电话: 025-80860405
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-10-22

摘要

目的: 对比直肠癌多种治疗模式对患者生存率的影响.

方法: 1994-01/2001-12住院的pTNM II, III期直肠癌患者242例, 男149例, 女93例, 平均年龄53(20-82岁), 分为单纯手术组57例; 联合化疗组64例; 联合放化疗组66例; 免疫化疗组65例. 随访12-72(中位随访时间47mo), 随访率94.2%.

结果: 术前放疗组的保肛率79%, 显著高于其他组(56%, 53%和51%, P=0.004). 单纯手术组与联合化疗组和免疫化疗组相比, 术后复发率无显著差异(16%, 14%和15%), 而联合放、化疗组复发率为6%; 与其他三组比较有显著性差异(P=0.026); 免疫化疗组远处转移率显著降低(30%对13%, P=0.011). 与单纯手术组相比, 联合化疗组在5a生存率有提高(68%对76%, P=0.078); 放化疗组和免疫化疗组的总生存率均有显著提高(68%对82%和80%; P=0.040和0.015).

结论: 直肠癌根治术加辅助放、化疗或免疫化疗的总体治疗模式效果优于单纯手术.

刘福坤, 祁晓平, 陈彻, 许哲, 李国立, 黎介寿. 直肠癌根治术联合放化疗的临床疗效比较. 世界华人消化杂志 2004;12(4):1000-1002

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1000.asp>

0 引言

直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一^[1-3], 目前最有效的治疗方法仍为手术治疗^[4-5]. 术后仍有盆腔局部复发^[6-7]. 因此, 对直肠癌的治疗应采用以手术为主的综合治疗. 我们自1994年起对242例直肠癌患者进行分组对照研究, 对临床治疗效果进行分析.

1 材料和方法

1.1 材料 1994-01/2001-12南京军区南京总医院普通外科收治的直肠癌pTNM II, III期患者共242例. 入院后术前病理证实为直肠腺癌, 各项检查未发现远处转移者, 按入院顺序进入各实验组. 全部患者均接受直肠癌根治手术, 切除标本作病理检查, 观察肠壁各层受癌侵犯情况, 同时每例标本均至少检查10个以上淋巴

结, 观察区域淋巴结受癌侵犯情况. 分为: 单纯手术组57例, 接受直肠癌根治手术, 术前术后均未行辅助治疗; 联合化疗组64例, 术前接受静脉化疗, 术后接受8个疗程静脉化疗; 联合放化疗组66例, 术前行放疗, 术后接受8个疗程静脉化疗; 免疫化疗组55例, 术前接受静脉化疗, 术后行8个疗程静脉化疗, 同时接受CD₃AK自体细胞回输治疗. 该组每次化疗前抽自体血20mL, 分离淋巴细胞, 加入CD₃单抗体外培养1wk, 化疗结束后再回输. 在242例中, 男149例, 女93例, 平均年龄53(20-82岁). pTNM II期99例, 其中单纯手术组23例, 术前化疗组26例, 术前放疗组27例, 免疫化疗组23例; pTNM III期143例, 其中单纯手术组34例, 术前化疗组38例, 术前放疗组39例, 免疫化疗组32例. 随访时间为12-72(中位随访时间47mo). 共14例失访, 随访率94.2%. 242例均如期接受手术, 根据术中肿瘤位置、浸润范围以及解剖条件, 行经腹直肠癌前切除术(Dixon手术)、超低位前切除术或直肠癌经腹会阴联合切除术(Miles手术), 保肛手术标本下切缘距肿瘤下缘大于2cm并保持外括约肌的完整. 术中见癌灶界清, 未见术前辅助治疗影响对切除范围的判断. 术后患者恢复良好, 病理报告无切缘癌残留.

1.2 方法 手术均由直肠癌专业小组医生按标准施行根治性切除术. 术前辅助化疗: 一经病理证实为直肠腺癌, 血常规、生化无明显异常, 即行一个疗程的静脉化疗, 方案为: 丝裂霉素(MMC)8mg/m², 顺铂(CDDP)60mg/m²分别溶于20mL生理盐水中, 第1d静脉注射. 甲酰四氢叶酸钙(leucovorin, LV)100mg加入500mL的50g/L葡萄糖液中静脉滴注, 结束后10min, 以5-FU500mg/m², 加入500mL的50g/L葡萄糖液中静脉持续滴注, 第1-5d1次/d. 化疗结束后7-10d行手术治疗. 术后辅助化疗: 自术后3wk, 恢复良好后开始, 共8个疗程, 用时1a. 每疗程用药及剂量同术前辅助化疗, 前6mo每月1个疗程, 以后每2-3wk1次, 再完成2个疗程化疗. 化疗毒性反应的评定按世界卫生组织(world health organization, WHO)统一标准. 术前辅助化疗前后、术后辅助化疗每疗程开始前和结束时均检查肝肾功能、外周血白细胞计数、血小板计数和心电图. 记录其级别最高的毒性反应, 出现3级及以上的毒性反应则进行对症处理, 化疗推迟1-2wk进行, 若毒性反应持续存在, 则剂量减半. 放疗组经病理证实为直肠腺癌, 检查血常规、生化无明显异常, 即在我院放疗科接受放疗. 使用西门子M6740直线加速器, 采用前后对穿射野和等中心剂量. 总剂量40Gy, 每次剂量为2Gy, 共20次, 整

个疗程持续4 wk. 放疗结束后休息1-2 wk后手术. 全部患者均作随访. 包括: 术后1 a内, 血常规、肝肾功能每月复查1次, 体格检查、胸片和肝胆B超每3 mo复查1次, 2 a后改为每6 mo复查, CT、纤维肠镜和核素检查每年1次. 其目的是及时发现盆腔复发及肝、肺、脑、骨、腹腔等处转移. 随访至2002-12-31.

统计学处理 统计软件使用SPSS 10.0版. 生存率资料的单因素分析用Kaplan-Meier法作生存曲线, 以Log-rank法作显著性检验. 影响预后指标的多因素分析采用Cox风险比例模型. 失访病例和非直肠癌死亡者, 按统计要求列为截尾数据处理. 计数资料组间差异作 χ^2 检验. 计量资料组间差异作方差分析.

2 结果

将不同TNM分期合并进行统计分析. 结果表明, 各治疗组保肛手术率单纯手术组为56%, 联合化疗组53%, 术前放疗组79%, 免疫化疗组51%, 术前放疗组的保肛率显著高于其他组($P=0.004$). 至随访结束, 单纯手术组共有9例盆腔复发, 17例远处转移, 18例死亡; 联合化疗组有9例盆腔复发, 12例远处转移, 15例死亡; 放化疗组有4例盆腔复发, 13例远处转移, 12例死亡; 免疫化疗组有8例盆腔复发, 7例远处转移, 11例死亡. 以Kaplan-Meier法计算, 4组的5 a累积盆腔复发率分别为16%, 14%, 6%, 15%; 5 a累积远处转移率分别为30%, 19%, 20%, 13%; 5 a累积总体生存率(OS)分别为68%, 76%, 82%, 80%(图1). 单纯手术组与联合化疗组和免疫化疗组相比术后复发率无显著差异, 而放化疗组显著降低($P=0.026$); 3个综合治疗组与单纯手术组相比, 远处转移率都有显著降低, 而以免疫化疗组为最低($P=0.011$). 在5 a总生存率方面, 与单纯手术组相比, 联合化疗组患者有提高的趋势, 但缺乏统计学意义($P=0.078$), 放、化疗组和免疫化疗组的总生存率均有显著提高($P=0.040$; $P=0.015$).

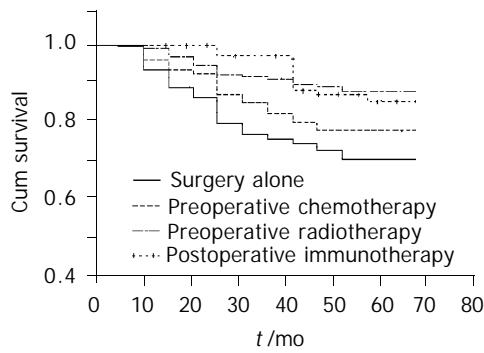


图1 不同治疗组直肠癌的累积总生存率.

应用多元回归的Cox风险比例模型分析影响直肠癌生存时间的因素, 结果显示pTNM分期和不同治疗模式是独立的预后相关因子(表1). 治疗模式的危险度值[$\text{Exp}(\beta)=0.179$]远小于1, 是一个强保护因素, 有增加

生存时间的机会, 而pTNM分期的危险度值[$\text{Exp}(\beta)=2.648$]大于1, 是一个危险因素, 是影响生存时间的重要因素.

表1 影响直肠癌生存率的多因素分析结果

变量	回归系数	回归系数标准误(mean±SD)	P值	危险度值 $\text{Exp}(\beta)$
年龄	0.015	0.006	0.064	1.014
性别	0.154	0.341	0.625	1.166
肿瘤部位	0.324	0.192	0.093	1.382
pTNM分期	0.568	0.340	0.000	2.648
治疗模式	-1.759	0.502	0.008	0.179

3 讨论

如何提高II, III期直肠癌的治疗效果, 是广大临床工作者需要重视的课题. 美国的NSABP R0-1方案, 加用放疗与不加用放疗直肠癌的局部复发率分别为16%与25%($P=0.06$). GITSG和NCCTG79-47-51分别采用术后放疗与6个疗程5-Fu相结的辅助治疗, 结果发现联合治疗组的生存率有改善, 分别为55%对43%($P=0.005$)与58%对48%($P=0.25$), 而且局部复发率仅为联合治疗组的一半. 根据这些资料NCI 1990年提出放、化疗联合对直肠癌是最佳治疗^[8-9]. 目前术前放疗的剂量与效果各家报道不一, 尚有争议^[10-12]. 我们使用2Gy×20次的常规疗程术前放疗加术后化疗来观察其疗效, 对单纯手术、术前放疗加术后化疗、术前加术后化疗与术后免疫化疗进行了对比, 观察了pTNM II期和III期直肠癌的治疗效果. 结果表明, 放、化疗组较其他治疗模式显著提高了保肛手术率. 与单纯手术相比, 显著降低复发率(6%对16%, $P=0.026$), 而术前化疗和免疫化疗则对预防局部复发无显著效果.

我们采用BRM中的一类效应细胞-CD₃单抗激活的淋巴活化杀伤细胞(CD₃AK)进行过继性免疫治疗, 纠正患者细胞免疫功能的低下, 在体内发挥抗肿瘤作用, 达到抗肿瘤的目的. 对远处转移的效果方面, 与单纯手术组相比, 以免疫化疗组最低. 在pTNM III期患者中, 免疫化疗组的5 a总生存率有显著提高($P=0.012$), 表明生物调节治疗与化疗相结合在中晚期患者能提高治疗效果. Cox模型可以同时综合考虑多个因素的作用, 排除混杂因子的干扰, 通过数学模型来定量研究患者的预后, 在肿瘤学研究中得到广泛应用. 我们应用Cox风险比例模型对影响直肠癌生存率的指标作多因素分析. 结果显示, 不同综合治疗模式、pTNM分期为独立的预后判断指标. 治疗模式的危险度 $\text{Exp}(\beta)$ 远小于1, 表明该变量对患者有强的保护作用, 而分期的危险度远大于1, 表明该变量是影响生存时间的重要因素, 分期越晚预后越差. 直肠癌手术联合放、化疗组的局部复发率显著低于单纯手术组; 远处转移率则放化疗组和免疫化疗组均显著低于单纯手术组; 放化疗组和免疫化疗组总生存率显著提高, 联合化疗组提高不明显.

这表明，手术加辅助放、化疗或免疫化疗的总体治疗模式效果优于单纯手术。对于中晚期直肠癌，除了积极进行手术治疗外，术前放疗加术后化疗可显著降低复发率，提高5年生存率，术后化疗加免疫化疗则显著降低转移率，提高生存率。说明不同的治疗模式产生的治疗效果不完全相同。对每1例直肠癌如何选择正确的治疗模式，应根据患者的具体情况来决定，要将各种治疗方法有机地结合起来，发挥各自的特长，建立有效的综合治疗措施，是提高直肠癌总体治疗效果的关键。

4 参考文献

- 1 莫善兢, 刘瑛, 许立功. 大肠癌. 见: 汤钊猷. 现代肿瘤学. 上海. 上海医科大学出版社, 2000:776
- 2 顾晋. 大肠癌的诊治进展. 中国实用外科杂志 2002;22:371-374
- 3 郁宝铭. 重视直肠癌的综合治疗. 外科理论与实践 2003;8:173-174
- 4 曹卫国, 车锦凤, 赵胜光, 陈石磊, 许赭, 金治宁. 直肠癌术后局部复发综合治疗的疗效分析. 外科理论与实践 2003;8:187-189
- 5 Moozar KL, Wong CS, Couture J. Anorectal malignant melanoma: treatment with surgery or radiation therapy, or both. *Can J Surg* 2003;46:345-349
- 6 刘福坤, 许哲, 祁晓平, 李国立, 黎介寿. 结直肠癌术后复发与生存因素分析. 医学研究生学报 2000;13:298-300

- 7 Ruo L, Tickoo S, Klimstra DS, Minsky BD, Saltz L, Mazumdar M, Paty PB, Wong WD, Larson SM, Cohen AM, Guillem JG. Long-term prognostic significance of extent of rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy. *Ann Surg* 2002;236:75-81
- 8 Wolmark N, Colangelo L, Wieand S. National surgical adjuvant breast project trials in colon cancer. *Semin Oncol* 2001;28 (1 Suppl 1):9-13
- 9 Paty PB, Cohen AM. The role of surgery and chemoradiation therapy for cancer of the rectum. *Curr Probl Cancer* 1999;23: 233-249
- 10 Onaitis MW, Noone RB, Hartwig M, Hurwitz H, Morse M, Jowell P, McGrath K, Lee C, Anscher MS, Clary B, Mantyh C, Pappas TN, Ludwig K, Seigler HF, Tyler DS. Neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: analysis of clinical outcomes from a 13-year institutional experience. *Ann Surg* 2001;233: 778-785
- 11 Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Rodel C, Martus P, Hohenberger W, Tschmelitsch J, Sabitzer H, Karstens JH, Becker H, Hess C, Raab R. Adjuvant vs. Neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer the German trial CAO/ARO/AIO-94. *Colorectal Dis* 2003;5:406-415
- 12 Tjandra JJ, Reading DM, McLachlan SA, Gunn IF, Green MD, McLaughlin SJ, Millar JL, Pedersen JS. Phase II clinical trial of preoperative combined chemoradiation for T3 and T4 resectable rectal cancer: preliminary results. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:1113-1122

乙肝肝硬化患者血清 IFN-γ 及相关因子水平与肝脏炎症活动的关系

唐洁婷, 房静远, 顾伟齐

唐洁婷, 房静远, 顾伟齐, 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
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: 021-63200874 传真: 021-63266027
收稿日期: 2003-09-15 接受日期: 2003-10-27

摘要

目的: 探讨乙肝肝硬化患者血清中 IFN-γ、IL-2 及 sIL-2R 的水平与肝脏炎症活动的关系。

方法: 应用双抗体夹心 ELISA 方法测定 43 例乙肝肝硬化患者(其中静止性肝硬化 23 例; 活动性肝硬化 20 例)及 19 例正常人血清 IFN-γ、IL-2 及 sIL-2R 水平; 并分析其与肝脏炎症情况的关系。

结果: 活动性肝硬化患者血清 IFN-γ、IL-2 及 sIL-2R 浓度均明显高于静止性肝硬化组及正常对照组(35.881 ± 9.032 vs 23.619 ± 8.183 and 21.213 ± 5.876 , 11.989 ± 7.232 vs 6.003 ± 2.174 and 5.404 ± 2.161 , 848.656 ± 368.105 vs 380.571 ± 290.107 and 94.917 ± 83.672 ; $P < 0.01$)，肝硬化患者血清 IFN-γ 与 ALT、IL-2 与 SB、sIL-2R 与 ALT、SB 有相关性，且 IFN-γ 与 IL-2 呈正相关。

结论: IFN-γ 及相关因子在肝硬化免疫病理中起重要作用，且与肝脏炎症活动密切相关，肝组织损伤可能是 IFN-γ 及相关因子活性增加的原因。

唐洁婷, 房静远, 顾伟齐. 乙肝肝硬化患者血清 IFN-γ 及相关因子水平与肝脏炎症活动的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(4):1002-1004
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1002.asp>

0 引言

以往的研究已证明，乙型肝炎的发生并不是由乙肝病毒直接侵袭肝脏细胞所引起，而是与病毒抗原和机体免疫系统相互作用有关，而 CD4+TH 细胞在细胞免疫和体液免疫应答过程中有着重要的辅助作用。根据产生的细胞因子不同，CD4+T 细胞又可分为 TH1、TH2 亚群，其中 TH1 细胞以产生 IFN-γ、IL-2 及 TNF-β 为特征。研究表明，TH1 型免疫反应与感染的免疫性和防御性有关。乙肝病情演变后期进入肝硬化阶段后，其免疫功能的紊乱、肝相关细胞因子表达与肝损伤的关系目前资料尚少，我们对 43 例乙肝肝硬化患者及 19 例正常人血清 IFN-γ、IL-2 及 sIL-2R 进行检测，并探讨

这表明，手术加辅助放、化疗或免疫化疗的总体治疗模式效果优于单纯手术。对于中晚期直肠癌，除了积极进行手术治疗外，术前放疗加术后化疗可显著降低复发率，提高5年生存率，术后化疗加免疫化疗则显著降低转移率，提高生存率。说明不同的治疗模式产生的治疗效果不完全相同。对每1例直肠癌如何选择正确的治疗模式，应根据患者的具体情况来决定，要将各种治疗方法有机地结合起来，发挥各自的特长，建立有效的综合治疗措施，是提高直肠癌总体治疗效果的关键。

4 参考文献

- 1 莫善兢, 刘瑛, 许立功. 大肠癌. 见: 汤钊猷. 现代肿瘤学. 上海. 上海医科大学出版社, 2000:776
- 2 顾晋. 大肠癌的诊治进展. 中国实用外科杂志 2002;22:371-374
- 3 郁宝铭. 重视直肠癌的综合治疗. 外科理论与实践 2003;8:173-174
- 4 曹卫国, 车锦凤, 赵胜光, 陈石磊, 许赭, 金治宁. 直肠癌术后局部复发综合治疗的疗效分析. 外科理论与实践 2003;8:187-189
- 5 Moozar KL, Wong CS, Couture J. Anorectal malignant melanoma: treatment with surgery or radiation therapy, or both. *Can J Surg* 2003;46:345-349
- 6 刘福坤, 许哲, 祁晓平, 李国立, 黎介寿. 结直肠癌术后复发与生存因素分析. 医学研究生学报 2000;13:298-300

- 7 Ruo L, Tickoo S, Klimstra DS, Minsky BD, Saltz L, Mazumdar M, Paty PB, Wong WD, Larson SM, Cohen AM, Guillem JG. Long-term prognostic significance of extent of rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy. *Ann Surg* 2002;236:75-81
- 8 Wolmark N, Colangelo L, Wieand S. National surgical adjuvant breast project trials in colon cancer. *Semin Oncol* 2001;28 (1 Suppl 1):9-13
- 9 Paty PB, Cohen AM. The role of surgery and chemoradiation therapy for cancer of the rectum. *Curr Probl Cancer* 1999;23: 233-249
- 10 Onaitis MW, Noone RB, Hartwig M, Hurwitz H, Morse M, Jowell P, McGrath K, Lee C, Anscher MS, Clary B, Mantyh C, Pappas TN, Ludwig K, Seigler HF, Tyler DS. Neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: analysis of clinical outcomes from a 13-year institutional experience. *Ann Surg* 2001;233: 778-785
- 11 Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Rodel C, Martus P, Hohenberger W, Tschmelitsch J, Sabitzer H, Karstens JH, Becker H, Hess C, Raab R. Adjuvant vs. Neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer the German trial CAO/ARO/AIO-94. *Colorectal Dis* 2003;5:406-415
- 12 Tjandra JJ, Reading DM, McLachlan SA, Gunn IF, Green MD, McLaughlin SJ, Millar JL, Pedersen JS. Phase II clinical trial of preoperative combined chemoradiation for T3 and T4 resectable rectal cancer: preliminary results. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:1113-1122

乙肝肝硬化患者血清 IFN-γ 及相关因子水平与肝脏炎症活动的关系

唐洁婷, 房静远, 顾伟齐

唐洁婷, 房静远, 顾伟齐, 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
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: 021-63200874 传真: 021-63266027
收稿日期: 2003-09-15 接受日期: 2003-10-27

摘要

目的: 探讨乙肝肝硬化患者血清中 IFN-γ、IL-2 及 sIL-2R 的水平与肝脏炎症活动的关系。

方法: 应用双抗体夹心 ELISA 方法测定 43 例乙肝肝硬化患者(其中静止性肝硬化 23 例; 活动性肝硬化 20 例)及 19 例正常人血清 IFN-γ、IL-2 及 sIL-2R 水平; 并分析其与肝脏炎症情况的关系。

结果: 活动性肝硬化患者血清 IFN-γ、IL-2 及 sIL-2R 浓度均明显高于静止性肝硬化组及正常对照组(35.881 ± 9.032 vs 23.619 ± 8.183 and 21.213 ± 5.876 , 11.989 ± 7.232 vs 6.003 ± 2.174 and 5.404 ± 2.161 , 848.656 ± 368.105 vs 380.571 ± 290.107 and 94.917 ± 83.672 ; $P < 0.01$)，肝硬化患者血清 IFN-γ 与 ALT、IL-2 与 SB、sIL-2R 与 ALT、SB 有相关性，且 IFN-γ 与 IL-2 呈正相关。

结论: IFN-γ 及相关因子在肝硬化免疫病理中起重要作用，且与肝脏炎症活动密切相关，肝组织损伤可能是 IFN-γ 及相关因子活性增加的原因。

唐洁婷, 房静远, 顾伟齐. 乙肝肝硬化患者血清 IFN-γ 及相关因子水平与肝脏炎症活动的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(4):1002-1004
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1002.asp>

0 引言

以往的研究已证明，乙型肝炎的发生并不是由乙肝病毒直接侵袭肝脏细胞所引起，而是与病毒抗原和机体免疫系统相互作用有关，而 CD4+TH 细胞在细胞免疫和体液免疫应答过程中有着重要的辅助作用。根据产生的细胞因子不同，CD4+T 细胞又可分为 TH1、TH2 亚群，其中 TH1 细胞以产生 IFN-γ、IL-2 及 TNF-β 为特征。研究表明，TH1 型免疫反应与感染的免疫性和防御性有关。乙肝病情演变后期进入肝硬化阶段后，其免疫功能的紊乱、肝相关细胞因子表达与肝损伤的关系目前资料尚少，我们对 43 例乙肝肝硬化患者及 19 例正常人血清 IFN-γ、IL-2 及 sIL-2R 进行检测，并探讨

其与肝硬化患者肝脏炎症活动的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 肝硬化组(LC): 乙肝肝硬化住院患者43例, 符合临床诊断标准, 其中女18例, 男25例, 年龄为33-81岁, 平均58.4岁, 部分病例为HBeAg阳性。并按2000年西安会议制定的病毒性肝炎诊断标准, 将43例患者分为静止性肝硬化组(SLC)23例, 活动性肝硬化组(ALC)20例; 正常人群组(NC): 19例, 其中女9例, 男10例, 年龄为25-65岁, 平均40.9岁(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb及抗HCV均阴性, 肝功能指标均正常)。主要试剂: IFN- γ 和IL-2试剂盒分别购自美国R&D公司和法国Diaclone公司, sIL-2R试剂盒购自深圳晶美生物制品有限公司。

1.2 方法 所有受检者均在清晨空腹抽取外周静脉血5mL, 静置30 min, 待血块回缩后分离血清, 2 000 rpm离心10 min, 预留取部分血清作肝功能及HBV标志物的检测, 其余血清-70℃保存待测。IFN- γ 、IL-2及sIL-2R的检测均用双抗体夹心ELISA方法, 具体操作严格按试剂盒说明书进行。

统计学处理 采用SPSS统计系统, 实验数据以mean±SD表示, 两组间均数比较采用t检验、相关性研究采用Spearman等级相关分析, P<0.05有统计学意义。

2 结果

2.1 IFN- γ 、IL-2浓度 ALC组明显高于NC组、SLC组, 而SLC组与NC组差别无统计学意义; sIL-2R浓度在NC组、SLC组、ALC组中逐渐升高, 且各组差异皆显著(表1)。

表1 各组IFN- γ 、IL-2及sIL-2R浓度(mean±SD, pg/mL)

组别	IFN- γ	IL-2	SIL-2R
NC组	21.213 ± 5.876	5.404 ± 2.161	94.917 ± 83.672
SLC组	23.619 ± 8.183 ^d	6.003 ± 2.174 ^d	380.571 ± 290.107 ^{bd}
ALC组	35.881 ± 9.032 ^b	11.989 ± 7.232 ^b	848.656 ± 368.105 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs NC组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs ALC组。

2.2 HBeAg(+)患者的IFN- γ 、IL-2浓度低于HBeAg(-)患者, sIL-2R浓度高于HBeAg(-)患者。但只有IFN- γ 的差异具有统计学意义(表2)。

表2 IFN- γ 、IL-2及sIL-2R浓度与乙肝病毒标志物HBeAg(mean±SD, pg/mL)

	n	IFN- γ	IL-2	SIL-2R
HBeAg(+)	6	21.635 ± 2.007 ^a	4.754 ± 1.836	663.021 ± 278.722
HBeAg(-)	37	30.569 ± 10.800	9.441 ± 6.125	587.787 ± 420.064

^aP<0.05 vs HBeAg(-)组。

2.3 IFN- γ 与ALT呈正相关, 与SB无相关; IL-2与SB呈正相关, 与ALT无相关; sIL-2R与ALT及SB皆呈正相关。IFN- γ 与IL-2正相关, sIL-2R与IFN- γ 、IL-2皆无相关(表3)。

表3 IFN- γ 、IL-2及sIL-2R浓度与ALT及SB的相关性

	IFN- γ	IL-2	sIL2-R
ALT	r=0.339 ^a	r=0.119	r=0.324 ^a
SB	r=0.287	r=0.517 ^a	r=0.455 ^a
IFN- γ		r=0.324 ^a	r=0.177
IL-2			r=0.263

^aP<0.05。

3 讨论

在病毒感染时机体的IFN, 尤其是IFN- γ , 不仅可直接限制病毒的复制和扩散, 近年来发现它可对许多免疫细胞发挥强大免疫调节作用^[1]。本实验结果显示IFN- γ 水平在活动性肝硬化组中显著升高, 且与ALT正相关(r=0.339, P<0.05), 这与国外一些文献报道是一致的^[2-3]。亦发现静止性肝硬化组的IFN- γ 水平与正常对照组无统计学差异, 说明炎症减轻, IFN- γ 明显减少。IFN- γ 主要由CD4+的TH1细胞分泌。近年来, 慢性HBV感染中TH1/TH2细胞平衡失调的作用日益受到人们的关注。Anastassakos et al^[4]报道, 慢性HBV感染者, 其T细胞被激活。国内相关研究^[5]也表明, 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)中, TH0占大多数, 少部分为TH2细胞, 但是随着肝组织炎症活动的加剧, TH1类细胞比例明显增加, 提示TH1细胞与肝组织损伤密切关联。

TH1细胞受病毒感染等刺激后亦产生IL-2, 因为IFN- γ 与IL-2在免疫过程中有协同作用, 所以我们也研究了IL-2在肝硬化中的表达情况。结果提示, 与IFN- γ 一致, IL-2浓度ALC组明显高于NC组、SLC组, 而SLC组与NC组差别无统计学意义, IL-2与IFN- γ 成正相关。我们还发现, 在肝功能指标中IFN- γ 与ALT显著相关; 而IL-2与SB显著相关。我们分析肝硬化患者IFN- γ 、IL-2水平明显高于正常人, 可能与肝硬化患者肝组织受损严重, 功能性肝细胞的数量明显减少, 肝脏清除这些细胞因子的能力下降有关。乙肝病毒侵入体内, 激活T、B细胞和巨噬细胞表达高亲和性的IL-2R, 未结合的膜白介素II受体(MIL-2R)脱落入血浆, 即为sIL-2R。sIL-2R是机体免疫系统被激活的敏感指标^[6]。一方面sIL-2R可中和活化T淋巴细胞周围的IL-2, 减弱淋巴细胞的自分泌效应, 有助于机体清除病毒; 而另一方面, sIL-2R与MIL-2R竞争性结合IL-2, 加重了免疫功能低下和免疫功能紊乱, 使肝炎病毒感染持续存在^[7]。本组结果显示, 肝硬化患者血清IL-2和sIL-2R水平较正常人升高, 反映患者体内部分抗

乙肝病毒免疫力。Sawayama et al^[8]报道，慢性HBV感染的肝硬化患者，其血清sIL-2R水平与ALT水平呈正相关，与本组实验结果一致。sIL-2R增高的机制目前尚不完全清楚，可能因为HBV感染通过激活T细胞杀伤HBV的同时，引起肝细胞损伤，使肝脏对sIL-2R的清除能力降低；另一方面，又可通过激活T细胞使sIL-2R释放增加，从而引起血sIL-2R水平增高。

Milich et al^[9]用HBeAg和HBcAg分别接种纯种小鼠，发现HBeAg免疫后表现为TH2反应类型，用HBcAg免疫则为TH1反应类型。还有研究^[10]认为，HBeAg与慢性乙肝患者PMBC增生和产生IFN-γ和IL-10有关。Schlaak et al^[11]研究发现，在体外HBeAg诱导PMBC产生TH2反应类型。本研究中HBeAg(+)组IFN-γ浓度与HBeAg(-)相比显著降低，提示HBeAg在这部分患者体内诱导了一个TH2型反应。而本结果中，两组IL-2浓度、sIL-2R浓度差异不具统计学意义，可能与HBeAg(+)组病例样本较小有关。

目前研究认为，肝硬化患者存在TH1/TH2细胞平衡失调、抑制性T细胞活性下降等免疫功能紊乱情况，这些似能解释病情活动的肝硬化患者IFN-γ、IL-2及sIL-2R活性增加的现象，肝组织损伤可能是IFN-γ及相关因子活性增加的原因。检测肝硬化患者血清中的各细胞因子水平，或在肝组织中的表达程度，可了解患者体内免疫功能紊乱情况，预测肝脏炎症反应程度和预后。

4 参考文献

1 周光炎. 免疫学原理. 第1版. 上海: 上海科技技术文献出版社,

- 2000;83-88
- 2 Fukuda R, Ishimura N, Nguyen TX, Chowdhury A, Ishihara S, Kohge N, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. The expression of IL-2, IL-4, and interferon-gamma (IFN-γ) mRNA using liver biopsies at different phases of acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1995;100:451-466
- 3 Lee M, Lee M, Lee SK, Son M, Cho SW, Park S, Kim HI. Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBeAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci* 1999;14:175-181
- 4 Anastassakos C, Alexander GJ, Wolstencroft RA, Avery JA, Portmann BC, Panayi GS, Dumonde DC, Eddleston AL, Williams R. Interleukin-1 and interleukin-2 activity in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1998;94:999-1005
- 5 姜荣龙, 卢桥生, 侯金林, 骆抗先, 章廉, 富宁. 辅助性T细胞极化群体在慢性乙型肝炎病毒感染中的作用. 中华医学杂志 2000; 80:741-744
- 6 Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor biology, function and clinical application. *Ann Intern Med* 1990;113:619-627
- 7 Simsek H, Kadayifci A. Serum interleukin 2 and soluble interleukin 2 receptor in chronic active hepatitis C: effect of interferon therapy. *J Int Med Res* 1996;24:239-245
- 8 Sawayama Y, Hayashi J, Kawakami Y, Furusyo N, Ariyama I, Kishihara Y, Ueno K, Kashiwagi S. Serum soluble interleukin-2 receptor levels before and during interferon treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci* 1999;44:163-169
- 9 Milich DR, Peterson DL, Schodel F, Jones JE, Hughes JL. Preferential recognition of hepatitis B nucleocapside antigens by Th1 or Th2 cell is epitope and major histocompatibility complex dependent. *J Virol* 1995;69:2776-2785
- 10 Vingerhoets J, Michielsen P, Vanham G, Bosmans E, Paulij W, Ramon A, Pelckmans P, Kestens L, Leroux-Roels G. HBV-specific lymphoproliferative and cytokine responses in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1988;28:8-16
- 11 Schlaak JF, Tully G, Lohr HF, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH. HBV-specific immune defect in chronic hepatitis B is correlated with a dysregulation of pro-and anti-inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 1999;115:508-514

络泰综合治疗十二指肠球部溃疡疗效观察

刘进, 卢杰夫

刘进, 卢杰夫, 广西南宁市第一人民医院消化内科 广西省南宁市 530022
项目负责人: 刘进, 530022, 广西南宁市新城区经文街3号, 广西南宁市第一人民医院消化内科。

电话: 0771-2636184

收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-09-24

摘要

目的: 观察探讨络泰注射用血塞通(冻干)综合法莫替丁与胶态次枸橼酸铋治疗十二指肠球部溃疡(DU)的疗效。

方法: 将120例DU患者随机均分为治疗组和对照组, 治疗组为前2 wk静滴络泰、静滴法莫替丁及口服胶态次枸橼酸铋, 后2 wk单口服法莫替丁, 对照组为前2 wk静滴法莫替丁及口服胶态次枸橼酸铋, 后2 wk单口服法莫替

丁, 两组疗程均为4 wk。

结果: (1)治疗组60例中愈合54例(90%), 好转4例(6.7%), 无效2例(3.3%), 总有效率96.7%。(2)对照组60例中愈合38例(63.3%), 好转12例(20%), 无效10例(16.7%), 总有效率83.3%。治疗组疗效优于对照组, 二者有显著差异($P < 0.05$)。

结论: 络泰综合法莫替丁与胶态次枸橼酸铋治疗DU可提高愈合率及总有效率, 是治疗DU的一种具有较好疗效的方法。

刘进, 卢杰夫. 络泰综合治疗十二指肠球部溃疡疗效观察. 世界华人消化杂志 2004;12(4):1004-1005

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1004.asp>

乙肝病毒免疫力。Sawayama et al^[8]报道，慢性HBV感染的肝硬化患者，其血清sIL-2R水平与ALT水平呈正相关，与本组实验结果一致。sIL-2R增高的机制目前尚不完全清楚，可能因为HBV感染通过激活T细胞杀伤HBV的同时，引起肝细胞损伤，使肝脏对sIL-2R的清除能力降低；另一方面，又可通过激活T细胞使sIL-2R释放增加，从而引起血sIL-2R水平增高。

Milich et al^[9]用HBeAg和HBcAg分别接种纯种小鼠，发现HBeAg免疫后表现为TH2反应类型，用HBcAg免疫则为TH1反应类型。还有研究^[10]认为，HBeAg与慢性乙肝患者PMBC增生和产生IFN-γ和IL-10有关。Schlaak et al^[11]研究发现，在体外HBeAg诱导PMBC产生TH2反应类型。本研究中HBeAg(+)组IFN-γ浓度与HBeAg(-)相比显著降低，提示HBeAg在这部分患者体内诱导了一个TH2型反应。而本结果中，两组IL-2浓度、sIL-2R浓度差异不具统计学意义，可能与HBeAg(+)组病例样本较小有关。

目前研究认为，肝硬化患者存在TH1/TH2细胞平衡失调、抑制性T细胞活性下降等免疫功能紊乱情况，这些似能解释病情活动的肝硬化患者IFN-γ、IL-2及sIL-2R活性增加的现象，肝组织损伤可能是IFN-γ及相关因子活性增加的原因。检测肝硬化患者血清中的各细胞因子水平，或在肝组织中的表达程度，可了解患者体内免疫功能紊乱情况，预测肝脏炎症反应程度和预后。

4 参考文献

1 周光炎. 免疫学原理. 第1版. 上海: 上海科技技术文献出版社,

- 2000;83-88
- 2 Fukuda R, Ishimura N, Nguyen TX, Chowdhury A, Ishihara S, Kohge N, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. The expression of IL-2, IL-4, and interferon-gamma (IFN-γ) mRNA using liver biopsies at different phases of acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1995;100:451-466
- 3 Lee M, Lee M, Lee SK, Son M, Cho SW, Park S, Kim HI. Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBeAg in chronic hepatitis B patients. *J Korean Med Sci* 1999;14:175-181
- 4 Anastassakos C, Alexander GJ, Wolstencroft RA, Avery JA, Portmann BC, Panayi GS, Dumonde DC, Eddleston AL, Williams R. Interleukin-1 and interleukin-2 activity in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1998;94:999-1005
- 5 姜荣龙, 卢桥生, 侯金林, 骆抗先, 章廉, 富宁. 辅助性T细胞极化群体在慢性乙型肝炎病毒感染中的作用. 中华医学杂志 2000; 80:741-744
- 6 Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor biology, function and clinical application. *Ann Intern Med* 1990;113:619-627
- 7 Simsek H, Kadayifci A. Serum interleukin 2 and soluble interleukin 2 receptor in chronic active hepatitis C: effect of interferon therapy. *J Int Med Res* 1996;24:239-245
- 8 Sawayama Y, Hayashi J, Kawakami Y, Furusyo N, Ariyama I, Kishihara Y, Ueno K, Kashiwagi S. Serum soluble interleukin-2 receptor levels before and during interferon treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci* 1999;44:163-169
- 9 Milich DR, Peterson DL, Schodel F, Jones JE, Hughes JL. Preferential recognition of hepatitis B nucleocapside antigens by Th1 or Th2 cell is epitope and major histocompatibility complex dependent. *J Virol* 1995;69:2776-2785
- 10 Vingerhoets J, Michielsen P, Vanham G, Bosmans E, Paulij W, Ramon A, Pelckmans P, Kestens L, Leroux-Roels G. HBV-specific lymphoproliferative and cytokine responses in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1988;28:8-16
- 11 Schlaak JF, Tully G, Lohr HF, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH. HBV-specific immune defect in chronic hepatitis B is correlated with a dysregulation of pro-and anti-inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 1999;115:508-514

络泰综合治疗十二指肠球部溃疡疗效观察

刘进, 卢杰夫

刘进, 卢杰夫, 广西南宁市第一人民医院消化内科 广西省南宁市 530022
项目负责人: 刘进, 530022, 广西南宁市新城区经文街3号, 广西南宁市第一人民医院消化内科。

电话: 0771-2636184

收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-09-24

摘要

目的: 观察探讨络泰注射用血塞通(冻干)综合法莫替丁与胶态次枸橼酸铋治疗十二指肠球部溃疡(DU)的疗效。

方法: 将120例DU患者随机均分为治疗组和对照组, 治疗组为前2 wk静滴络泰、静滴法莫替丁及口服胶态次枸橼酸铋, 后2 wk单口服法莫替丁, 对照组为前2 wk静滴法莫替丁及口服胶态次枸橼酸铋, 后2 wk单口服法莫替

丁, 两组疗程均为4 wk。

结果: (1)治疗组60例中愈合54例(90%), 好转4例(6.7%), 无效2例(3.3%), 总有效率96.7%。(2)对照组60例中愈合38例(63.3%), 好转12例(20%), 无效10例(16.7%), 总有效率83.3%。治疗组疗效优于对照组, 二者有显著差异($P < 0.05$)。

结论: 络泰综合法莫替丁与胶态次枸橼酸铋治疗DU可提高愈合率及总有效率, 是治疗DU的一种具有较好疗效的方法。

刘进, 卢杰夫. 络泰综合治疗十二指肠球部溃疡疗效观察. 世界华人消化杂志 2004;12(4):1004-1005

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1004.asp>

0 引言

络泰既往报道多见于治疗心脑血管方面之疾病，我们根据络泰之有效成分可针对消化性溃疡的一些病因以及发病机制中治疗有效的药理及其作用，采用络泰注射用血塞通(冻干)综合法莫替丁、胶态次枸橼酸铋治疗60例十二指肠球部溃疡(DU)患者，取得明显效果，报道如下：

1 材料和方法

1.1 材料 1999-01/2003-01，患者共120例，均来源于我院住院患者，男80例，女40例，年龄20-60岁，平均34.5岁。病程6mo-7a，全部病例均有不同程度的反酸、嗳气、空腹痛及夜间痛等病史，而无幽门梗阻或出血，亦无胃手术史，均经电子胃镜检查确诊有DU，溃疡面直径最大2cm，最小0.1cm。全部病例以前均未用过络泰、法莫替丁及胶态次枸橼酸铋治疗。随机将120例患者均分为两组，治疗组60例，男40例，女20例，对照组60例，男40例，女20例，本文两组病例在性别、年龄分布、职业、吸烟史以及溃疡病家族史等方面均无明显差异，溃疡数目及溃疡大小两组也基本相同。

1.2 方法 对照组：给予消化性溃疡的一般治疗，即注意休息及饮食、作息规律，合理膳食而禁酒、咖啡、浓茶等，免过冷、过热、粗糙及刺激性食物，戒除不良嗜好，忌过劳过累等，并给患者制酸静滴法莫替丁注射剂40mg，2次/d，以及口服胶态次枸橼酸铋110mg，4次/d，以上静滴法莫替丁注射剂及口服胶态次枸橼酸铋维持2wk后，改单用口服法莫替丁片剂20mg，2次/d，2wk。治疗组：在上述对照组治疗方法的基础上前2wk加用生理盐水或5%葡萄糖溶液加络泰注射用血塞通(冻干)(昆明制药集团股份有限公司生产)0.4g缓慢静脉滴注，1次/d，如此维持2wk后停用络泰，治疗组其余用药及时间疗程同上述对照组的治疗方法。两组全部病例本次治疗期间不用其他任何药物。

1.3 疗效评定标准^[1] 愈合：疗程结束后自觉症状完全消失，胃镜复查溃疡灶由活动期转为瘢痕期或已消失；好转：疗程结束后自觉症状减轻，胃镜复查溃疡灶由活动期转为愈合期，溃疡缩小大于或等于50%；无效：自觉症状无变化，溃疡缩小小于50%或不变或扩大。

统计学处理 两组间比率采用 χ^2 检验， $P < 0.05$ ，有显著性差异。

2 结果

治疗组及对照组疗效见表1，两组经统计学处理，有显著性差异($P < 0.05$)。

表1 两组疗效比较

组别	n	愈合(%)	好转(%)	总有效(%) (愈合 + 好转)
治疗组	60	54 (90%)	4 (6.7%)	58 (96.7%)
对照组	60	38 (63.3%)	12 (20%)	50 (83.3%)

$P < 0.05$ 。

3 讨论

DU的病因可有多种，近年来发现其与幽门螺杆菌(Hp)感染^[2]、循环及代谢功能障碍、免疫因素^[3]以及氧自由基^[4]等较为密切。络泰即注射用血塞通(冻干)，由中药三七提纯精制而成，其有效成分为三七总皂甙，三七及其提取物均具有调节机体的免疫功能、改善胃黏膜血供、促进胃黏膜细胞生长恢复、抗Hp以及抗氧自由基等作用^[5]。本治疗组的治疗机制，亦可能与以下因素有关：法莫替丁制酸，胶态次枸橼酸铋隔离保护溃疡面，从而与络泰协同或更充分修复组织、愈合创面和溃疡、抗Hp以及抗氧自由基等作用，从而三者综合用药治DU可提高愈合率和总有效率。

DU属于中医学胃痛、胃脘痛、心下痛等范畴，发病机制多为脾虚胃热，脾寒胃热，常兼夹肝气、湿郁、热毒，寒热虚实错杂，病情缠绵难愈，病久入络，瘀阻络久，腐熟成痈而成溃疡，故病久尤其应重视辨瘀血的辨证，临床凡见舌质青、有瘀点，胃痛如针刺或痛有定处，或痛无休止或胃脘处如有物顶感等症状，诸症不必悉具，但见一症即可按血瘀论治，三七既能化瘀止血、通脉活络、消肿定痛，又能补虚强壮，故对上述疾病均可应用^[6-8]。

在提高消化性溃疡愈合质量(QUOH)方面，三七作为活血化瘀药物可用于溃疡各期的治疗，运用此药物可抑制Hp感染及增强胃黏膜屏障功能，还可增加胃黏膜循环灌注，促进胃黏膜组织的能量代谢，保证黏膜上皮细胞再生及溃疡底部和边缘部腺体再生，保持黏膜微环境的酸碱平衡，从而有效地提高QUOH及防治溃疡复发^[9-11]。

本文应用络泰注射用血塞通(冻干)综合法莫替丁、胶态次枸橼酸铋治疗十二指肠球部溃疡，疗效优于单用法莫替丁、胶态次枸橼酸铋的对照组，未见毒副反应，且络泰为中成药，无传统方剂的需较繁琐地煎制后才能使用等缺点，药品易久存及易于患者接受，利于临床推广，本文综合疗法提示其可作为一种治疗十二指肠球部溃疡的方法。

4 参考文献

- 曲伸，谢延侠，梁秋红，赵丽荣，刘英. 表皮生长因子口服液治疗十二指肠球部溃疡64例疗效观察. 中国实用内科杂志 1995;15:428
- 韩冬梅，韩秀. 关于消化性溃疡的产生、复发与幽门螺杆菌感染关系的探讨. 世界华人消化杂志 2002;10:1115
- 汪鸿志. 消化性溃疡的病因与发病机制. 中国实用内科杂志 1993; 13:390-391
- 钟小兰，张光奇. 自由基在消化性溃疡研究中的意义. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:248-249
- 郑虎占，董泽宏，余靖. 中药现代研究与应用. 第1卷. 第1版. 北京：学苑出版社，1997:208-251
- 王芝华，郑昱. 五灵脂汤治疗消化性溃疡30例. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:239-240
- 陈贵廷，杨思澍. 实用中西医结合诊断治疗学. 第1版. 北京：中国医药科技出版社，1991:437
- 染志新. 参三七治疗慢性胃炎、十二指肠球炎(附66例临床分析). 综合临床医学 1996;12:105-106
- 樊群，张海燕. 中医药提高溃疡愈合质量的治疗思路. 中国中西医结合脾胃杂志 1996;4:186-188
- 周福生，胡玲，崔琦珍，黄志新，罗琦. 中医药抗消化性溃疡复发的机制研究进展. 中国中西医结合杂志 2001;3:232-234
- 唐志鹏. 许鑫梅教授辨治消化性溃疡的经验. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:96-97

• 临床经验 •

脆性组氨酸三联体基因蛋白表达与炎症性肠病的临床关系

施华秀,任建林,王琳,洪东旭,陈建民,卢雅丕,吴艳环

施华秀,任建林,王琳,洪东旭,陈建民,卢雅丕,吴艳环,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:施华秀,361004,福建省厦门市,厦门大学医学院第一临床学院,厦门中山医院消化内科。shihxiu@public.xm.fj.cn
电话:0592-2292015 传真:0592-2292017
收稿日期:2003-10-28 接受日期:2003-12-08

摘要

目的:探讨脆性组氨酸三联体基因(fragile histidine triad, FHIT)蛋白在38例溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、25例Crohn's病、11例UC相关性腺癌和13例正常对照组中的表达情况。

方法:标本常规石蜡包埋,采用免疫组化法检测FHIT在UC、Crohn's病、UC相关性腺癌和正常对照组中的表达。

结果:38例UC中,25例FHIT蛋白表达阴性;25例Crohn's病中,19例表达阴性;11例UC相关性腺癌中,6例表达阴性。FHIT蛋白在UC和正常对照组(71.43% vs 7.69%, $\chi^2 = 18.80$, P < 0.01)、Crohn's病和正常对照组(76% vs 7.69%, $\chi^2 = 18.88$, P < 0.01)、UC相关性腺癌和正常对照组(54.55% vs 7.69%, $\chi^2 = 7.75$, P < 0.05)间均有显著性差异;而在UC和UC相关性腺癌中无显著性差异(54.55% vs 71.43%, $\chi^2 = 0.05$, P > 0.05)。

结论:FHIT蛋白在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)和UC相关性腺癌中呈低表达或缺失,提示该基因可能与IBD和UC相关性腺癌发生有关。

施华秀,任建林,王琳,洪东旭,陈建民,卢雅丕,吴艳环.脆性组氨酸三联体基因蛋白表达与炎症性肠病的临床关系.世界华人消化杂志 2004;12(4):1006-1007
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1006.asp>

0 引言

最近FHIT基因在国外被成功分离,该基因具有不稳定性^[1-2],在多种肿瘤中,包括食管癌^[3]、胃癌^[4]、结肠癌^[5-7]、肺癌^[8-9]、肝癌^[10]、头颈癌^[11]、乳腺癌^[12]、胰腺癌^[13]和肾癌^[14]中,均有改变,以缺失为主,还有外源序列的插入^[15]。国外学者Skopelitou et al^[16]研究认为FHIT基因与IBD、UC相关性腺癌发生有关,目前国内尚无类似报道,我们采用免疫组化SP法检测IBD和UC相关性腺癌组织中FHIT蛋白表达情况,探讨FHIT基因与IBD和UC相关性腺癌的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 厦门中山医院病理科2000-01/2003-08存档石蜡块,男37例,女50例,年龄26-80岁,平均

59.2岁。其中UC38例、Crohn's病25例、UC相关性腺癌11例、正常对照组13例,FHIT抗体购自北京中山生物工程公司。

1.2 方法 所有标本经100 mL/L甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm切片,采用免疫组化SP法观察FHIT蛋白表达情况。结果判断: FHIT基因表达产物定位于细胞质,呈棕黄色颗粒状^[17]。先按染色强度评分:无色0分;浅黄色1分;黄色2分;棕黄色3分。再按阳性细胞所占百分比评分:阴性0分;阳性细胞小于或等于10%1分;阳性细胞11-50%2分;阳性细胞51-75%3分;阳性细胞大于75%4分。染色强度与阳性细胞相乘,乘积9-12分为表达阳性;6-8分为表达减弱;0-5分为表达阴性。

统计学处理 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 FHIT蛋白在正常组织中表达 13例正常对照组中,1例FHIT蛋白表达阴性(7.69%)(表1)。

2.2 FHIT蛋白在IBD中表达 38例UC中,25例FHIT蛋白表达阴性(71.43%),UC中FHIT蛋白阴性表达率显著高于正常对照组(71.43% vs 7.69%, $\chi^2=18.80$, P < 0.01)。25例Crohn's病中,19例FHIT蛋白表达阴性(76%),Crohn's病中FHIT蛋白阴性表达率显著高于正常对照组(76% vs 7.69%, $\chi^2=18.88$, P < 0.01)(表1)。

2.3 FHIT蛋白在UC相关性腺癌中表达 11例UC相关性腺癌中,6例FHIT蛋白表达阴性(54.55%),UC相关性腺癌中FHIT蛋白阴性表达率显著高于正常对照组(54.55% vs 7.69%, $\chi^2=7.75$, P < 0.05),FHIT蛋白在UC相关性腺癌与UC中表达无显著性差异(54.55% vs 71.43%, $\chi^2=0.05$, P > 0.05)(表1)。

表1 FHIT蛋白在不同肠黏膜组织中的表达

组织类型	FHIT蛋白表达			合计
	0-5分	6-8分	9-12分	
UC	25	6	7	38
Crohn's病	19	2	4	25
UC相关性腺癌	6	2	3	11
正常黏膜	1		12	13

3 讨论

FHIT基因是1996年Ohta et al^[18]利用外显子捕获法发现定位于染色体3p14.2的基因,他存在于大多数正常组织中,国外研究发现多种肿瘤组织中FHIT蛋白表达降低或丢失,并发现与该基因转录和缺失有关,提

示该基因可能为肿瘤候选抑制基因。Capuzzi et al^[19]对55例胃腺癌的研究表明，FHIT蛋白缺失与Lauren分类、肿瘤浸润无关，而与分期、分级、生存期相关，分期越晚、分级越高，FHIT丢失率越大，FHIT表达阴性患者存活时间明显低于FHIT表达阳性患者。Ho et al^[20]对48例早期肺癌的研究显示，58.3%存在FHIT表达缺失，说明FHIT变化在支气管上皮细胞生长中起重要作用。

FHIT作为一种肿瘤抑制基因，是否与IBD和UC相关性腺癌有关？我们的研究证实FHIT蛋白在UC、Crohn's病和UC相关性腺癌中阴性表达率分别为71.43%、76%和54.55%，与国外报道的结果基本一致。Skopelitou et al^[16]研究发现FHIT蛋白在UC、Crohn's病和UC相关性腺癌中阴性表达率分别为92.11%、80%和30.77%，而且还发现FHIT蛋白表达在IBD活动期和慢性愈合期、活动期和正常黏膜、慢性愈合期和正常黏膜、UC和UC相关性腺癌间存在显著性差异，提示FHIT可能与IBD活动程度、UC相关性腺癌发生有关。赵坡 et al^[21]采用免疫组化检测60例结肠癌中FHIT蛋白表达，发现55%表达阴性。

国内外学者利用RT-PCR和cDNA测序等方法，已在许多恶性肿瘤组织和细胞系中发现FHIT基因高频率缺失和/或异常转录。Mori et al^[22]对62例结肠癌进行研究，发现结肠癌异常FHIT转录本的检出率为50%。Lee et al^[23]在35例胃腺癌中发现20例存在FHIT基因高频率的缺失、异常转录，提示FHIT基因的缺失和/或异常可能造成了肿瘤的发生。

目前，国内外关于FHIT蛋白与IBD的研究甚少，我们的研究结果提示FHIT蛋白低表达与IBD发生、发展有一定联系，FHIT蛋白用免疫组化方法易于检测，可能成为新的诊治分析指标，用于临床病情监测。但由于FHIT基因在结肠上皮细胞中的生理作用尚不十分清楚，只有进一步研究，才能更好地探索其在肠道炎症发病过程中的作用。

4 参考文献

- 1 Corbin S, Neilly ME, Espinosa R, Davis EM, McKeithan TW, Le Beau MM. Identification of unstable sequences within the common fragile site at 3p14.2: implications for the mechanism of deletions within fragile histidine triad gene/common fragile site at 3p14.2 in tumors. *Cancer Res* 2002;62:3477-3484
- 2 Becker NA, Thorland EC, Denison SR, Phillips LA, Smith DI. Evidence that instability within the FRA3B region extends four megabases. *Oncogene* 2002;21:8713-8722
- 3 Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, Croce CM. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:3724-3728
- 4 Skopelitou AS, Mitselou A, Katsanos KH, Alexopoulou V, Tsianos EV. Immunohistochemical expression of Fhit protein in *Helicobacter pylori* related chronic gastritis, gastric precancerous lesions and gastric carcinoma: correlation with conventional clinicopathologic parameters. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:515-523
- 5 Kuwai T, Tanaka S, Kaio E, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of Fhit expression in development of colorectal carcinoma of various macroscopic types. *Int J Mol Med* 2003;12:437-442
- 6 Andachi H, Yashima K, Koda M, Kawaguchi K, Kitamura A, Hosoda A, Kishimoto Y, Shiota G, Ito H, Makino M, Kaibara N, Kawasaki H, Murawaki Y. Reduced Fhit expression is associated with mismatch repair deficiency in human advanced colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2002;87:441-445
- 7 Mady HH, Melhem MF. FHIT protein expression and its relation to apoptosis, tumor histologic grade and prognosis in colorectal adenocarcinoma: an immunohistochemical and image analysis study. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:351-358
- 8 朱丽琴, 刁路明, 陈德基, 李红钢, 刘绚, 邹祖玉, 李蓓芸, 王敏, 刘铭球. 非小细胞肺癌中hMSH2、FHIT基因表达的相关性及意义. *癌症* 2003;22:571-574
- 9 Yendamuri S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003;63:878-881
- 10 Zhao P, Song X, Nin YY, Lu YL, Li XH. Loss of fragile histidine triad protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1216-1219
- 11 Huang LW, Chao SL, Chen TJ. Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecol Oncol* 2003;90:331-337
- 12 Yang Q, Nakamura Y, Nakamura M, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. Loss of Msh2 is not associated with FHIT deletion in breast carcinomas. *Anticancer Res* 2002;22:2591-2595
- 13 Tsujiuchi T, Sasaki Y, Kubozoe T, Konishi Y, Tsutsumi M. Alterations in the Fhit gene in pancreatic duct adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in hamsters. *Mol Carcinog* 2003;36:60-66
- 14 Sukosd F, Kuroda N, Beothe T, Kaur AP, Kovacs G. Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:455-457
- 15 Su T, Suzui M, Wang L, Lin CS, Xing WQ, Weinstein IB. Deletion of histidine triad nucleotide-binding protein 1/PKC-interacting protein in mice enhances cell growth and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7824-7829
- 16 Skopelitou AS, Katsanos KH, Michail M, Mitselou A, Tsianos EV. Immunohistochemical expression of FHIT gene product in inflammatory bowel disease: significance and correlation with clinicopathological data. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:665-673
- 17 Hao XP, Willis JE, Pretlow TG, Rao JS, MacLennan GT, Talbot IC, Pretlow TP. Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *Cancer Res* 2000;60:18-21
- 18 Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996;84:587-597
- 19 Capuzzi D, Santoro E, Hauck WW, Kovatich AJ, Rosato FE, Baffa R, Huebner K, McCue PA. Fhit expression in gastric adenocarcinoma: correlation with disease stage and survival. *Cancer* 2000;88:24-34
- 20 Ho WL, Chang JW, Tseng RC, Chen JT, Chen CY, Jou YS, Wang YC. Loss of heterozygosity at loci of candidate tumor suppressor genes in microdissected primary non-small cell lung cancer. *Cancer Detect Prev* 2002;26:343-349
- 21 赵坡, 吕亚莉, 胡颖川, 钟梅, 李志军, 李向红. 结直肠癌脆弱性组氨酸三联体蛋白表达丢失研究. *中华病理学杂志* 2002;31:124-127
- 22 Mori M, Mimori K, Masuda T, Yoshinaga K, Yamashita K, Matsuyama A, Inoue H. Absence of Msh2 protein expression is associated with alteration in the FHIT locus and Fhit protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:7379-7382
- 23 Lee SH, Kim CJ, Park HK, Koh JW, Cho MH, Baek MJ, Lee MS. Characterization of aberrant FHIT transcripts in gastric adenocarcinomas. *Exp Mol Med* 2001;33:124-130

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志审稿人

在本期文章审稿中(包括退稿), 审稿人精心的审稿, 为提高世界华人消化杂志的质量而贡献了力量. 编辑和投稿作者, 非常感谢顾问、编委和审稿人的帮助.

蔡淦 教授	彭吉润 副教授
上海中医药大学附属曙光医院	北京大学人民医院肝胆外科中心
陈红松 副研究员	彭淑牖 教授
北京大学肝病研究所	浙江医科大学附属第二院外科研究所
陈家春 教授	钱建民 教授
湖北中医学院	南京医科大学第一附属医院肝胆外科
陈耀凯 副教授	秦环龙 副教授
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	上海交通大学附属第六人民医院
程明亮 教授	邱赛红 研究员
贵阳医学院附属医院	湖南中医药大学中药学教研室
董蕾 教授	石统东 副教授
西安交通大学第二医院消化内科	第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所
房静远 教授	孙志伟 副研究员
上海第二医科大学附属仁济医院	军事医学科学院生物工程研究所
冯志华 副教授	王鲁 副主任医师
西安第四军医大学唐都医院传染科	上海复旦大学附属中山医院肝外科肝癌研究所
高春芳 副教授	王小众 副教授
上海市第二军医大学附属长征医院全军医学免疫中心	福建医科大学附属协和医院消化内科
韩泽广 主任	王苑本 教授
上海国家人类基因组南方研究中心	解放军解放军271医院消化内科
侯晓华 教授	王振军 教授
武汉华中科技大学同济医学院协和医院消化内科	北京大学第一医院普外科
胡以平 教授	魏来 教授
上海第二军医大学细胞生物学教研室	北京大学人民医院肝病研究所
江学良 副主任医师	沃健儿 副研究员
济南军区总医院消化内科	浙江大学传染病研究所
黎介寿 教授	吴咸中 教授
南京军区南京总医院全军普外研究所	中国工程院院士, 天津市中西医结合急腹症研究所
李靖 副教授	邢金良 讲师
重庆第三军医大学新桥医院肝胆外科	解放军第四军医大学细胞工程研究中心
李岩 主任 教授	徐小元 教授
主任医师 沈阳中国医科大学第二临床学院消化内科	北大医院感染科
刘军 讲师	许洪卫 教授
西安第四军医大学病原生物学教研室	上海同济大学附属铁路医院普通外科
刘平 副校长 教授	杨旭 教导
上海中医药大学	中南大学湘雅二医院肝病研究中心
刘正稳 教授	于聪慧 副主任医师 北京军区总医院肝胆外科
西安交通大学第一医院	臧伟进 教授
卢绮萍 主任医师	西安心血管生理管理研究室 77号报箱
广州军区武汉总医院普通外科	詹林盛 研究员
吕宾 教授	军事医学科学院野战输血研究所
浙江省中医院医消化内科	张万岱 教授
马春红 副教授	解放军第一军医大学南方医院消化科
山东大学医学院免疫学研究所	钟鸣 副研究员
梅林 教授	广西民族医药研究所
北京大学医学部生理学与病理生理学系	朱青 主治医师
潘兴华 副主任医师	陕西省人民医院
成都军区昆明总医院医学实验科	