

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE**JOURNAL OF DIGESTOLOGY****Shijie Huaren Xiaohua Zazhi****2003 年 7 月 15 日 第 11 卷 第 7 期****(Volume 11 Number 7)****7/2003**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 7 月 15 日 第 11 卷 第 7 期 (总第 111 期)

述 评

- 881 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征 聂青和, 罗新栋, 惠武利
888 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制 成军
897 老年消化系疾病的中西医结合治疗 张万岱

肝 癌

- 900 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤 凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强
904 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡
908 参白胶囊诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡 吴苏冬, 刘长利, 王慧川, 鲍德虎
912 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 的研究 冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉
916 TDI-FP 法分析肝细胞癌组织中 HBV 核心启动子双突变 吕贯廷, 卢冰, 白玉杰, 张剑, 阎小君

病毒性肝炎

- 920 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
925 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
930 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩
935 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 10 的克隆化研究 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚
939 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
943 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军
947 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
951 丙型肝炎病毒核心蛋白上调 NIP3 基因表达研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰
955 丙型肝炎病毒核心蛋白上调层粘蛋白 B1 链基因启动子表达活性的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 杨艳杰, 张树林
959 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 上调新生多肽相关复合物 α 多肽基因的表达 杨倩, 刘妍, 成军, 李克, 王建军, 洪源, 张树林
963 乙型肝炎肝纤维化及癌变时脾脏超声影像, HBV e 系统及 APF 水平 柯伟民, 林国莉, 叶一农, 赖菁, 李建国
966 乙型肝炎病毒核壳蛋白变异株在 HepG₂ 细胞的 HLA-I 表达 陈伟红, 何海棠, 张明霞, 刘志华, 周永兴

基础 研究

- 970 联合应用粉防己碱与甘草酸抑制肝纤维化大鼠细胞外基质表达 王志荣, 陈锡美, 李定国, 魏红山, 黄新, 展玉涛, 陆汉明
975 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉
979 选择性环氧合酶-2 抑制剂 Celebrex 对胰腺癌 PGE₂ 和血管内皮因子表达的影响 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大
982 早期肠道营养减轻烧伤后肠黏膜损伤的机制研究 彭毅志, 袁志强, 肖光夏
986 胃肠道平滑肌细胞作为 eNOS 基因转移靶细胞的研究 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力
990 内皮素-1 特异性抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 许国铭
994 肠三叶因子在胃黏膜应激性损伤中的修复作用 李兆申, 聂时南, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭
997 p⁵³ 突变与 VEGF 在大鼠胃癌中的表达及中药胃康宁的防治作用 李庆明, 余谦, 闵存云

焦 点 论 坛

- 1001 乙型和丙型肝炎病毒蛋白反式激活作用机制及其意义的研究进展 成军
1002 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟
1004 乙肝病毒表面抗原基因启动子 II 的结构及调节研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮
1006 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军
1008 乙型肝炎病毒增强子的结构和调控研究 王建军, 成军, 刘妍, 张忠东, 杨倩, 杨艳杰
1011 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强

文献综述

1014 丙型肝炎病毒复制子的研究 纪冬, 成军, 王建军

1018 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的反式激活作用研究 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰

1020 丙型肝炎病毒 5' - 非翻译区的结构与功能研究 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林

1023 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对 14-3-3 蛋白信号转导的影响 成军

1027 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林

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

1035 骨髓源性肝干细胞的研究进展 杨明智, 彭志海

1037 ERK 信号传导通路与肝星状细胞周期调控 蒋明德, 马洪德, 解方为

1040 趋化因子与肝病的研究进展 胡迎宾, 田德安, 刘南植

1043 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎 高志强, 陆付耳

1046 KAI1 基因在胰腺癌中抗转移作用的研究 任丽楠, 刘民培, 郭晓钟, 徐建华, 安天义

1050 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势 谢正勇, 卿三华

1054 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展 李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书

1059 NO 和 VIP 与胃肠电-机械活动的关系 章敏, 曲瑞瑶

1064 TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展 刘占奎, 张超

1068 自由基损伤在幽门螺杆菌相关胃病中的作用 陶惠, 朱道银, 邹全明, 毛旭虎

907 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志
915 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®
946 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册
950 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快
954 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次
985 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单
993 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助
1030 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊
1053 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
1058 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版
1063 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
附 1 Journal Citation Reports 2002-China
附 2 Journal Citation Reports 2002-GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY
附 3 2003 年 Index Medicus 收录中国期刊
附 4 2003 年 ISI 收录中国科技期刊

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平	题写封面刊名
陈可冀	题写版权刊名
	(月刊)

创刊 1993-01-15

改刊 1998-01-25

出版 2003-07-15

原刊名 新消化病学杂志

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

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

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

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

电话 (010)85381892

传真 (010)85381893

北京科信印刷厂

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

订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)

电话:(010)85381892

传真:(010)85381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

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

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

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

邮发代号

82-262

国外代号

M 4481

国内定价

每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证

1401004000050

www.wjgnet.com

胃肠道平滑肌细胞作为eNOS基因转移靶细胞的研究

宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力

宁守斌, 张忠兵, 谢渭芬, 杨秀疆, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003
沈茜, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院实验诊断科 上海市 200433
赵新, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院血管外科 上海市 200433
信栓力, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院心内科 上海市 200003
宁守斌, 男, 1973-11-06 生, 甘肃省景泰县人, 汉族, 上海第二军医大学博士研究生, 主要从事胃肠激素与胃肠动力的研究。
项目负责人: 张忠兵, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科。zhongbingz@yahoo.com.cn
电话: 021-63610109-73254
收稿日期: 2002-10-09 接受日期: 2002-10-30

Gastrointestinal smooth muscle cell as target for gene transfer of eNOS gene

Shou-Bin Ning, Zhong-Bing Zhang, Qian Sheng, Wei-Fen Xie, Xiu-Jiang Yang, Xin Zhao, Shuan-Li Xin

Shou-Bin Ning, Zhong-Bing Zhang, Wei-Fen Xie, Xiu-Jiang Yang, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University 200003, Shanghai, China
Qian Sheng, Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, The Second Military Medical University 200433, Shanghai, China
Xin Zhao, Department of Vascular Surgery, Changhai Hospital, The Second Military Medical University 200433, Shanghai, China
Shuan-Li Xin, Department of cardiology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University 200003, Shanghai, China
Correspondence to: Zhong-Bing Zhang, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University 200003, Shanghai, China. zhongbingzhang@hotmail.com
Received: 2002-10-09 Accepted: 2002-10-30

Abstract

AIM: To generate an adenoviral vector carrying endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) gene in order to mediate the expression of eNOS gene in gastrointestinal smooth muscle cells (SMC) and assess the enzyme activity of eNOS.

METHODS: A recombinant adenovirus (Ad-eNOS) containing the bovine eNOS cDNA fragment was generated by homologous recombination in bacteria. The SMC of distal part of esophagus and gastric fundus of cat were isolated and cultured in vitro and infected with Ad-eNOS. The expression of eNOS gene was detected by Western blot and RT-PCR. The enzyme activity of NOS and the output of NO in SMC were measured by NOS and NO assay kit, furthermore, the different effects of given factors on the enzyme activity and the yield of NO were studied.

RESULTS: The Ad-eNOS can infect the cultured SMC efficiently (MOI=50, infection rate = 74 %). Western blot and RT-PCR confirmed the expression of eNOS in those infected cells. After the cells had been infected with Ad-eNOS, the basal activity of NOS significantly increased from 47 ± 13 nkat/L to 93 ± 13 nkat/L ($P < 0.05$), and the level of NO in cell culture supernatants increased by 3 fold (45 ± 13 vs 16 ± 7 $\mu\text{mol/L}$). In the presence of L-arginine (NOS enzyme substrate), calcium, EGTA (calcium chelating agent), and L-NAME (NOS

inhibitor), NOS activity was 94 ± 8 , 173 ± 25 , 29 ± 6 , 58 ± 11 nkat/L and NO level was 48 ± 14 , 106 ± 18 , 6 ± 2 , 17 ± 11 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

CONCLUSION: The constructed recombinant adenovirus, Ad-eNOS, can efficiently mediate the expression of eNOS gene in cultured SMC of digestive tract. The activity of eNOS can be regulated by the concentration of calcium. L-arginine is not the rate-limiting step for nitric oxide generation from endothelial nitric oxide synthase.

Ning SB, Zhang ZB, Sheng Q, Xie WF, Yang XJ, Zhao X, Xin SL. Gastrointestinal smooth muscle cell as target for gene transfer of eNOS gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(7):986-989

摘要

目的: 构建内皮型一氧化氮合酶(eNOS)腺病毒表达载体, 介导eNOS在胃肠道平滑肌细胞中稳定表达并评价表达产物eNOS的酶学活性。

方法: 构建牛eNOS的重组腺病毒表达载体Ad-eNOS, 感染体外培养的猫下段食管及胃底部平滑肌细胞, 采用Western blot、RT-PCR技术检测eNOS在平滑肌细胞中的表达, 测定基因转移后NOS活性以及一氧化氮(NO)产量, 并研究不同施加因素对NOS活性及NO合成的影响。

结果: Ad-eNOS可高效感染体外培养的胃肠平滑肌细胞(MOI=50, 感染效率=74%), Western blot、RT-PCR结果证实eNOS在平滑肌细胞中高效表达。Ad-eNOS感染细胞后基础NOS活性比感染前显著增高(93 ± 13 vs 47 ± 13 nkat/L, $P < 0.05$), 培养液中累积的NO增加了3倍(45 ± 13 vs 16 ± 7 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$)。分别加入L-精氨酸(10^{-4} mol/L)、钙离子(10^{-4} mol/L)、EGTA(钙离子螯合剂, 10^{-4} mol/L)及L-NAME(NOS抑制剂, 10^{-3} mol/L)后, NOS活性分别为 94 ± 8 , 173 ± 25 , 29 ± 6 , 58 ± 11 nkat/L, NO含量分别为 48 ± 14 , 106 ± 18 , 6 ± 2 , 17 ± 11 $\mu\text{mol/L}$ 。

结论: 构建的重组腺病毒Ad-eNOS能够高效介导eNOS基因在消化道平滑肌细胞中表达, 表达产物eNOS活性受钙离子浓度调节, 其作用底物L-精氨酸并不是NO合成的限速步骤。

宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力. 胃肠道平滑肌细胞作为eNOS基因转移靶细胞的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(7):986-989

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/986.asp>

0 引言

一氧化氮(NO)与消化系统多种疾病的发生密切相关,

他作为一种重要的抑制性氮能神经递质, 与血管活性肠肽(VIP)共同介导胃肠平滑肌的松弛运动^[1-3]. NO合成障碍是先天性巨结肠、贲门失弛缓症、弥漫性食管痉挛、肥厚性幽门梗阻、Oddi括约肌运动功能障碍等疾病发生的重要因素^[4-16]. 另外NO可通过调节胃黏膜血流量及促进胃黏液分泌发挥黏膜保护作用, 有利于溃疡的愈合^[17-21]. 但NO半衰期极短, 限制了其供体类药物的临床应用, 所以构建一种能在胃肠平滑肌细胞中稳定表达一氧化氮合酶(NOS)基因的真核表达载体, 使病变部位持续释放NO, 有可能为这些疾病的治疗提供一种新的思路和方法.

1 材料和方法

1.1 材料 编码牛eNOS的全长cDNA序列(4 092 bp)克隆在质粒eNOS-pcDNA3中, 由耶鲁大学William C. Sessa博士惠赠^[22]; 腺病毒AdEasyTM系统包括穿梭质粒pAdTrack-CMV以及腺病毒骨架质粒pAdEasy-1, 由美国霍华德-休斯医学研究所He TC惠赠^[23]. 鼠抗牛的eNOS单克隆抗体及驴抗鼠-IgG购自Santa Cruz公司, 限制性内切酶Pme I, Pac-I购自BioLabs公司, 其他限制性内切酶Xba I, EcoR I, Not I, Hind III以及T4 DNA连接酶、DNA片段胶回收试剂盒、1 kb及23 kb的DNA分子质量标准、RT-PCR试剂盒、脂质体LipofectAmine等分别购自Promega, Sigma, Gibco公司. NOS及NO测定试剂盒购自南京建成生物制品有限公司. 家猫两只购自第二军医大学实验动物中心.

1.2 方法 食管及胃底平滑肌细胞培养参考文献[24]并加以改进: 家猫氯氨酮麻醉后取1 cm长的下段食管组织及1.5 × 1 cm胃底部组织, 剥离环行肌及纵行肌后分别用4 ml 1 g/L胶原酶、0.1 g/L胰蛋白酶抑制剂于31 °C消化2次, 30 min/次(每隔5 min用旋涡震荡器震荡一次)至组织呈絮状, 500 μm的分子筛过滤, 离心后细胞用含150 mL/L小牛血清的高糖(12 mmol/L)DMEM培养基将细胞数调至2 × 10⁴, 接种于培养瓶中, 置于37 °C, 50 mL/L CO₂的孵箱内培养. eNOS-pcDNA3经Not I及Hind III双酶切得到4.1 kb的目的条带, 胶回收后定向克隆至穿梭质粒pAdTrack-CMV中形成转移质粒pAdTrack-CMV-eNOS, 后者与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1经电穿孔共同转化大肠杆菌BJ5183, 利用细菌内的同源重组机制进行重组^[23], 形成重组腺病毒质粒Ad-eNOS. 将Ad-eNOS用脂质体介导转染293细胞包装成病毒颗粒, 反复感染293细胞扩增病毒获得高滴度的病毒上清, 氯化铯梯度超速离心纯化后通过计数报告基因绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞数测定病毒滴度. 用相同的方法构建对照病毒Ad-Track-CMV(将空的穿梭质粒pAdTrack-CMV与pAdEasy-1进行重组). 重组腺病毒Ad-eNOS感染效率的测定: 用不同MOI(10、50、100)的重组腺病毒Ad-eNOS感染体外培养的平滑肌细胞, 荧光显微镜下观察GFP的表达情况, 流式细胞仪测定

病毒的感染效率. 重组病毒Ad-eNOS及对照病毒Ad-Track-CMV分别感染平滑肌细胞, 采用RT-PCR、Western blot等方法分别从基因转录水平及蛋白质水平测定eNOS基因在平滑肌细胞中的表达. 扩增250 bp长度eNOS的引物引自文献[25] (5' primer: TCA ACC AGT ACT ACA GCT CC; 3' primer: GTG GTT GCA GAT GTA GGT GA), 扩增350 bp长度内参照β-actin的引物自行设计 (5' primer: AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC; 3' primer: ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC). 细胞培养液中NO含量及细胞中NOS活性的测定: 用50 MOI的Ad-eNOS及对照病毒Ad-Track-CMV分别感染实验组和对照组细胞(各孔细胞数控制在10⁶左右, 培养液体积均为1.0 mL), 并分别于加入病毒之前、之后, 以及在培养液中分别加入L-精氨酸(L-Arg, 10⁻⁴ mol/L)、氯化钙(10⁻³ mol/L)、EGTA(Ca²⁺螯合剂, 10⁻⁴ mol/L)、硝基-L-精氨酸甲基酯(L-NAME, NOS抑制剂, 10⁻³ mol/L)后吸取培养液分别测定NO含量及NOS活性. NOS酶活力单位定义: 每升细胞培养液中每秒钟生成1 nmol NO为1 nkat/L.

统计学处理 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 感染前后自身对照采用配对t检验, 感染以后多个处理组间采用F检验进行统计学处理, P值 < 0.05为显著性差异.

2 结果

转移质粒pAdTrack-CMV-eNOS构建后经鉴定正确, 将pAdTrack-CMV-eNOS及pAdTrack-CMV分别与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1同源重组形成重组腺病毒质粒Ad-eNOS和Ad-Track-CMV. 二者用Pac-I均切出了4.5 kb及大于23 kb两条带, 选用位于目的基因eNOS两侧的多克隆位点, 分别用EcoR I单酶切及Xba I, Sal I双酶切均出现了4.1 kb的目的条带, Ad-Track-CMV用Xba I酶切可使其线性化(图1). 证明两个重组病毒质粒构建成功. 重组质粒包装成重组病毒颗粒并扩增纯化后GFP计数法测得Ad-eNOS和Ad-Track-CMV病毒滴度分别为6 × 10¹² pfu/L和4 × 10¹² pfu/L. 原代培养的食管及胃底平滑肌细胞生长至10-12 d大部分细胞融合, 二者在形态上无明显区别, 均呈现平滑肌细胞典型的“峰-谷”样生长方式(图2), 经抗α-actin免疫组织化学染色及电镜观察鉴定, 证明培养的细胞为平滑肌细胞, 纯度达到95%以上, 台盼蓝染色提示细胞存活率达到94%以上. 重组病毒感染平滑肌细胞后在荧光显微镜下可见平滑肌细胞内有GFP表达(图3), 流式细胞仪测定结果提示当MOI分别为10、50和100时感染效率分别为21%、74%和100%.

2.1 eNOS在食管及胃平滑肌细胞中的表达 RT-PCR结果提示, Ad-eNOS感染平滑肌细胞后可特异扩增出针对目的基因的片段, 而对照病毒感染的细胞未出现此条带(图4). Western blot结果证实, Ad-eNOS感染后,

无论细胞培养液中还是细胞裂解液中均出现了约135 kDa大小的特异性蛋白条带, 与 eNOS 基因产物的大小一致, 而对照组为阴性(图 5).

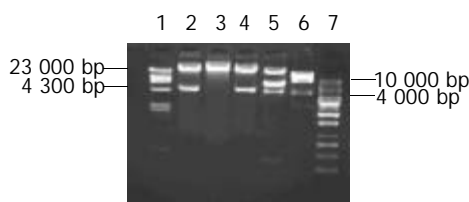


图1 Ad-eNOS及Ad-Track-CMV酶切鉴定图谱. 1 λ -Hind III DNA Marker (23 kb); 2 Ad-Track-CMV (Pac I); 3 Ad-Track-CMV (Xba I); 4 Ad-eNOS (Pac I); 5 Ad-eNOS (EcoR I); 6 Ad-eNOS (Xba I, Sal I); 7 λ -Hind III DNA Marker (1 kb).

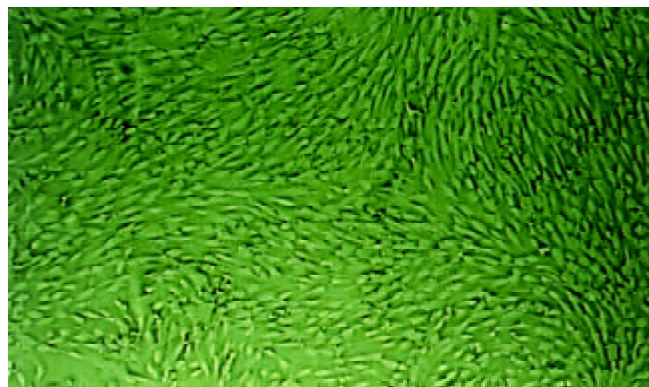


图2 食管平滑肌细胞培养 10 d 时呈现“峰-谷”状的生长方式($\times 50$).

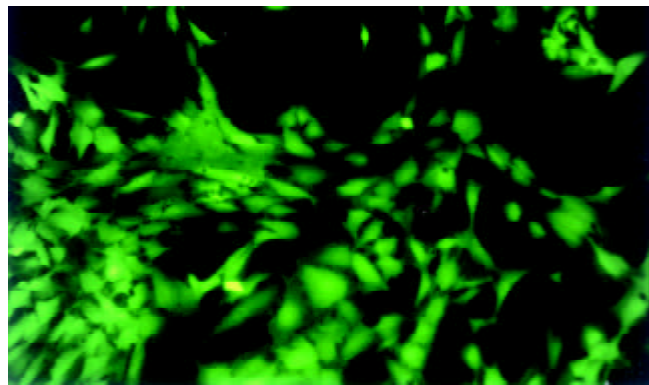


图3 报告基因 GFP 在体外培养的食管平滑肌细胞中大量表达.

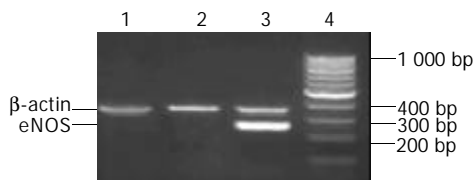


图4 RT-PCR 结果: eNOS 在平滑肌细胞中表达. 1 未感染病毒; 2 感染 Ad-Track-CMV; 3 感染 eNOS-Ad λ -Hind III DNA Marker(100 bp).

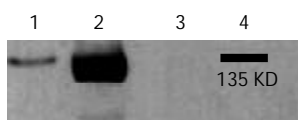


图5 Western blot 结果. 1 感染 eNOS-Ad 平滑肌细胞培养基上清; 2 感染 eNOS-Ad 平滑肌细胞裂解液; 3 感染 Ad-Track-CMV 平滑肌细胞裂解液; 4 蛋白质分子量标准.

2.2 NO 含量及 NOS 活性测定结果 Ad-eNOS 感染后平滑肌细胞中 NOS 活性、培养液中 NO 含量均比感染前及对照组明显增加($P < 0.05$, 表 1). 培养液中加入 L-精氨酸(NOS 作用底物)后 NOS 活性、NO 代谢产物含量无明显变化($P > 0.05$), 但加入钙离子后 NOS 活性增加、NO 含量显著升高($P < 0.05$), 而钙离子螯和剂 EGTA 几乎可以完全抑制酶的活性. NOS 抑制剂 L-NAME 也可明显抑制 NOS 活性, 使培养液中 NO 含量减少($P < 0.05$).

表1 NOS 活性及 NO 含量的测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

	NOS(nkat/L)	NO(μ mol/L)
空白组	47 \pm 13	15.64 \pm 6.62
Ad-Track-CMV	45 \pm 14	13.74 \pm 9.32
Ad-eNOS	97 \pm 13 ^{ac}	45.37 \pm 12.65 ^{ac}
L-Arg	94 \pm 8	48 \pm 14
Ca ²⁺	173 \pm 25 ^e	106 \pm 18 ^e
EDTA	29 \pm 6 ^e	6 \pm 2 ^e
L-NAME	58 \pm 11 ^e	17 \pm 11 ^e

^aP < 0.05 vs 空白组, ^cP < 0.05 vs Ad-Track-CMV, ^eP < 0.05 vs Ad-eNOS.

3 讨论

催化产生 NO 的一氧化氮合酶(NOS)有三种亚型: 即神经元型(nNOS)、诱导型(iNOS)及 Ca²⁺/钙调素(CaM)依赖结合型(eNOS), 分别由不同的基因编码^[26-28]. 人们通常将 nNOS 和 eNOS 合称为结构型一氧化氮合酶(cNOS), 其活性为 Ca²⁺/CaM 依赖性, 受细胞内 Ca²⁺ 浓度的生理性调节, 而 iNOS 活性为非 Ca²⁺ 依赖性, 其表达受内毒素、IL-1 等诱导. 结构型一氧化氮合酶广泛分布于胃肠道, nNOS 主要分布在胃肠肌间神经丛, eNOS 主要分布在胃肠平滑肌细胞、肠壁血管内皮及血管平滑肌细胞, 二者也可共存于一些黏膜固有层细胞中^[29-32]. NO 合成障碍与先天性巨结肠、贲门失弛缓症、弥漫性食管痉挛、特发性肠梗阻、肥厚性幽门梗阻、便秘等疾病的发生密切相关, 而且 NO 可以促进溃疡的愈合. 若将外源性的 eNOS 基因转移至相应部位平滑肌细胞使之产生 NO, 理论上对这些疾病能发挥有效的治疗作用.

我们利用细菌内同源重组法构建了携带目的基因 eNOS 的重组腺病毒载体. 腺病毒不仅能够高效感染多种增生细胞, 而且也能感染静息哺乳类细胞, 且不与细胞的基因组发生整合, 不引起基因突变, 可以携带较大片段的外源基因, 是一种比较理想的用于基因治疗的表达载体^[33,34]. 平滑肌细胞是组成胃肠道最重要的组织细胞之一, 是引起胃肠运动的效应细胞, 在生理情况下胃肠道平滑肌细胞内有低丰度的 eNOS 表达^[2], 所以胃肠平滑肌细胞可作为表达外源 eNOS 基因产生 NO 的理想场所, 是进行基因治疗的理想靶细胞. 我们在体外成功分离培养了较高纯度的食管及胃底平滑肌细胞, 并证明构建的 eNOS 重组腺病毒 Ad-eNOS 能高效感染体外培养

的平滑肌细胞, 从而成功介导了外源基因 eNOS 在平滑肌细胞中的表达. 进一步的实验表明, 基因表达产物 eNOS 的活性受到 Ca^{2+} 浓度的调节, 符合其 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依赖性的生化特征. 底物 L-精氨酸似乎并不是酶促反应的限速步骤, 可能是由于 eNOS 的 K_m 值(酶促反应速度达到最大速度一半时的底物浓度)很低, 细胞培养液中的浓度远远超过这个值, 而且平滑肌细胞可通过尿素循环将 L-瓜氨酸再转化为 L-精氨酸而被循环利用^[35], 这就保证了基因转移后在体内不会由于底物缺乏而影响 NO 的产生.

4 参考文献

- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990;345:346-347
- Teng B, Murthy KS, Kuemmerle JF, Grider JR, Sase K, Michel T, Makhoul GM. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;275(2Pt 1):G342-351
- Kurjak M, Fritsch R, Saur D, Schusdziaira V, Allescher HD. Functional coupling between nitric oxide synthesis and VIP release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5. *J Physiol* 2001; 534 (Pt 3):827-836
- Sivarao DV, Mashimo HL, Thatte HS, Goyal RK. Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS (-/-) and hypotensive in W/W(v) mutant mice. *Gastroenterology* 2001;121:34-42
- Kusafuka T, Puri P. Altered mRNA expression of the neuronal nitric oxide synthase gene in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1997;32:1054-1058
- Shima Y, Mori M, Takakura N, Tanaka N, Yokoi I, Kabuto H, Yamazato T. Continuous monitoring of nitric oxide release induced by cholecystokinin from the choledochal sphincter in guinea pigs. *Digestion* 2000;61:135-139
- Chiu JH, Lui WY, Chen YL, Hong CY. Local somatothermal stimulation inhibits the motility of sphincter of Oddi in cats, rabbits and humans through nitrergic neural release of nitric oxide. *Life Sci* 1998;63:413-428
- Shima Y, Mori M, Harano M, Tsuge H, Tanaka N, Yamazato T. Nitric oxide mediates cerulein-induced relaxation of canine sphincter of Oddi. *Dig Dis Sci* 1998;43:547-553
- Millar AJ, Steinberg RM, Raad J, Rode H. Anal achalasia after pull-through operations for Hirschsprung's disease-preliminary experience with topical nitric oxide. *Eur J Pediatr Surg* 2002;12: 207-211
- Saur D, Paehge H, Schusdziaira V, Allescher HD. Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2000;118:849-858
- De Giorgio R, Di Simone MP, Stanghellini V, Barbara G, Tonini M, Salvioli B, Mattioli S, Corinaldesi R. Esophageal and gastric nitric oxide synthesizing innervation in primary achalasia. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2357-2362
- Lui H, Vanderwinden JM, Ji P, De Laet MH. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of children with cardiac achalasia. *Chin Med J* 1997;110:358-361
- Faussone-Pellegrini MS, Infantino A, Matini P, Masin A, Mayer B, Lise M. Neuronal anomalies and normal muscle morphology at the hypomotile ileocecolonic region of patients affected by idiopathic chronic constipation. *Histol Histopathol* 1999;14:1119-1134
- Subramaniam R, Doig CM, Moore L. Nitric oxide synthase is absent in only a subset of cases of pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 2001;36:616-619
- Gentile C, Romeo C, Impellizzeri P, Turiaco N, Esposito M, Di Mauro D, Mondello MR. A possible role of the plasmalemmal cytoskeleton, nitric oxide synthase, and innervation in infantile hypertrophic pyloric stenosis. A confocal laser scanning microscopic study. *Pediatr Surg Int* 1998;14:45-50
- Guo R, Nada O, Suita S, Taguchi T, Masumoto K. The distribution and co-localization of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide in nerves of the colons with Hirschsprung's disease. *Virchows Arch* 1997;430:53-61
- Khattab MM, Gad MZ, Abdallah D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacol Res* 2001; 43:463-467
- 乐桥良, 文晓冬. 大鼠应激性溃疡中一氧化氮的作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:815-816
- 余贤恩, 罗绮凝. 外源性一氧化氮对豚鼠酸化乙醇性胃黏膜损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:224
- 曾锦章, 张万岱, 刘晓霞, 张振书, 张亚历, 周殿元. 蛋白酪氨酸激酶与一氧化氮合酶活性的变化在胃黏膜损伤修复中的作用和意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:354-355
- 闫长栋, 李平, 祁友键. 大鼠胃扩张致胃酸分泌中 NO 对胃黏膜血流量的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:1067-1068
- Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D' Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;267:15274-15276
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2509-2514
- Yuan QX, McRoberts JA, Lakshmanan J, Yagi H, Hyman PE. Newborn rabbit gastric smooth muscle cell culture: EGF and TGF- α are potent mitogens. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17:153-160
- Kalra M, Jost CJ, Severson SR, Miller VM. Adventitial versus intimal liposome-mediated ex vivo transfection of canine saphenous vein grafts with endothelial nitric oxide synthase gene. *J Vasc Surg* 2000;32:1190-1200
- Zhang J, Patel JM, Block ER. Molecular cloning, characterization and expression of a nitric oxide synthase from porcine pulmonary artery endothelial cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997;116:485-491
- Iwashina M, Hirata Y, Imai T, Sato K, Marumo F. Molecular cloning of endothelial, inducible nitric oxide synthase gene from rat aortic endothelial cell. *Eur J Biochem* 1996;237:668-673
- Ogura T, Yokoyama T, Fujisawa H, Kurashima Y, Esumi H. Structural diversity of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193: 1014-1022
- Chen YM, Qian ZM, Zhang J, Chang YZ, Duan XL. Distribution of constitutive nitric oxide synthase in the jejunum of adult rat. *World J Gastroenterol* 2002;8:537-539
- Lindstrom LM, Ekblad E. Origins and projections of nerve fibres in rat pyloric sphincter. *Auton Neurosci* 2002;97:73-82
- Konig P, Dedio J, Muller-Esterl W, Kummer W. Distribution of the novel eNOS-interacting protein NOSIP in the liver, pancreas, and gastrointestinal tract of the rat. *Gastroenterology* 2002; 123:314-24
- Peng X, Feng JB, Yan H, Zhao Y, Wang SL. Distribution of nitric oxide synthase in stomach myenteric plexus of rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:852-854
- Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol* 2001;18:63-70
- Breyer B, Jiang W, Cheng H, Zhou L, Paul R, Feng T, He TC. Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001;1:149-162
- Mohacs T, Mozes G, Sato J, Gloviczki P, Katusic Z, O'Brien T. L-arginine availability is not limiting for nitric oxide generation from recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Vasc Res* 1999;36:437-444



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

