

- 5 Xing T, Zhang L, Lu Q, Hou J, Feng X, Luo K. Th1/Th2 type cytokines in hepatitis B patients treated with interferon-alpha. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:921-924
- 6 文维群, 张广亮, 戴琳. 肝炎患者外周血单个核细胞 IL-18 mRNA 和蛋白水平与 HBV 感染的关系. *上海免疫学杂志* 2002;22:417-420
- 7 Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:422-424
- 8 Manigold T, Bocker U, Chen J, Gundt J, Traber P, Singer MV, Rossol S. Hepatitis B core antigen is a potent inducer of interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and patients with hepatitis B infection. *J Med Virol* 2003;71:31-40
- 9 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003;109:487-495
- 10 Lohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Galle PR. Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells patients with chronic hepatitis B—restoration by exogenous interleukin-12. *Clin Exp Immunol* 2002;130:107-114
- 11 Hodgson PD, Michalak TI. Augmented hepatic interferon gamma expression and T-cell influx characterize acute hepatitis progressing to recovery and residual lifelong virus persistence in experimental adult woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 2001;34:1049-1059
- 12 Matskevich AA, Cordelier P, Strayer DS. Conditional expression of IFN-alpha and IFN-gamma activated by HBV as genetic therapy for hepatitis B. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23:709-721
- 13 Imanishi H, Cheng J, Ikeda N, Saito M, Ohno M, Hara N, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Fujiwara H, Hada T. Evaluation of interleukin-12-induced interferon- γ production in vitro by peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1502-1505
- 14 Watson MW, Jaksic A, Price P, Cheng W, McInerney M, French MA, Fisher S, Lee S, Flexman JP. Interferon-gamma response by peripheral blood mononuclear cells to hepatitis C virus core antigen is reduced in patients with liver fibrosis. *J Infect Dis* 2003;188:1533-1536
- 15 于乐成, 顾长海. 介导肝脏损害的细胞因子白细胞介素 18. *中华肝脏病杂志* 2001;9:379-380

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 •

野生型 P53 基因对肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响

曲波, 潘海乐, 吕志武, 关景明

曲波, 吕志武, 关景明, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

潘海乐, 哈尔滨医科大学附属二院骨科 黑龙江省哈尔滨市 150086

项目负责人: 曲波, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科.

收稿日期: 2004-04-15 接受日期: 2004-05-24

摘要

目的: 观察野生型 p53 基因对昆明鼠肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响, 探讨 p53 基因的抑瘤机制.

方法: δ 5 周龄昆明鼠 30 只, 随机分类肝癌组(I)和 p53 基因治疗组(II). 每只鼠于后肢股部皮下接种 Hep-A-22 肝癌细胞悬液 0.2 mL, 建立动物模型. 接种后 24 h, II 组实验动物于荷瘤局部皮下注射介导野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒液 0.2 mL, 14 d 后处死实验动物. PCR-ELISA 定量检测肝癌组织端粒酶活性, 免疫组化观察肝癌细胞中 Bcl-2 蛋白的表达情况.

结果: 腺病毒介导的野生型 p53 基因能够显著抑制肝癌的生长(肿瘤直径 23.32 ± 1.45 cm vs 5.13 ± 0.37 cm, $P < 0.001$), 明显降低端粒酶的活性表达(A 值 2.46 ± 0.35 vs 0.78 ± 0.06 , $P < 0.01$), 下调 Bcl-2 基因蛋白的生成(表达阳性率 67.8% vs 25.9%, $P < 0.05$).

结论: 野生型 p53 基因从抑制肝癌细胞增生, 促进肿瘤细胞凋亡两个方面发挥抑癌功能.

曲波, 潘海乐, 吕志武, 关景明. 野生型 P53 基因对肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2461-2463

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2461.asp>

0 引言

肿瘤细胞的无限增生与细胞端粒酶激活有关, 是正常细胞转变为恶性细胞的初始信号, 是恶性肿瘤发生发展的重要机制. p53 是研究最为广泛和深入的肿瘤抑制基因之一, 他在多种肿瘤中的高突变率是人们认识到其用于肿瘤基因治疗的潜在价值.

1 材料和方法

1.1 材料 含野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒, 由尹新华博士惠赠. 病毒滴度为 8.2×10^{13} pfu/L. TRAP-PCR-ELISA 端粒酶检测试剂盒和 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 购自宝灵曼公司. Bcl-2mAb 购自博士公司. 鼠 Hep-A-22 肝癌细胞株, 由黑龙江省肿瘤研究所提供. 昆明鼠, δ , 体质量 28-30 g, 购自黑龙江省肿瘤研究所.

1.2 方法 复苏 Hep-A-22 肝癌细胞株, 接种到小鼠腹腔中, 2 wk 后取腹水, 离心, 用 RPMI1640 营养液调细胞密度为 1×10^{10} /mL, 每只鼠于后肢股部皮下接种 0.2 mL 细胞悬液, 7d 后长出实体瘤. 小鼠随机分为 2 组, 肝癌组(I)和 p53 基因治疗组(II), 每组 15 只. 带 p53 基

因的腺病毒液于接种 Hep-A-22 肝癌细胞株后 24 h 注入, 每只鼠 0.2 mL, 14 d 后, 测量肿瘤大小.

统计学分析 所有数据均用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 以 t 检验计算组间差异, $P < 0.05$ 表示显著差异.

2 结果

Hep-A-22 细胞转染带 p53 的重组腺病毒后在小鼠体内成瘤性降低, 到 14 d 时, 接种带野生型 p53 基因小鼠, 与单纯接种肿瘤细胞的鼠作比较, 肿瘤明显变小. 注射 p53 基因后, 治疗组端粒酶活性明显低于肝癌组 ($A: 2.46 \pm 0.35$ vs 0.78 ± 0.06 , $P < 0.01$), 差异有显著性 (图 1). II 组肝癌组织中可见较多的核呈棕褐色的凋亡细胞, I 组则偶见凋亡细胞 (图 2). I 组中凋亡指数 (%) 显著低于 II 组, 两组差异极为明显 (3.2 ± 0.8 vs 15.6 ± 3.6 , $P < 0.01$) 说明在外源野生型 p53 注射后, 促进了肝癌细胞凋亡的发生. Bcl-2 蛋白是膜蛋白, 经免疫组化染色后, 在细胞胞质可见到棕褐色颗粒. 转染带 p53 腺病毒

的肝癌组织, Bcl-2 蛋白表达较单纯肝癌组织明显减少 (图 3).

3 讨论

绝大多数的恶性肿瘤细胞具有端粒酶活性, 而除生殖细胞以外的正常人体组织大多为端粒酶阴性^[1-9], 因此端粒酶可能成为肿瘤治疗的新靶点^[10-12]. 采用端粒酶抑制剂进行肿瘤治疗具有广谱性, 适合所有的恶性肿瘤治疗, 已有一些小分子合成物被证明有端粒酶抑制作用^[13-14], 但其特异性和安全性值得怀疑. 当前关于恶性肿瘤发病机制方面的一个重要观点认为: 肿瘤不仅仅是一种异常“增生”性的疾病^[15], 而且和机体的另外一个重要生理调控机制—凋亡过程和紊乱关系密切^[16]. 细胞凋亡在胚胎发育过程中既不断进行, 是细胞的自主性死亡操作, 具有级连效应, 受多种基因的精细调节, 对维持机体内环境的稳定具有重要意义^[17]. 凋亡减弱是肿瘤发生的重要机制^[18], 有研究表明在肿瘤发生

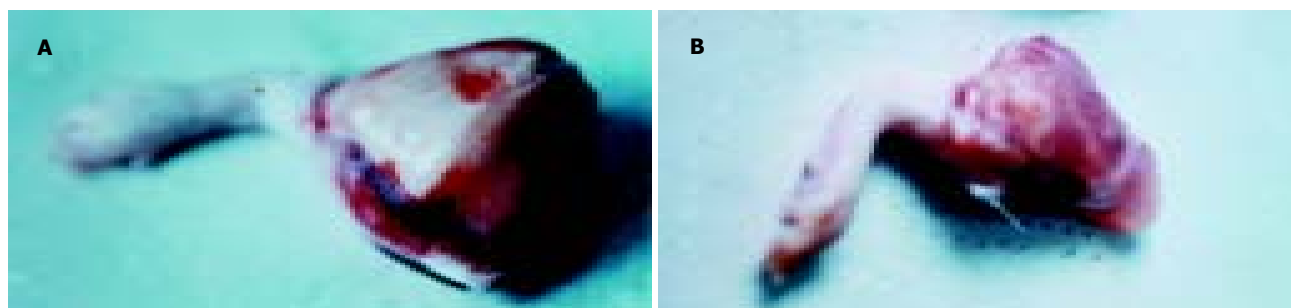


图 1 昆明鼠肿瘤大体照片. A: 肝癌组肿瘤明显形成; B: 治疗组肿瘤体积明显缩小.

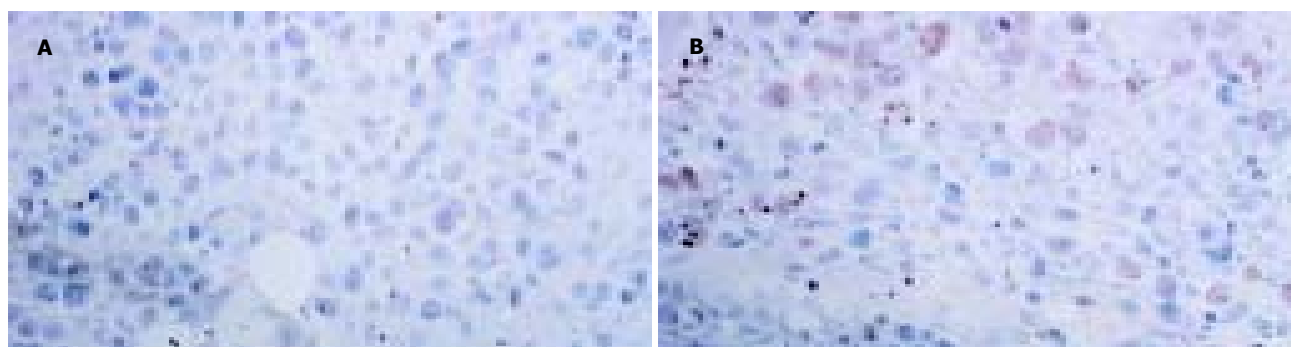


图 2 肿瘤细胞凋亡 $\times 40$. A: 肝癌组偶见凋亡细胞; B: 治疗组凋亡细胞增多.

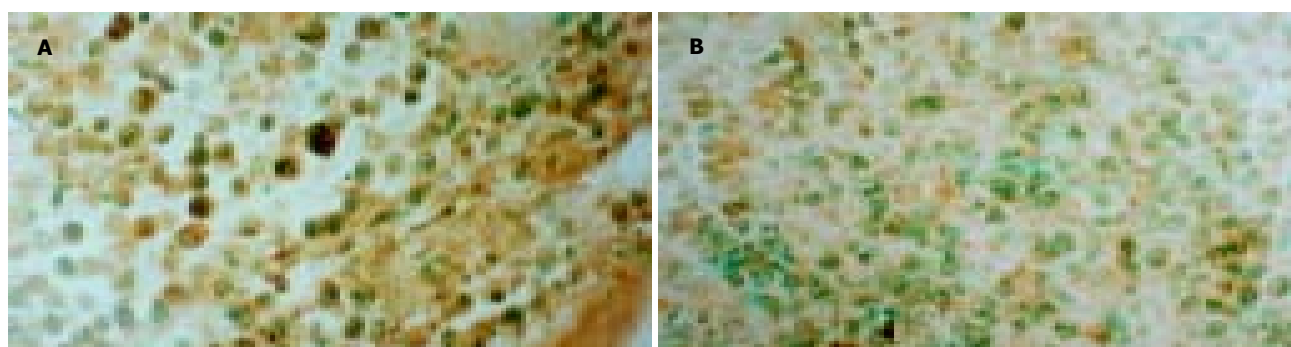


图 3 肿瘤细胞 Bcl-2 免疫组化 $\times 40$. A: 肝癌组 Bcl-2 强阳性表达细胞; B: 治疗组 Bcl-2 表达减弱.

过程中多种凋亡基因发生变异^[19-20]. p53基因迄今为止发现的与肿瘤发生关系最为密切的基因, 有野生和突变两种构型. 野生型p53的抑癌基因, 并且为有DNA损伤的细胞凋亡过程所必需. p53基因与是否对肿瘤组织的端粒酶存在影响, 各家报道并不一致. 我们认为可能与p53基因下调Bcl-2基因的表达有关. 从本实验的结果可以看出, 在p53基因注射之后, 治疗组动物的Bcl-2蛋白表达强度明显减弱, 并且这种减弱的水平与端粒酶活性的降低具有明显的平行关系. 此外, 我们还发现, 治疗组动物, 端粒酶阴性的肝癌组织也多同时有Bcl-2表达产物强度的下降, 这一方面说明表达与端粒酶活性之间的密切关系, 另一方面也显示端粒酶阳性的肿瘤细胞多处于凋亡抑制状态, 即恶性肿瘤的增生与凋亡都发生了异常. 而野生型p53基因则通过阻断肿瘤细胞永生的关键环节, 即降低端粒酶活性和下调凋亡抑制基因Bcl-2的表达, 这两个方面发挥其抑癌作用.

4 参考文献

- 奚伟红, 倪晓谦, 沈玉琴, 黄琴梅. 胃癌端粒酶活性临床研究. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):113
- 朱芮, 肖卫东, 熊永炎, 邹典定, 王莉, 陈新煜. 胃腺癌组织中端粒酶及nm23的表达与预后. 世界华人消化杂志 2000;8:1305-1306
- Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997;57:326-331
- 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. 胃肠道黏膜下肿瘤端粒酶表达的意义. 华人消化杂志 1998;6:765-767
- 王维, 罗和生, 余保平. 端粒酶与大肠癌. 世界华人消化杂志 2000;8:800-802
- 仇生龙, 黄锦秋, 王裕发, 彭志海. 大肠癌前病变与癌及脱落细胞端粒酶分析. 华人消化杂志 1998;6:992-993
- 贾林, 李瑜元. 结肠灌洗脱落细胞端粒酶活性诊断结肠癌的价值. 华人消化杂志 1998;6:955-957
- 赵东兵, 张伟, 金顺钱, 刘毅, 常邵静, 邵永孚. 大肠癌组织中端粒酶活性的研究. 中华肿瘤杂志 1998;20:199-201
- Wang Q, Wu QM, Li SB. Detection of telomerase activity and cytology in diagnosis of cardiac cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):29
- Zhang FX, Zhang XY, Fan DM, Deng ZY, Yan Y, Wu HP, Fan JJ. Antisense telomerase RNA induced human gastric cancer cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:430-432
- 夏志胜, 朱兆华, 何守搞. 全反式维甲酸和5-Fu对裸鼠胃癌移植瘤生长和端粒酶活性的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:674-677
- 朱兆华, 夏志胜, 何守搞. 全反式维甲酸和5-Fu对胃癌细胞端粒酶活性和细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:669-673
- 许兰涛, 马力. 端粒酶反义寡聚脱氧核苷酸对肝癌细胞影响的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1065-1066
- 孟志强, 郭伟剑, 于尔辛, 宋明志, 黄雯霞. 健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2000;8: 879-882
- 李宝杰, 王新红, 曲波. 肝细胞癌变过程中cyclin D₁的异常表达与端粒酶活性的相关分析及意义. 世界华人消化杂志 2003;11: 1682-1689
- 郭光云, 徐少勇, 邓长生. 酒石酸锶钾诱导人胃癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12:520-522
- 廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪. 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:344-346
- Ameisen JC. Programmed cell death(apoptosis)and cell survival regulation: relevance to aids and cancer. *AIDS* 1994;8: 1197-1212
- Sugamura K, Makino M, Shirai H, Kimura O, Maeta M, Itoh H, Kaibara N. Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil. *Cancer* 1997;79:12-17
- 杨文字, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. 世界华人消化杂志 2004;12:194-198

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

• 研究快报 •

应用抑制性消减杂交技术筛选 rhALR 调节基因

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
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, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-03-26 接受日期: 2004-08-28

摘要

目的: 筛选与克隆重组人肝再生增强因子激活基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制.

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. 刺激 HepG2 细胞, 以溶剂 PH7.8 的磷酸盐缓冲液为平行对照, 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 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: 成功构建重组人肝再生增强因子激活基因差异表达的 cDNA 消减文库. 文库扩增后得到 30 个阳性克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200-1000 bp 插入片段. 对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得 19 种编码基因, 包括 15 种已知基因和 4 种未知基因.