

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 9 月 15 日 第 11 卷 第 9 期

(Volume 11 Number 9)



**9/2003**

ISSN 1009-3079



9 771009 307001

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 9 月 15 日 第 11 卷

第 9 期 (总第 113 期)

## 述 评

- 1269 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升, 尚克中  
1273 胃食管反流病的内镜缝合治疗 杨云生, 令狐恩强

## 胃 癌

- 1275  $\alpha$ -连接素表达与胃癌生物学行为的关系 徐采朴, 周永宁, 陈渝  
1279 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访 王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆孚, 王刚石, 李晖, 姚晨, 吴本俨, 尤纬缔  
1282 内皮抑素-血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗 潘欣, 李喆, 张珉, 王泳, 潘卫, 戚中田  
1286 PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 在早期胃癌中的表达 冯瑞娥, 陈杰, 崔全才, 詹阳, 王振宇  
1290 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响 张良运, 凌晖, 苏琦, 宋颖, 梁晓秋  
1294 胃黏膜癌变过程中 PTEN 基因编码产物的表达及意义 李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东璘, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉  
1297 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系 黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 申明识  
1302 雌激素诱导基因 PS2/TFF1 在胃癌及癌前病变中的表达 李俊美, 罗和生, 姚宏昌  
1306 GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌及幽门螺杆菌感染的关联 张友才, 邓长生, 周燕, 朱尤庆  
1310 基质金属蛋白酶-7 表达与胃癌临床病理生物学行为的关系 孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌  
1314 毒物代谢酶基因多态与胃癌的关联 叶梅, 刘君炎, 邓长生  
1318 胃癌中医证型相关基因的表达谱 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 刘平

## 肝 癌

- 1322 MUC1 基因免疫抑制 H22 肝癌生长的实验研究 袁时芳, 王岭, 李开宗, 颜真, 韩苇, 张英起  
1326 纺锤体组装关卡基因 hsMAD2 在人肝细胞肝癌中的表达及其意义 李擒龙, 王文亮, 张晓晖, 晏伟  
1329 GnRH 类似物诱导肝癌细胞凋亡的体外研究 刘庆元, 窦科峰, 张金山, 孙岚, 黄鲁豫, 张远强  
1333 bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控 于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧  
1337 经肝动脉注射 5-FU 白苕微球治疗兔 VX<sub>2</sub> 移植性肝癌 李欣, 冯敢生, 郑传胜, 柳曦, 孔健  
1341 KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响 司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平  
1345 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化 赵海磊, 刘成, 赵爱光  
1349 肝癌患者乙型肝炎病毒 X 基因变异的研究 代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁  
1353 复方中药 99-克星超声介入治疗肝癌裸鼠移植瘤凋亡与增生 林晓东, 林礼务, 何以教, 高上达, 杨发端, 薛恩生  
1357 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建 刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超  
1362  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 在肝癌肝内转移中的作用 苏小康, 赵先明, 李锦清, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬, 石明  
1365 DC 负载凋亡肝癌细胞后的免疫应答 郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德  
1369 TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用 李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平

## 大 肠 癌

- 1372 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究 吴正蓉, 申洪  
1375 IL-4 增强 IL-2 活化的 A-NK 细胞对人直肠癌 CC95 的抗肿瘤作用 王志华, 申宝忠, 史历  
1378 人源性大肠癌抗原基因的 SEREX 筛选 刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰  
1382 直肠癌组织 CD44v6, DNA 含量的联合检测及临床意义 丁志杰, 单吉贤, 都姝妍  
1385 胃泌素拮抗剂增加 CD 自杀基因对结直肠癌细胞的杀伤作用 王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青  
1389 aFGF 和 genistein 对大肠癌细胞株 CCL229 PKC 及 ERK 活性的影响 尚海, 张颐, 单吉贤

## 基础 研究

- 1392 牛磺酸对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究 梁健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海峰, 梁劲松, 黄仁彬, 韦新, 韦明  
1396 胰腺移植 ICAM-1 的表达及信号转导的因素 梁健, 王凤山, 刘永锋, 刘利民, 刘树荣, 崔宏, 邵春泉, 何三光



临床研究	1399 聚乙二醇 4 000 治疗老年人功能性便秘 85 例 张长青, 张国伟, 张葵玲, 付奕其
焦点论坛	1402 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升 1402 胃肠道肿瘤的 X 线诊断 尚克中, 程英升, 吴春根 1404 胃肠道肿瘤 CT 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1406 胃肠道肿瘤 MRI 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1408 胃肠道肿瘤超声诊断 胡兵, 周进祝 1410 胃肠道肿瘤核素诊断 陆汉魁 1413 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗 程英升, 尚克中
治疗指南	1416 肝细胞癌的诊断和治疗 陆嵘, 房静远
文献综述	1420 DNA 高甲基化与抑癌基因 刘仲敏, 刘芝华, 吴旻 1425 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展 沈波, 朱金水 1429 腹膜粘连的分子机制及药物防治 曾健, 李晓辉 1433 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展 姚学清, 林锋 1436 肽转运载体的分子特征 韩飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽 1443 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展 蒋业贵, 李兆申 1447 环氧化酶-2 与结直肠癌 姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟 1451 幽门螺杆菌疫苗的研究进展 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1457 脂肪酸结合蛋白研究进展 冯爱娟, 陈东风 1460 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展 王永刚, 王宇明
读者来信	1352 陈祖林 1368 汤伟
消息	1301 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1332 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1424 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1450 WJG 搭建我国消化基础 and 临床研究惟一国际交流的平台 1464 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
封面故事	巴松湖又名错宗湖, 在藏文里又是绿色湖水的意思, 位于西藏林芝地区工布江达县境内, 该湖湖面海拔 3464 m, 是川藏东部最大的淡水堰塞湖之一。湖水清澈见底, 四周雪山倒映其中, 湖周原始森林密布, 群山环绕, 景美如画。湖中央飘着一座秀丽的湖心小岛, 湖心岛上有一座错宗寺, 建于唐代末年。(马俐 马娜 摄影)。

## 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(月刊)

创刊 1993-01-15

改刊 1998-01-25

出版 2003-09-15

原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀

黄象谦

黎介寿

刘耕陶

裘法祖

汤钊猷

王宝恩

危北海

吴孟超

吴成中

张金哲

张学庸

赵东海

周殿元

社长总编辑 马连生

中文编辑 潘伯荣

王瑾晖

英文编辑 王先林

排版 李少华

校对 李天华

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

030001, 山西省太原市双塔西街 77 号

E-mail: wjcd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社

100023, 北京市 2345 信箱

E-mail: wjcd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

电话 (010)85381892

传真 (010)85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内 北京报刊发行局

国外 中国国际图书贸易总公司

(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部

(100023, 北京市 2345 信箱)

电话: (010)85381892

传真: (010)85381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外

检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》

荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》

俄罗斯《文摘杂志(PJ)》

中国科技论文统计与分析

中国学术期刊文摘

中国中医药信息服务网

中国生物医学文献光盘数据库

《中文科技资料目录(医药卫生)》

中国生物医学期刊目次数据库

中国医学文摘外科学分册(英文版)

中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

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

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

邮发代号

82-262

国外代号

M 4481

国内定价

每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证

1401004000050

www.wjgnet.com

# 内皮抑素 - 血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗

潘 欣, 李 喆, 张 珉, 王 泳, 潘 卫, 戚中田

潘欣, 张珉, 潘卫, 戚中田, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室 上海市 200433  
李喆, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院普通外科 上海市 200433  
王泳, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院眼科 上海市 200433  
潘欣, 女, 1968-10-25 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 1991 年湖南师范大学本科毕业, 1994 年湖南师范大学硕士研究生毕业, 2000 年第二军医大学博士研究生毕业, 副教授, 主要从事肿瘤基因治疗研究.  
国家自然科学基金资助课题, No. 39970819  
项目负责人: 潘欣, 200433, 上海市翔殷路 800 号, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室. panxinp@yaho.com  
电话: 021-25070314 传真: 021-25070312  
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-22

## Therapeutic effect of endostatin-vascular endothelial growth inhibitor recombinant adenoviruses on gastric carcinoma in nude mice

Xin Pan, Zhe Li, Min Zhang, Yong Wang, Wei Pan, Zhong-Tian Qi

Xin Pan, Min Zhang, Wei Pan, Zhong-Tian Qi, Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Zhe Li, Department of Surgery, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Yong Wang, Department of Ophthalmology, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39970819.  
Correspondence to: Dr. Xin Pan, Department of Microbiology, Second Military Medical University, 800 Xiangyin Road, Shanghai 200433, China. panxinp@yaho.com  
Received: 2002-11-29 Accepted: 2002-12-22

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of recombinant adenoviruses carrying the endostatin-VEGI<sub>151</sub> fusion gene Alerapy on gastric carcinoma in nude mice.

**METHODS:** Human gastric carcinoma SGC7901 cells ( $5 \times 10^6$ ) were injected sc into the dorsal midline of nude mice (3 weeks old), and 500  $\mu$ L ( $10^{12}$  TCID<sub>50</sub>/L) of recombinant adenoviruses AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> or AdLacZ was given respectively sc every other day for ten times. Twenty-four hours after the last injection, tumor size, inhibition rate, expression of target gene, proliferating cell nuclear antigen label index (PCNA LI), apoptotic index (AI), and intratumoral microvessel density (MVD) were evaluated respectively after the mice were sacrificed.

**RESULTS:** Compared with the control group AdLacZ ( $2.356 \pm 1.140$  mm<sup>3</sup>), the average tumor size of group AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> was reduced in size ( $328 \pm 156$  mm<sup>3</sup>,  $F = 12.42$ ,  $P = 0.0125$ ) with an inhibition rate of 86.1 %. The adenoviruses carrying the target gene could be expressed in gastric carcinoma. The PCNA LI of the treated mice ( $0.13 \pm 0.09$  %)

was lower than the control ( $1.40 \pm 0.53$  %,  $F = 22.30$ ,  $P = 0.0033$ ). The AI was higher in the treated mice ( $5.09 \pm 0.25$  %) than in the control ( $0.61 \pm 0.67$  %,  $F = 155.13$ ,  $P = 0.0001$ ). The MVD was lower in the treated mice ( $0.06 \pm 0.03$  %) than in the control ( $1.09 \pm 0.76$  %,  $F = 7.38$ ,  $P = 0.0348$ ).

**CONCLUSION:** The recombinant adenovirus carrying fusion gene of hENDO-VEGI<sub>151</sub> can express the fuion protein in gastric carcinoma in nude mice and inhibit the tumor growth.

Pan X, Li Z, Zhang M, Wang Y, Pan W, Qi ZT. Therapeutic effect of endostatin-vascular endothelial growth inhibitor recombinant adenoviruses on gastric carcinoma in nude mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1282-1285

## 摘要

**目的:** 研究重组腺病毒携带hENDO-VEGI<sub>151</sub>融合基因治疗胃癌的可行性.

**方法:** 分别用 500  $\mu$ L 滴度为  $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub>/L 的粗制重组腺病毒AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub>或AdLacZ皮下注射治疗荷胃癌裸鼠, 隔天 1 次, 共注射 10 次. 最后一次注射 24 h 后处死动物, 检测肿瘤体积、抑瘤率、目的基因的表达、增生细胞核抗原指数(PCNA LI)、肿瘤细胞凋亡指数(AI)、肿瘤微血管密度(MVD).

**结果:** 注射AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub>的治疗组肿瘤体积为  $328 \pm 156$  mm<sup>3</sup>, 注射 AdLacZ 的对照组肿瘤体积为  $2.356 \pm 1.140$  mm<sup>3</sup>, 差异显著( $F = 12.42$ ,  $P = 0.0125$ ), 抑瘤率为 86.1 %; 重组腺病毒携带的目的基因均能在荷胃癌裸鼠肿瘤组织中表达; 治疗组 PCNA LI 为  $0.13 \pm 0.09$  %, 对照组为  $1.40 \pm 0.53$  %, 差异显著( $F = 22.30$ ,  $P = 0.0033$ ); 治疗组 AI 为  $5.09 \pm 0.25$  %, 对照组 AI 为  $0.61 \pm 0.67$  %, 差异显著( $F = 155.13$ ,  $P = 0.0001$ ); 治疗组 MVD 为  $0.06 \pm 0.03$  %, 对照组 MVD 为  $1.09 \pm 0.76$  %, 差异明显( $F = 7.38$ ,  $P = 0.0348$ ).

**结论:** 重组腺病毒携带的融合基因能在荷胃癌裸鼠体内表达出有生物学活性的融合蛋白, 并表现出一定的抑瘤效果.

潘欣, 李喆, 张珉, 王泳, 潘卫, 戚中田. 内皮抑素 - 血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1282-1285  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1282.asp>

## 0 引言

以新生血管作为肿瘤治疗的“靶点”目前已成为国内



外研究的热点<sup>[1-6]</sup>. 内皮抑素可以引起内皮细胞 G1 期阻滞, 特异性抑制血管内皮细胞增生, 促进细胞凋亡<sup>[7-9]</sup>; VEGI<sub>151</sub> 能维持 G0/G1 期细胞生长阻滞, 诱导进入细胞周期的细胞发生凋亡, 使血管内皮系统处于静止状态<sup>[10-13]</sup>. 这两种血管生成抑制因子抑制内皮细胞增生的机制可能差异较大, 但将二者的基因进行融合, 表达出的融合蛋白可能可以阻断肿瘤血管生成的不同环节, 提高治疗效果. 我们利用重组腺病毒携带 hENDO-VEGI<sub>151</sub> 融合基因治疗荷胃癌裸鼠, 以期对肿瘤的抗血管生成基因治疗提供新的思路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 重组腺病毒和 AdLacZ 重组腺病毒为本室包装鉴定, 免抗人 Endostatin 多克隆抗体由德国汉若威的 Stanker 教授惠赠; 由人胚肾上皮细胞经 Ad5 基因片段转染后转化而成的 293 细胞、人胃癌 SGC7903 细胞为本室保存; ♀ 3 周龄 Balb/c 裸小鼠购于本校动物实验中心; HRP 酶标羊抗兔 IgG mAb, DAB, X-gal, DMEM 等均购于华美生物工程公司; 鼠抗人 CD34 mAb 试剂盒、PCNA 免疫组化试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司.

1.2 方法 包装鉴定过的重组腺病毒 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 或 AdCA13-LacZ 50  $\mu$ L 加 200  $\mu$ L 完全培养液感染 293 细胞, 约 2d (48 h) 分别收集呈 CPE 表现的细胞及上清, -70~-37  $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 所得滤液为粗制重组腺病毒(混合克隆), -70  $^{\circ}$ C 保存. 两种重组腺病毒的滴度用 TCID<sub>50</sub> 法测定.

1.2.1 重组腺病毒治疗荷胃癌裸鼠<sup>[14-18]</sup> 8 只 3 周龄 Balb/c ♀ 裸小鼠, 背部皮下以  $5 \times 10^6$  接种生长良好的 SGC7903 细胞悬液. 待 10 d 长出 2-3 mm 直径的肿瘤后, 随机分成 2 组, 每组 4 只, 瘤体内注射 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 或 AdLacZ 500  $\mu$ L, 隔天注射 1 次, 共注射 10 次. 最后 1 次注射 24 h 后拉断颈椎, 剥离瘤体, 用游标卡尺测量肿瘤短径(a)、长径(b), 按公式  $V = \pi a^2 b / 6$  计算肿瘤体积, 按下式计算抑瘤率: 抑瘤率 = [(对照组肿瘤的平均体积 - 实验组肿瘤的平均体积) / 对照组肿瘤的平均体积]  $\times$  100 %; 称肿瘤质量. 瘤体用 40 g/L 多聚甲醛固定, 常规病理切片, 行苏木精伊红(HE)染色、免疫组化染色及凋亡染色(TUNEL 法)鉴定; 注射 AdLacZ 的剪下部分瘤体, 直接做冰冻切片进行  $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因的检测. 冰冻切片用 X-gal 染色液染色、伊红衬染, 镜下观察, 计算重组腺病毒 AdLacZ 感染蓝染细胞面积百分率.

1.2.2 融合蛋白及 PCNA 在胃癌组织中的表达<sup>[19]</sup> 石蜡切片常规脱蜡, 水化, 置 3 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 min 后用柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液浸泡组织切片, 微波炉中 95  $^{\circ}$ C, 5 min 修复抗原, 更换柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液后重复 1 次; 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 3 min/次; 加入兔抗人 Endostatin 多抗(1:200) 4  $^{\circ}$ C 过夜; PBS 洗 6 次, 3 min/次; 加入 HRP 酶标羊抗兔 IgG mAb(1:500), 37  $^{\circ}$ C 孵育

40 min, PBS 洗 6 次, 3 min/次; 然后以 DAB 显色 15 min、苏木精衬染、盐酸乙醇分化、脱水、透明、甘油封片后, 光学显微镜检查. PCNA 免疫组化按说明书操作, 阳性表达定位于细胞核, 经免疫组化染色后呈棕黄色. 每组裸鼠观察 4 张切片(以下同), 在 200 倍视野下, 每张切片随机选取 3 个视野, 计算 PCNA 指数(PCNA Label Index, PCNA LI):  $PCNA LI = (\text{阳性细胞面积} / \text{癌细胞总面积}) \times 100 \%$ .

1.2.3 肿瘤组织原位细胞凋亡检测 采用 TdT 介导的 DNA 末端原位标记染色法(TUNEL 法)检测, 按说明书方法操作, 凋亡细胞的细胞核染呈棕黄色. 在 200 倍视野下, 每张切片随机选取 3 个癌区, 计算凋亡细胞在全部癌细胞中所占的比例. 癌细胞凋亡指数(apoptotic index, AI):  $AI = (\text{凋亡细胞面积} / \text{癌细胞总面积}) \times 100 \%$ .

1.2.4 肿瘤内微血管密度(microvessel density, MVD)测定 采用鼠抗人 CD34 mAb 的标记链霉亲和素 - 生物素免疫组化方法染色, 200 倍视野下, 每张切片计数 3 个血管密度最高区的微血管数并求其均数.

统计学处理 应用 KS400 图像分析系统(carl zeiss)进行形态定量观察, 每张切片随机取 3 个中倍视野( $10 \times 20$ ,  $367\ 855.85\ \mu\text{m}^2$ ), 测定每个视野的阳性面积百分比, 以阳性面积百分比  $\times$  平均灰度作为该视野的染色强度, 3 个视野的平均染色强度作为该例的染色强度. 数据用 SAS 软件做方差分析.

## 2 结果

扩增后的两种粗制重组腺病毒用 TCID<sub>50</sub> 法测定病毒滴度均为  $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub>/L. 重组腺病毒 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 经 PCR 鉴定证实融合基因存在.

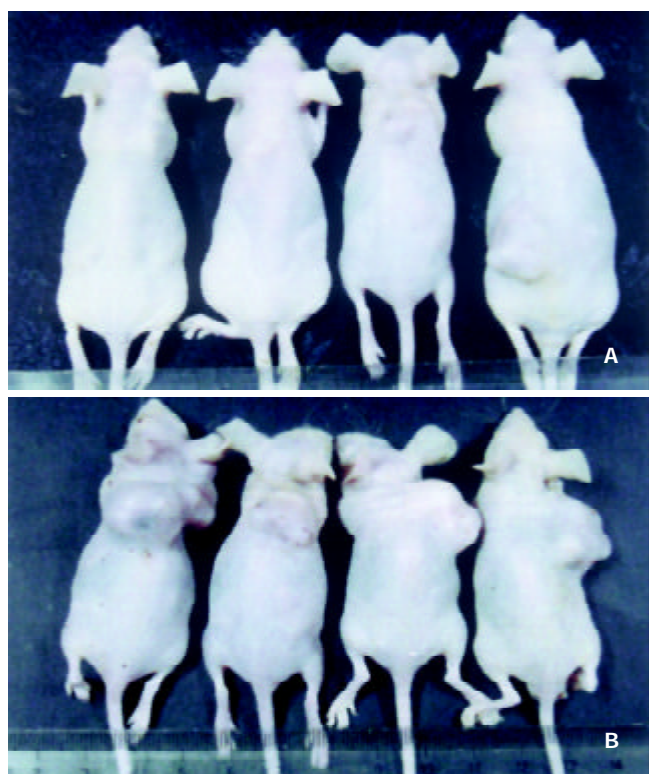
2.1 重组腺病毒治疗荷胃癌裸鼠 荷胃癌裸鼠经粗制重组腺病毒治疗 20 d 后, 瘤体积明显小于对照组(图 1), 裸鼠其他脏器无肉眼可见的病变. 治疗组(注射 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub>)与对照组(注射 AdLacZ)间的肿瘤体积差异显著( $328 \pm 156\ \text{mm}^3$  vs  $2\ 355.6 \pm 1\ 140.2\ \text{mm}^3$ ,  $F = 12.42$ ,  $P = 0.0125$ ), 抑瘤率为 86.1 %, 治疗组和对照组间肿瘤质量差异显著( $0.34 \pm 0.09\ \text{g}$  vs  $2.47 \pm 0.31\ \text{g}$ ,  $F = 177.69$ ,  $P = 0.001$ ), 注射 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 重组腺病毒有较明显的治疗效果. 注射重组腺病毒 AdLacZ 的胃癌组织冰冻切片, X-gal 染色后组织学检查, 可见胃癌细胞蓝染, 经 KS400 图像分析系统计算, 报告基因 LacZ 经腺病毒转移到裸鼠胃癌细胞中的转染效率为  $59.8 \pm 1.8 \%$  (图 2).

2.2 重组腺病毒 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 及 PCNA 在胃癌组织中的表达 裸鼠胃癌组织切片用兔抗人 Endostatin 多抗免疫组化检测, 细胞质染呈棕黄色(图 3). 裸鼠胃癌组织切片用 PC10 mAb 免疫组化检测, 细胞核染呈棕黄色, 对照组 PCNA LI 为  $1.40 \pm 0.53 \%$ , 治疗组为  $0.13 \pm 0.09 \%$ , 对照组和治疗组间 PCNA LI 差异显著 ( $F = 22.30$ ,  $P = 0.0033$ ).



2.3 原位细胞凋亡检测 切片用 TUNEL 法检测, 细胞核染呈棕黄色, 对照组 AI 为  $0.61 \pm 0.67\%$ , 治疗组为  $5.09 \pm 0.25\%$ , 对照组和治疗组间 AI 差异显著( $F=155.13$ ,  $P=0.0001$ ).

2.4 微血管密度测定 切片用鼠抗人 CD34 mAb 免疫组化检测, 血管内皮细胞染呈棕黄色. 对照组 MVD 为  $1.09 \pm 0.76\%$ , 治疗组为  $0.06 \pm 0.03\%$ , 对照组和治疗组间 MVD 差异明显( $F=7.38$ ,  $P=0.0348$ ).



A: AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 治疗; B: AdLacZ 治疗.  
图1 重组腺病毒瘤内注射治疗 20 d 荷胃癌裸鼠外观.

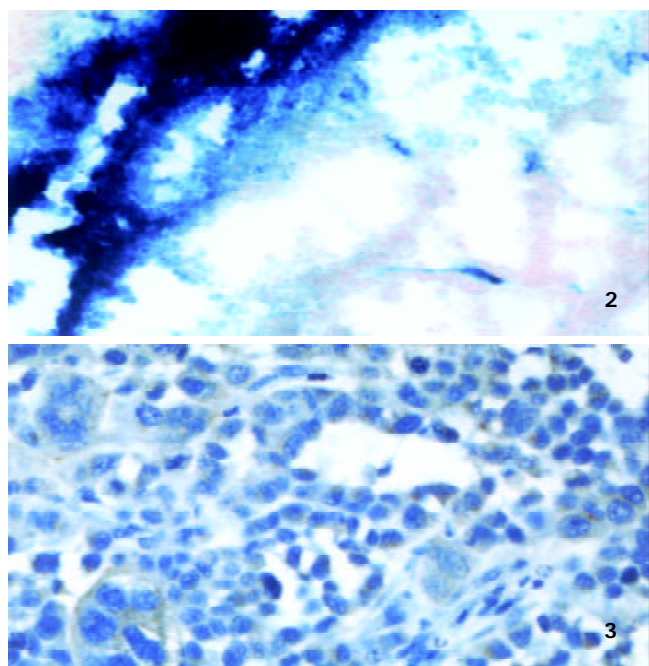


图2 裸鼠胃癌组织 X-gal 染色、冰冻切片伊红衬染.

图3 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 治疗荷胃癌裸鼠的肿瘤组织免疫组化染色图.

### 3 讨论

目前的研究认为, 利用内源性血管生成抑制剂开展基因治疗是较有前途的治疗策略<sup>[20, 21]</sup>. 由于内皮抑素与血管内皮细胞抑制因子均为内源性的蛋白分子, 对肿瘤生长都有较好的抑制作用, 因此我们利用重组腺病毒携带融合的两个强效内源性血管生成抑制基因, 治疗荷胃癌裸鼠, 抑瘤率达到 86.1%. 但肿瘤生长只是被抑制, 延缓, 其大小并没有减小, 与直接注射内皮抑素蛋白使肿瘤消退还存在很大差距. 将 X-gal 染色片与兔抗人 Endostatin 多抗免疫组化检测结果相比较, LacZ 基因的表达效率(阳性面积  $59.8 \pm 1.8\%$ )似乎要高于融合基因的表达效率(阳性面积  $2.03 \pm 0.11\%$ ). 我们认为这两种染色方法本身差异很大.

PCNA 为酸性蛋白, 仅在增生细胞中合成和表达, 是 DNA 多聚酶的一种辅助蛋白, 为 DNA 合成所必需, 在 G<sub>0</sub> 早期不表达, G<sub>1</sub> 期开始表达, S 期达到高峰, G<sub>2</sub>/M 期减少, 是反应细胞增生活性的常用指标<sup>[22-26]</sup>. 本结果表明, 治疗组肿瘤的增生细胞核指数(PCNA LI)显著低于对照组, 说明重组腺病毒表达的融合蛋白对肿瘤的增生能力存在明显的抑制作用, 这种抑制作用是直接引起的还是通过其他途径引起的, 还需进一步阐明. 凋亡是正常细胞或病变细胞主动激发的一种以“自杀”机制, 恶性肿瘤具有无限增生能力的重要原因之一就是丧失自发性凋亡的能力. 凋亡细胞的特征是 DNA 分解, 结果产生 DNA 单链或双链缺口, 我们采用 TUNEL 方法<sup>[27, 28]</sup>, 即在末端脱氧核糖核酸转移酶的作用下, 用地高辛-核苷酸标记两种缺口 3'-OH 末端, 再用酶标记地高辛抗体予以显色. 实验结果表明治疗组肿瘤的凋亡指数(AI)明显高于对照组.

虽然新生血管生成是肿瘤发生和发展过程中的早期事件, 与肿瘤细胞的自发性凋亡是两个既相互独立又相互联系的事件, 但肿瘤细胞的凋亡受肿瘤组织新生血管化程度的影响十分显著. 微血管密度实验能较好地反映新生血管的生成状况<sup>[29, 30]</sup>, 实验结果显示, 治疗组肿瘤的 MVD 明显低于对照组, 说明融合蛋白可能通过抑制内皮细胞增生, 降低微血管密度, 从而降低肿瘤细胞的增生速率, 增加细胞凋亡.

总之, 重组腺病毒携带的融合基因能在裸鼠体内表达出有生物学活性的融合蛋白, 并表现出一定的抑瘤效果. 重组腺病毒表达的融合蛋白, 其治疗效果是否能倍增单基因表达蛋白的治疗效果, 还有待深入研究.

### 4 参考文献

- 1 Tomanek RJ, Schatteman GC. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 2000;261:126-135
- 2 Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4802-4807
- 3 Kleinman HK, Liao G. Gene Therapy for Antiangiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:965-967



- 4 Oehler MK, Bicknell R. The promise of anti-angiogenic cancer therapy. *Br J Cancer* 2000;82:749-752
- 5 Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190:330-337
- 6 Vacca A, Ribatti D, Pellegrino A, Dammacco F. Angiogenesis and anti-angiogenesis in human neoplasms. Recent developments and the therapeutic prospects. *Ann Ital Med Int* 2000;15:7-19
- 7 Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engstrom A, Timpl R, Welsh M, Claesson-Welsh L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 2000;95:3403-3411
- 8 Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, Claesson-Welsh L, Cross MJ. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett* 2003;536:19-24
- 9 Nakashima Y, Yano M, Kobayashi Y, Moriyama S, Sasaki H, Toyama T, Yamashita H, Fukai I, Iwase H, Yamakawa Y, Fujii Y. Endostatin gene therapy on murine lung metastases model utilizing cationic vector-mediated intravenous gene delivery. *Gene Ther* 2003;10:123-130
- 10 Yu J, Tian S, Metheny-Barlow L, Chew LJ, Hayes AJ, Pan H, Yu GL, Li LY. Modulation of endothelial cell growth arrest and apoptosis by vascular endothelial growth inhibitor. *Circ Res* 2001;89:1161-1167
- 11 Zhang M, Wang L, Wang HW, Pan X, Pan W, Qi ZT. Effect of N-terminal deletion on biological activity of vascular endothelial cell growth inhibitor. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2003;35:133-137
- 12 Wang L, Pan W, Zhu FL, Jiao BH, Lou YH, Xiao Y, Qi ZT. Cloning, Expression and biological activity of VEGI(151), a novel vascular endothelial cell growth inhibitor. *Shengwu Hua xue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2000;32:485-489
- 13 Chew LJ, Pan H, Yu J, Tian S, Huang WQ, Zhang JY, Pang S, Li LY. A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor. *FASEB J* 2002;16:742-744
- 14 Zhang GF, Wang YH, Zhang MA, Wang Q, Luo YB, Wang DS, Han CR. Inhibition of growth and metastases of human colon cancer xenograft in nude mice by angiogenesis inhibitor endostatin. *Ai Zheng* 2002;21:50-53
- 15 Zhang X, Liu S, Liang C, Yang H. Adenovirus-mediated Rb gene transfect for head and neck cancer. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2001;32:194-195
- 16 Nicklin SA, Reynolds PN, Brosnan MJ, White SJ, Curiel DT, Dominiczak AF, Baker AH. Analysis of cell-specific promoters for viral gene therapy targeted at the vascular endothelium. *Hypertension* 2001;38:65-70
- 17 Mahasreshti PJ, Navarro JG, Kataram M, Wang MH, Carey D, Siegal GP, Barnes MN, Nettelbeck DM, Alvarez RD, Hemminki A, Curiel DT. Adenovirus-mediated soluble FLT-1 gene therapy for ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:2057-2066
- 18 Wu J, Shi YQ, Wu KC, Zhang DX, Yang JH, Fan DM. Angiostatin up-regulation in gastric cancer cell SGC7901 inhibits tumorigenesis in nude mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:59-64
- 19 Reszec J, Sulkowska M, Famulski W, Guzinska-Ustymowicz K, Sulkowski S. The expression of tumorigenesis markers in oral papilloma. *Pol J Pathol* 2002;53:195-200
- 20 Matsuda KM, Madoiwa S, Hasumi Y, Kanazawa T, Saga Y, Kume A, Mano H, Ozawa K, Matsuda M. A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: generation of angiostatin from endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther* 2000;7:589-596
- 21 Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, von Recum HA, Yuan J, Kamihara J, Flynn E, D'Amato R, Folkman J, Mulligan RC. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4605-4610
- 22 Norata GD, Tonti L, Roma P, Catapano AL. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidised LDL. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002; 12:297-305
- 23 Konouchi H, Asaumi J, Yanagi Y, Shigehara H, Hisatomi M, Matsuzaki H, Kishi K. Evaluation of tumor proliferation using dynamic contrast enhanced-MRI of oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003;39:290-295
- 24 Noguchi N, Kawashiri S, Tanaka A, Kato K, Nakaya H. Effects of fibroblast growth inhibitor on proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003; 39:240-247
- 25 Ishikawa T, Chen J, Wang J, Okada F, Sugiyama T, Kobayashi T, Shindo M, Higashino F, Katoh H, Asaka M, Kondo T, Hosokawa M, Kobayashi M. Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth of human pancreatic cancer cells in SCID mice by suppressing angiogenesis. *Oncogene* 2003;22: 1238-1242
- 26 Zorc M, Vraspir-Porenta O, Zorc-Pleskovic R, Radovanovic N, Petrovic D. Apoptosis of myocytes and proliferation markers as prognostic factors in end-stage dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:36-39
- 27 Oberhaus SM. TUNEL and immunofluorescence double-labeling assay for apoptotic cells with specific antigen(s). *Methods Mol Biol* 2003;218:85-96
- 28 Popescu BO, Oprica M, Sajin M, Stanciu CL, Bajenaru O, Predescu A, Vidulescu C, Popescu LM. Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2002;6:555-569
- 29 Fu QH, Yu H, Wang QQ, Wu QL. Antiangiogenesis effect of linomide in treatment of transplanted human oral carcinoma in nude mice and its relations to regulation on cytokine secretion of macrophage. *Zhejiang Daxue Xuebao Yixuebao* 2002; 31:273-276
- 30 Olewniczak S, Chosia M, Kwas A, Kram A, Domagala W. Angiogenesis and some prognostic parameters of invasive ductal breast carcinoma in women. *Pol J Pathol* 2002;53:183-188





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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

