

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, 冯敦生, 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, 袁海锋, 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

# 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

王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院普通外科 陕西省西安市 710038  
王小军, 男, 1973-02-06 生, 陕西省富平县人, 汉族, 1997 年西安医科大学毕业, 现第四军医大学普外科硕士研究生. 研究方向: 胃肠肿瘤.  
项目负责人: 王小军, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院普外科. wangxiaojun3608@sina.com  
电话: 029-3377731  
收稿日期: 2003-01-15 接受日期: 2003-02-19

## Gastrin receptor antagonist combined with cytosine deaminase suicide gene therapy enhances killing of colorectal carcinoma

Xiao-Jun Wang, Qing-Jiu Ma, Da-Nian Lai, Cheng-Jin Li, Jin-Mao Li, Yong-Zhong Wu, Qing Wang

Xiao-Jun Wang, Qing-Jiu Ma, Da-Nian Lai, Cheng-Jin Li, Jin-Mao Li, Yong-Zhong Wu, Qing Wang, Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Correspondence to: Xiao-Jun Wang, Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. wangxiaojun3608@sina.com  
Received: 2003-01-15 Accepted: 2003-02-19

## Abstract

**AIM:** To investigate the killing effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine on colorectal carcinoma when combined with gastrin receptor antagonist.

**METHODS:** Plasmid G1CEACDNa was transferred into the LoVo cell line using liposomes method. The growth curve of cells was observed when cultured with 5-FC (1 mmol/L) or/and CI-988 ( $1 \times 10^{-8}$  mmol/L) in RPMI-1640+100 ml/L fetal bovine serum. The killing efficiency was measured by MTT method. The submicroscopic structure of cells was observed by electron microscope, apoptosis was verified by a flow cytometer. CD<sup>+</sup> LoVo cells were inoculated s.c. in athymic nude mice followed by 5-fluorocytosine or/and CI-988 treatment for 20 d. these nude mice were killed with their tumor weight determined. Then tumor tissue was stained with hematoxylin and eosin, the submicroscopic structure of cells was observed by electron microscope.

**RESULTS:** After treated with 5-FC or CI-988, the inhibition rate of CD<sup>+</sup> LoVo cells was 90 % and 50 %, respectively. When these two reagents were used in combination, the inhibition rate was 40 % and 97 % on 3 d and 6 d, respectively. By MTT method, combination of CD/5-FC and CI-988 possessed superior killing effect in comparison to single therapy ( $0.53 \pm 0.05$  vs  $0.49 \pm 0.02$ ,  $0.38 \pm 0.06$ ,  $F = 29.5536$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ). Electron microscope and flow cytometer verified that cells were apoptosed after exposed to 5-FC (1 mmol/L) and CI-988 ( $1 \times 10^{-8}$  mmol/L) 72 h. Significant anti-tumor effect was observed in nude mice bearing CD<sup>+</sup> LoVo cells followed

with 5-FC (500 mg/kg body weight i.p. injection per day) or CI-988 (10 mg/kg per day orally), the inhibition rate were 69.4 % and 49.5 %, respectively. When these two reagents were used in combination, the inhibition rate was 81.5 % that was higher compared to single therapy ( $0.42 \pm 0.12$  vs  $0.69 \pm 0.11$ ,  $1.22 \pm 0.22$ ,  $F = 33.1709$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). There were apoptosis bodies in submicroscopic structure.

**CONCLUSION:** Gastrin receptor antagonist can elevate the killing effect of CD/5-FC on colorectal carcinoma. Apoptosis is possibly one of the reasons of the synergistic action.

Wang XJ, Ma QJ, Lai DN, Li CJ, Li JM, Wu YZ, Wang Q. Gastrin receptor antagonist combined with cytosine deaminase suicide gene therapy enhances killing of colorectal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1385-1388

## 摘要

**目的:** 研究联合应用胃泌素拮抗剂和胞嘧啶脱氨酶(CD)的基因治疗对结肠癌细胞的杀伤作用。

**方法:** 脂质体法转染 G1CEACDNa 至 LoVo 细胞. 用含 1 mmol/L 5-FC 或 / 和  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988 的 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养细胞, 测生长曲线; MTT 法测细胞杀伤率; 透射电镜观察细胞的超微结构; 流式细胞仪 annexin V 和 PI 双重染色行凋亡相关检查; Balb/c 裸鼠背部皮下接种 CD<sup>+</sup> LoVo 细胞, 5-FC (500 mg/kg) 腹腔注射或 / 和 CI-988 (10 mg/kg) 灌胃处理 20 d, 处死裸鼠后肿瘤称重, 病理切片 HE 染色, 瘤组织透射电镜检查。

**结果:** 用 5-FC 或 / 和 CI-988 处理 6 d 后 CD<sup>+</sup> LoVo 细胞抑制率分别为 90 % 和 50 %, 二者合用于 3 d 和 6 d 抑制率分别为 40 % 和 97 %; MTT 法检测联合应用 5-FC 和 CI-988 较单用任何一种处理对 CD<sup>+</sup> LoVo 细胞杀伤作用更强, 有统计学差异 ( $0.53 \pm 0.05$  vs  $0.49 \pm 0.02$ ,  $0.38 \pm 0.06$ ,  $F = 29.5536$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ); 电镜和流式细胞仪分别显示 CD/5-FC 和 CI-988 结合处理 72 h 后细胞有凋亡现象; 用 5-FC (500 mg/kg) 腹腔注射和 CI-988 (10 mg/kg) 灌胃处理荷瘤裸鼠均可出现明显的抑瘤作用, 抑瘤率分别为 69.4 % 和 49.5 %, 二者合用抑瘤较单用任一种处理更明显, 有统计学意义 ( $0.42 \pm 0.12$  vs  $0.69 \pm 0.11$ ,  $1.22 \pm 0.22$ ,  $F = 33.1709$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ), 抑瘤率达 81.5 %, 电镜下见瘤组织内有凋亡小体。

**结论:** 联合应用胃泌素拮抗剂 CI-988 可以提高 CD/5-FC 对



结肠癌细胞的杀伤作用. 凋亡相关过程可能是这种协同作用的原因.

王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青. 胃泌素拮抗剂增加CD自杀基因对结肠癌细胞的杀伤作用. 世界华人消化杂志 2003;11(9): 1385-1388

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1385.asp>

## 0 引言

细胞内转染胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)基因, 随后给予5-氟胞嘧啶(5-FC), 是近年来发展起来的肿瘤的自杀基因疗法中研究较为广泛的一种方案. 大量基础和临床实验<sup>[1-5]</sup>已经证明CD/5-FC对结肠直肠癌治疗有效. 但是, 基因治疗普遍存在转染效率低的问题限制了其应用前景. 胃泌素有刺激肠道上皮增生的能力<sup>[6-9]</sup>, 胃泌素及其受体在结肠肿瘤细胞生长调节中起着重要作用, 胃泌素拮抗剂对结肠癌的生长及转移有明显抑制作用. 我们联合应用CD/5-FC和胃泌素拮抗剂对结肠癌细胞生长的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 CEA启动子调控CD基因表达的逆转录病毒载体G1CEACDNa由第二军医大学长海医院崔龙教授惠赠; 大肠癌LoVo细胞株由上海医科大学瑞金消化外科研究所提供; Balb/c裸鼠由第四军医大学实验动物中心提供; 脂质体 lipofectamine™ 2000 (LF 2000)为Invitrogen公司产品; G 418为Gibco公司产品; 5-氟胞嘧啶(5-FC), 胃泌素拮抗剂CI-988, MTT为Sigma公司产品; RPMI1640培养基, 胎牛血清为Promega公司产品.

1.2 方法 大肠癌细胞的转染在6孔培养板中分别接种 $10^6$ 个LoVo细胞, 待细胞生长至80%融合时, 用无血清RPMI1640培养基轻洗细胞并置换原来的培养液, 再加入含4  $\mu$ g质粒DNA250  $\mu$ L和LF2000的无血清RPMI1640培养基10  $\mu$ L培养24 h, 以含400 mg/L<sup>-1</sup> G 418及100 mL/L<sup>-1</sup>胎牛血清的RPMI1640培养基传代培养转染细胞, 选择培养14 d, 筛选抗性克隆并扩增. 将CD<sup>+</sup>LoVo分别接种至4块24孔板中( $10^5$ /L), 依次分为4组. 实验组1用含1 mmol/L 5-FC的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基培养; 实验组2用含 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基培养; 实验组3用含1 mmol/L 5-FC和 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基培养; 对照组用100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基正常培养. 每天胰酶消化法计数每组4孔, 绘制细胞在不同条件下的生长曲线, 计算生长抑制率=(1-实验组细胞计数平均值/对照组同期细胞计数平均值)  $\times 100\%$ . 将CD<sup>+</sup>LoVo接种至24孔板中( $10^5$ /L), 细胞分为4组(分组情况同前), 每组设5个复孔. 于培养72 h行MTT法检测490 nm处吸光度A值, 各组A值进行方差分析. 计算细胞存活率= $A_{\text{实验组均数}}/A_{\text{对照组均数}} \times 100\%$ .

CD<sup>+</sup>LoVo培养至对数生长期, 加入含1 mmol/L 5-FC和 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基, 治疗72 h后, 收集细胞 $1 \times 10^7$ , 2.5%胰蛋白酶消化, 用无血清RPMI1640培养基洗涤2次, 2 000 r/min<sup>-1</sup>离心10 min, 贴壁加入固定液, 送电镜室包埋、切片, 透射电镜下检查. 用60 mL培养瓶2个将CD<sup>+</sup>LoVo细胞培养至对数生长期, 实验组加入含1 mmol/L 5-FC和 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基, 培养72 h后用橡皮刮收集细胞, 离心(300 g, 5 min)去上清后, 重新悬浮于1 mL的annexin V-FITC染色液, 室温下染色5 min. 在细胞悬液中加入PI保存液10  $\mu$ L, 室温下染色5 min后上机检测.

取8-12周龄Balb/c裸鼠20只, 背部皮下接种CD<sup>+</sup>LoVo细胞( $5 \times 10^6$  cell in 0.2 mL PBS), 成瘤后按体重大小编号, 随机化分为4组. 实验组1给予5-FC(500 mg/kg)腹腔注射, 实验组2给予CI-988(10 mg/kg)灌胃, 实验组3给予5-FC(500 mg/kg)腹腔注射并CI-988(10 mg/kg)灌胃, 对照组未给任何处理. 给药均为1次/d, 连续20 d, 处死裸鼠分离出肿瘤组织分别称重, 然后用40 g/L甲醛固定, 二期行组织切片HE染色. 其中实验组3处死裸鼠后立即取微量肿瘤组织戊二醛固定, 二期行透射电镜检测. 计算抑瘤率=(1-实验组瘤重平均值/对照组瘤重平均值)  $\times 100\%$ .

统计学处理 应用SPSS统计软件行方差分析统计学处理.

## 2 结果

2.1 LoVo细胞生长 实验组1于处理后3 d细胞开始出现死亡, 6 d时生长抑制率达90%以上; 实验组2于处理后3 d细胞出现形态变化活性降低, 4 d可见部分细胞开始死亡, 6 d时细胞生长抑制率达50%; 实验组3于处理后2 d即表现为细胞变形、空泡、折光性差, 3 d可见明显死亡现象, 抑制率达40%, 6 d抑制率达97%(图1). 实验组1, 实验组3细胞杀伤作用明显, 细胞杀伤率分别为28.7%和47.1%, A值较对照组行方差分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); 实验组2(7.8%)未见明显杀伤细胞效应; 与对照组A值( $0.53 \pm 0.05$ )无显著性差异( $P > 0.05$ ); 实验组3( $0.28 \pm 0.04$ )较实验组1( $0.38 \pm 0.06$ )、实验组2( $0.49 \pm 0.02$ )杀伤作用更明显, 方差分析A值有显著性差异( $P < 0.01$ ).

2.2 细胞透射电镜检测 电镜下见细胞普遍脂滴较多, 可见细胞膜微绒毛消失, 边缘变平直, 细胞核皱缩, 染色质聚集在核膜下等典型凋亡征象(图2A); 同时可见细胞器溶解、核碎裂等坏死征象(图2B).

2.3 流式细胞仪 FCM图像可见实验组细胞群坏死比例为30.7%, 凋亡细胞占21.1%. 而对照组仅有坏死细胞0.1%, 凋亡细胞1.9%. 结果说明凋亡相关过程在细胞死亡机制中起重要作用.



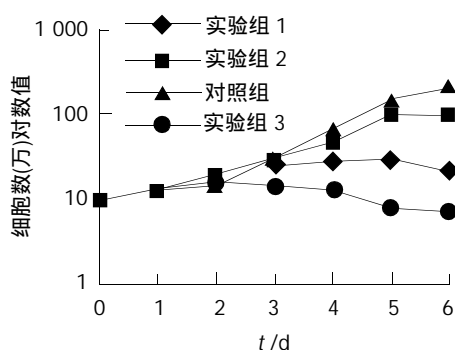


图1 细胞生长曲线。

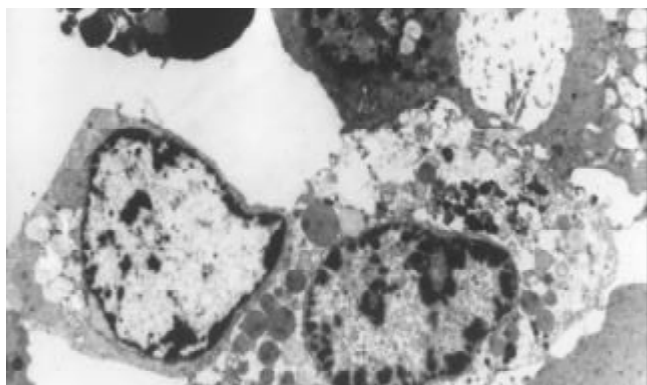


图2 培养细胞透射电镜照片 × 3 000.

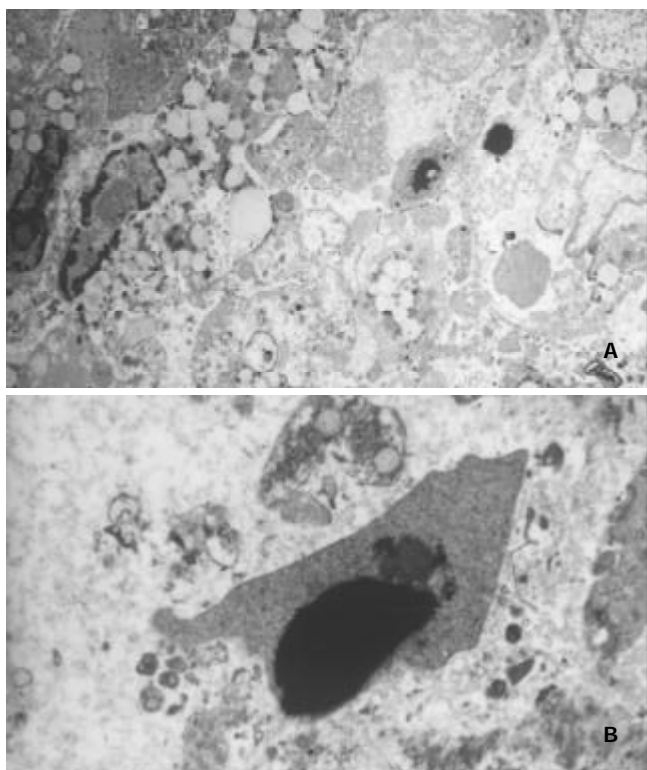


图3 实验组3肿瘤组织电镜照片 × 6 000.

2.4 裸鼠抑瘤实验肿瘤组织 接种后 10 d, 所有裸鼠均成瘤, 依分组情况分别给予处理. 处死裸鼠行瘤组织称重. SPSS 软件行方差分析结果显示 3 个实验组肿瘤较对照组均明显重量减轻( $0.69 \pm 0.11$ ,  $1.22 \pm 0.22$ ,  $0.42 \pm 0.12$  vs  $2.26 \pm 0.23$ ,  $P < 0.01$ ), 说明 3 个实验组均产

生明显的抑瘤效果; 实验组 3 较实验组 1 ( $P < 0.05$ )、实验组 2 ( $P < 0.01$ )减轻更明显; 抑瘤率明显增加(81.5 % vs 69.4 %, 45.9 %); 实验组 2 较实验组 1 有显著差异( $P < 0.01$ ), 说明实验组 2 的抑瘤作用较实验组 1 弱.

2.5 移植瘤组织病理学检查 光学显微镜下 HE 染色: 实验组肿瘤组织均有明显的坏死征象和周围炎症细胞浸润. 肿瘤组织超微结构: 实验组 3 肿瘤组织电镜下可见细胞大片坏死, 结构不清, 可见明显的核碎裂、核溶解及细胞器碎裂(图 3A); 同时可见部分细胞呈染色体边集成块, 核模清楚完整, 细胞边界清楚等凋亡征象及凋亡小体(图 3B).

### 3 讨论

CD/5-FC 系统是近年来研究较多的一种基因导向的酶/前体药物治疗(GDEPT)策略, 其应用于结直肠癌的研究目前已经进入 I 期临床阶段<sup>[10, 11]</sup>. 5-FU 作为结直肠癌的一线化疗药其全身给药毒副作用较大. CD/5-FC 系统应用有效的载体使肿瘤组织特异性表达 CD 基因, 其编码的酶能将对哺乳动物本身相对无毒的 5-FC 转化为细胞毒性的 5-FU, 从而表现出杀细胞效应. 同时 CD/5-FC 系统还具有强大的旁观者效应. 另一方面, 胃泌素前体和甘氨酸胃泌素明显刺激结直肠癌细胞生长. 在过表达胃泌素前体和甘氨酸胃泌素的转基因鼠和结直肠癌细胞系均能观察到这种作用. 胃泌素通过多种机制促进结直肠癌细胞生长<sup>[12-14]</sup>. 多种胃泌素拮抗剂对结肠癌生长有轻度抑制作用已经得到证实<sup>[15]</sup>. CI-988 抑制肠癌 LoVo 细胞生长已在体外培养和动物实验中得到证实. 本结果显示, 体外培养 6 d 时 1 mmol/L 5-FC 和  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988 分别可致转染了 CD 基因的 LoVo 细胞生长抑制率达 90 % 和 50 %, 与文献报导一致, 二者联合使用杀伤作用更明显, 于培养 3 d 和 6 d 时抑瘤率达 40 % 和 97 %. MTT 法检测杀伤率, 联合应用 1 mmol/L 5-FC 和  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988 较单用任何一种杀细胞作用更明显, 有统计学差异( $P < 0.05$ ). 动物模型抑瘤实验结果证明, 单独使用 5-FC(500 mg/kg)腹腔注射或 CI-988 (10 mg/kg)灌胃均可产生明显抑瘤效果, 有统计学差异( $P < 0.01$ ), 抑瘤率分别为 69.4 % 和 45.9 %, 与文献报导一致, 联合应用二者抑瘤效果较单用任何一种措施更明显, 有统计学差异( $P < 0.05$ ). 透射电镜下体外培养及动物模型中均可见兼有凋亡与坏死征象, 这种现象同时也在体外细胞培养的流式细胞仪检测中得到证实. 笔者前期实验已经证实 CD/5-FC 系统引起结肠癌 LoVo 细胞死亡的过程中有凋亡机制参与, 认为, 胃泌素拮抗剂可能通过提高结肠癌细胞对凋亡刺激的敏感性而与 CD/5-FC 产生协同治疗作用. 本结果再次验证了 CD/5-FC 系统和胃泌素拮抗剂 CI-988 对结肠癌在体外细胞培养和动物模型中的杀伤作用, 同时证明联合应用胃泌素拮抗剂 CI-988 可以提高 CD/5-FC 对结肠癌细胞的杀伤作用.



## 4 参考文献

- 1 Shen LZ, Wu WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol* 2002;8:270-275
- 2 Nyati MK, Symon Z, Kievit E, Dornfeld KJ, Rynkiewicz SD, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. The potential of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase enzyme prodrug gene therapy in an intrahepatic colon cancer model. *Gene Ther* 2002; 9:844-849
- 3 Baque P, Pierrefite-Carle V, Gavelli A, Brossette N, Benchimol D, Bourgeon A, Staccini P, Saint-Paul MC, Rossi B. Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats. *Hepatology* 2002;35:1144-1152
- 4 Pierrefite-Carle V, Baque P, Gavelli A, Brossette N, Benchimol D, Bourgeon A, Saint Paul MC, Staccini P, Rossi B. Subcutaneous or intrahepatic injection of suicide gene modified tumour cells induces a systemic antitumour response in a metastatic model of colon carcinoma in rats. *Gut* 2002;50:387-391
- 5 Humphreys MJ, Ghaneh P, Greenhalf W, Campbell F, Clayton TM, Everett P, Huber BE, Richards CA, Ford MJ, Neoptolemos JP. Hepatic intra-arterial delivery of a retroviral vector expressing the cytosine deaminase gene, controlled by the CEA promoter and intraperitoneal treatment with 5-fluorocytosine suppresses growth of colorectal liver metastases. *Gene Ther* 2001;8:1241-1247
- 6 Siddheshwar RK, Gray JC, Kelly SB. Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma. *Gut* 2001;48: 47-52
- 7 Singh P, Velasco M, Given R, Varro A, Wang TC. Progastrin expression predisposes mice to colon carcinomas and adenomas in response to a chemical carcinogen. *Gastroenterology* 2000;119:162-171
- 8 Kermorgant S, Lehy T. Glycine-extended gastrin promotes the invasiveness of human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:136-141
- 9 Aly A, Shulkes A, Baldwin GS. Short term infusion of glycine-extended gastrin (17) stimulates both proliferation and formation of aberrant crypt foci in rat colonic mucosa. *Int J Cancer* 2001;94:307-313
- 10 Cunningham C, Nemunaitis J. A phase I trial of genetically modified Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. *Hum Gene Ther* 2001;12: 1594-1596
- 11 Harvey BG, Maroni J, O' Donoghue KA, Chu KW, Muscat JC, Pippo AL, Wright CE, Hollmann C, Wisnivesky JP, Kessler PD, Rasmussen HS, Rosengart TK, Crystal RG. Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions. *Hum Gene Ther* 2002;13:15-63
- 12 Koh TJ, Bulitta CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A, Wang TC. Gastrin is a target of the beta-catenin /TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest* 2000;106:533-539
- 13 Hollande F, Choquet A, Blanc EM, Lee DJ, Bali JP, Baldwin GS. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinases in glycine-extended gastrin-induced dissociation and migration of gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:40402-40410
- 14 Wu H, Rao GN, Dai B, Singh P. Autocrine gastrins in colon cancer cells Up-regulate cytochrome C oxidase Vb and down-regulate efflux of cytochrome c and activation of caspase-3. *J Biol Chem* 2000;275:32491-32498
- 15 Melen-Mucha G. Effects of short term treatment with pentagastrin, proglumide, tamoxifen given separately or together with 5-fluorouracil on the growth in the murine transplantable Colon 38 cancer. *Neoplasma* 2001;48:133-138





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

