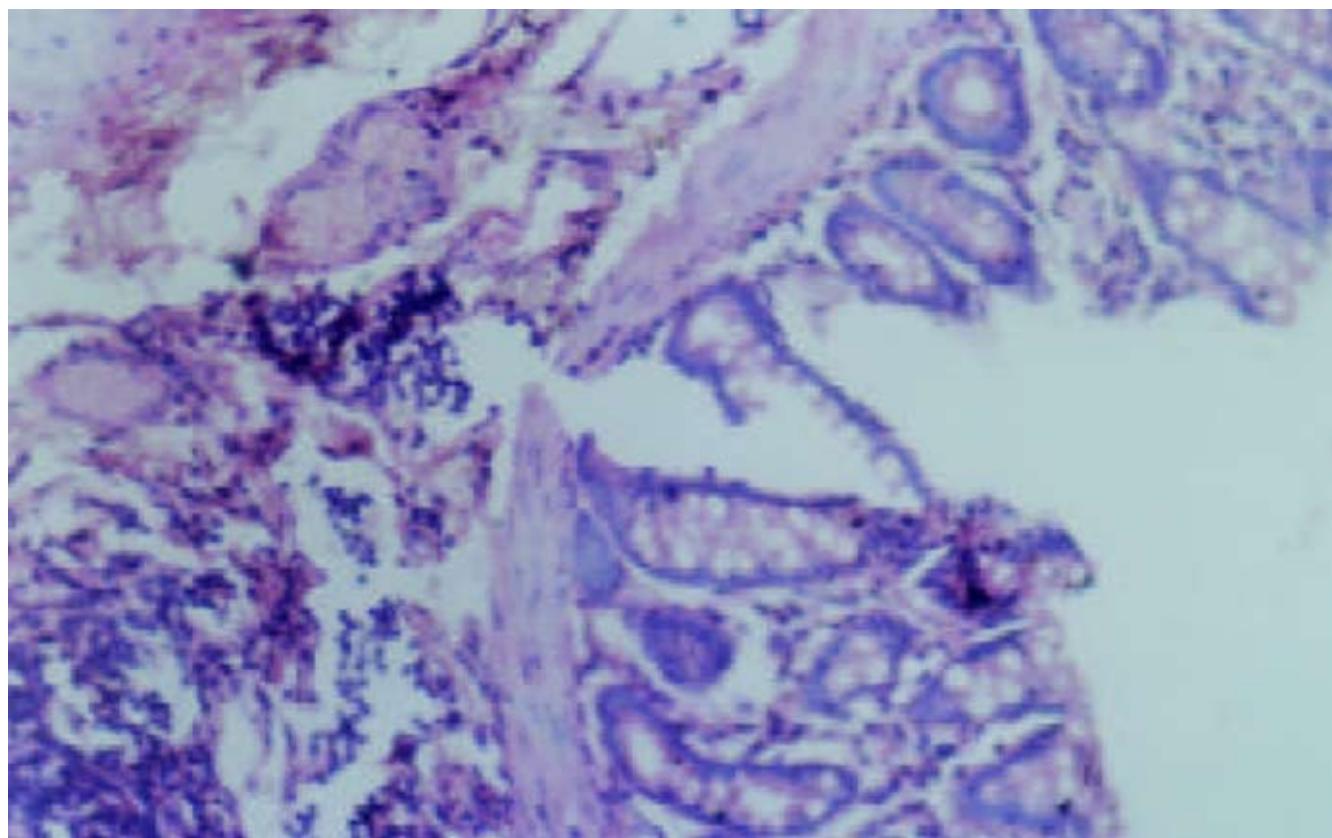


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2004年2月15日 第12卷 第2期 (Volume 12 Number 2)



2/2004

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊，
2003年百种中国杰出学术期刊，
《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊，中国科技论文统计源期刊。
世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》，
荷兰《医学文摘库/医学文摘》，
俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2004年2月15日 第12卷 第2期 (总第119期)

述 评	253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军
胃 癌	258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦 262 胃癌前病变p21 ^{ras} , c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤 266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青
肝 癌	271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南 276 肝癌细胞H ₂₂ 与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究 张娟, 张锦堃, 卓少宏 280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达 周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊 283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林
病毒性肝炎	286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟 298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞 302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花 306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花 311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林 315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩骅 319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究 张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘敏 323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究 李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮 327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳 332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明
基础研究	336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭 339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析 刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴旻 344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪 347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达 杨玲, 朱清静, 笛邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安, 周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花, 胡伏莲, 董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤蓬, 宋于刚, 覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球</p>
临床研究	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生</p>
焦点论坛	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶P结构域研究进展 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花</p> <p>408 转录因子C/EBPb的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆荫英, 成军, 张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏, 成军, 张树林</p>
文献综述	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达, 王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静, 高毅, 钟世镇</p> <p>439 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳, 李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强, 谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇, 何生</p>
研究快报	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双, 李玉军, 田字彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东, 李俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>471 肠管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增, 张建中, 岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟, 张超</p>

临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲
481 内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲
483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖
485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国
487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨风江, 邹勤, 李智力, 李晓春
488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
489 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙
492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水
494 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达 孟华, 刘丽娜, 吕申
497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏
499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳
501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪
503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

国际会议

- 13th United European Gastroenterology Week, UEGW
October 15-20, 2005

American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting
October 28-November 2, 2005

ISGCON 2005
November 11-15, 2005
isgcon2005@yahoo.co.in
isgcon2005.com

Advanced Capsule Endoscopy Users Course
November 18-19, 2005
www.asge.org/education

II Latvian Gastroenterology Congress
November 29, 2005
gec@stradini.lv
www.gastroenterologs.lv

2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases
December 1-3, 2005
c.chase@imedex.com
www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm

10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus
February 22-25, 2006
isde@sapmea.asn.au
www.isde.net

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
(半月刊)
创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2004-02-15
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁
英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

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
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: 010-85381901
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, 北京市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: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊。世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。

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。

2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有

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576.00元

广告经营许可证
1401004000050

胃癌线粒体 DNA 拷贝量的变化

韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦

韩琤波, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市 110001
李凡, 中国医科大学附属一院干诊科 辽宁省沈阳市 110001
韩琤波, 男, 1976-12-23生, 辽宁省普兰店市人, 汉族, 2000年中国医科大学学士, 2002年中国医科大学肿瘤学博士生。主要从事胃癌的基础研究。
国家自然科学基金资助项目, No.30371607
项目负责人: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室。yxin@hotmail.com
电话: 024-23256666 6351 传真: 0086-24-23252377
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-24

Alterations of mtDNA copy number in gastric carcinoma

Cheng-Bo Han, Fan Li, Xue-Fei Yang, Xiao-Yun Mao,
Dong-Ying Wu, Yan Xin

Cheng-Bo Han, Xue-Fei Yang, Xiao-Yun Mao, Dong-Ying Wu, Yan Xin,
Fourth Laboratory of the Cancer Institute, First Affiliated Hospital of
China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Fan Li, Department of Geriatrics, First Affiliated Hospital, China Medical
University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.
30371609

Correspondence to: Yan Xin, The Fourth Laboratory of Tumor Institute,
The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang
110001, Liaoning Province, China. yxin@hotmail.com
Received: 2003-08-07 Accepted: 2003-09-24

Abstract

AIM: To explore the relationship between mitochondrial DNA (mtDNA) and gastric cancer by comparing the difference of mtDNA copy number in gastric cancers and paracancerous tissues.

METHODS: Hypervariable region (HV)₁ and HV₂ of mitochondrial D-loop region from 20 cases of gastric cancer and 20 paracancerous tissues were amplified by PCR; meantime β -actin was served as a quantitative standard marker, followed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and silver staining, in which the difference of mtDNA copy number was compared between gastric cancers and paracancerous tissues.

RESULTS: There existed significantly quantitative difference in HV₁, HV₂ (standardized with β -actin) between gastric cancers and paracancerous tissues ($P < 0.01$). mtDNA copy number was associated with important enzymes in nucleus such as AKP, cAMP-PDE and cGMP-PDE ($P < 0.05$), although not with tumor histological type and invasive depth ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The occurrence of gastric cancer is closely associated with decreased mtDNA copy number, which may be a new tumor marker.

Han CB, Li F, Yang XF, Mao XY, Wu DY, Xin Y. Alterations of mtDNA copy number in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12 (2):258-261

摘要

目的: 通过比较线粒体基因组(mitochondrial DNA, mtDNA)拷贝数在胃癌和癌旁胃黏膜组织间的差异, 阐述mtDNA与胃癌发生的关系。

方法: PCR分别扩增胃癌组织和癌旁胃黏膜组织各20例共40个样本的线粒体D-loop两个高变区HV₁ (hypervariable region)和HV₂; 并以核基因组的 β -actin作为定量标准物. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)银染比较mtDNA拷贝数在癌和正常组织间的差异。

结果: HV₁和HV₂拷贝量(用 β -actin标准化)在胃癌组织和癌旁组织间有显著的差异($P < 0.01$); 其拷贝量与组织类型, 癌组织浸润深度未发现有统计学联系($P > 0.05$); 而与核内一些重要的酶: 碱性磷酸酶(AKP)、环腺苷酸磷酸二脂酶(cAMP-PDE)和环鸟苷酸磷酸二脂酶(cGMP-PDE)表达有一定关系($P < 0.05$)。

结论: 胃癌的发生与胃上皮细胞内mtDNA量的减少有着密切的关系. 有望成为一种新的肿瘤分子标志物。

韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦. 胃癌线粒体 DNA 拷贝量的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(2):258-261

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/258.asp>

0 引言

胃癌是世界上最常见的肿瘤之一^[1-10], 过度的亚硝酸盐饮食和幽门螺旋杆菌感染等是胃癌发病的重要危险因素^[11]. 线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)与肿瘤的发生可能有一定的关系^[12]. mtDNA是一长为 16 569 bp 双链闭环分子, 编码并参与了氧化磷酸化和 ATP 生成所必需的多肽. 线粒体内氧浓度很高, 易产生自由基(free radicals)及过氧化氢等活性氧簇(reactive oxygen species, ROS), 而线粒体本身又不能合成谷胱甘肽(glutathione)将其有效去除, 因此 mtDNA 易受活性氧损伤^[13], 再之由于 mtDNA 缺乏组蛋白的保护以及线粒体内缺乏有效的 DNA 损伤修复系统, 因而 mtDNA 损伤要远高于核基因组^[14].

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌组织和癌旁胃黏膜组织各 20 例共 40 个样本取自于中国医科大学附属第一医院肿瘤科胃癌切除术后冰冻标本. 按照WHO组织学分型: 乳头管状腺癌 3 例, 高分化和中分化腺癌共 8 例, 低分化腺癌 3 例,

未分化癌2例, 黏液腺癌2例, 印戒细胞癌2例; 按照Lauren分型: 弥漫型胃癌11例, 肠型胃癌9例。浸润至深肌层5例, 浆膜下6例, 透浆膜8例, 黏膜下1例。所有胃癌组织标本经过酶组化和免疫组化染色分析。

1.2 方法 胃组织30 mg剪碎匀浆30 s, 用含有0.1 g/L蛋白酶K和5 g/L SDS的10 mmol/L Tris-HCl/0.1 mol/L EDTA(pH7.4)1 mL进行消化; DNA用体积比为25:24:1的酚/氯仿/异丙醇抽提2次, 氯仿/异丙醇(24:1)1次; 再用1/10体积的3 mol/L乙酸钠(pH7.4)和2倍体积乙醇沉淀, 700 mL乙醇洗涤。沉淀DNA重溶于50 μL 10 mmol/L Tris-HCl/0.1 mmol/L EDTA(pH8.0)。紫外分光光度仪定量后平衡DNA。

1.2.1 PCR扩增 以D-loop上HV₁(hypervariable region)和HV₂的2个片断的拷贝数来衡量mtDNA拷贝数。设计的引物在HV区两侧保守区域内(12S rRNA和tRNA^{pro}), 以避免由于引物区变异导致假阴性的结果。引物设计如下, HV₁: F15974 5'-ACTCCACCATTAGCACCAA A-3', R16564 5'-TGATGTCTTATTAAAGGGGAAC GT-3'; HV₂: F4 5'-CACAGGTCTATCACCTATTAA CCA-3', R628 5'-GCCCGTCTAACATTTCACT G625-3'。同时为减少DNA模板量的差异给实验带来的假阴性结果, 扩增核内β-actin基因(引物F:5'-AAG GGACTTCCTGTAACAATGCA-3', R:5'-CTGGAAC GGTGAAGGTGACA-3')作为内对照(定量标准物), 对HV₁、HV₂扩增量即mtDNA拷贝量进行标准化。在50 μL扩增反应体系中包括总DNA约50 ng, 引物各0.5 mmol/L, 每种dNTP各200 μmol/L, 2.5 U Taq酶(TakaRa ExTaqTM)。PCR反应条件: 起始94 °C 5 min; 接着94 °C变性45 s, 60 °C退火45 s, 72 °C延伸1 min, 30循环; 最后72 °C继续延伸3 min。模板和引物等的量要严格保持一致(稀释后加入以减少实验的系统误差)。

1.2.2 PAGE银染 将PCR产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE): 浓缩胶3%, 分离胶8%, 加产物3 μL和上样缓冲液2 μL至胶孔内, 8 mA等流电泳20 min, 然后调至15 mA继续电泳30 min。取下凝胶进行银染: 100 mL乙醇内固定5 min; 11.3/mL硝酸5 min; 水洗1 min × 2; 12 mmol/L硝酸银染色5 min × 2; 水洗1 min × 2; 30 g/L碳酸钠/0.5 mL甲醛显影液显影数分钟; 100 mL乙酸后固定5 min; 30 mL甘油5 min; 封片保存, ChemilImager扫描; Image J软件对HV₁、HV₂和标准物β-actin进行定量分析, 计算HV₁/β-actin、HV₂/β-actin比值。

统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以SPSS11.0统计软件包进行t检验、ANOVA及相关系数r检验。P<0.05有差异, P<0.01有显著性差异。

2 结果

2.1 胃癌组织mtDNA定量 在胃癌组织和癌旁胃黏膜正常组织均能扩增出产量比较一致的核内管家基因β-

actin。癌旁组织都可以扩增出HV₁和HV₂, 而癌组织则呈现明显的弱带甚至无条带(图1, 2), HV₁和HV₂扩增量在癌组织和癌旁组织间存在着显著性差异(P<0.01, 表1), 即mtDNA在胃癌组织和癌旁组织间的拷贝量是不同的, 癌组织mtDNA明显降低。HV₁与HV₂呈强相关($r=0.91$, P<0.01)。说明单独由于HV₁或HV₂引起的假阴性结果可能性非常小。mtDNA的拷贝量与胃癌WHO组织学分型之间没有关系, 也可能是由于样本量太少以及选取的样本类型过于分散有关。但按Lauren分型, 定量结果同样没有统计学联系(P=0.086)。

2.2 mtDNA定量与核内酶表达的关系 胃癌组织标本经酶组化和免疫组化染色分析显示, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)表达11例; 亮氨酸氨基肽酶(Leu-aminopeptidase, LAP)表达6例; 环腺苷酸磷酸二脂酶(cyclic AMP phosphodiesterase, cAMP-PDE)表达9例; 环鸟苷酸磷酸二脂酶(cyclic GMP phosphodiesterase, cGMP-PDE)表达6例。结果显示mtDNA定量与AKP、cAMP-PDE和cGMP-PDE有统计学联系(P<0.05, 表1), 而与LAP无统计学联系(P>0.05)。

表1 以mtDNA D-loop区HV1为代表mtDNA定量分析结果

组别	n	HV ₁ /β-actin	P
组织性质			
正常	22	2.51±0.29	<0.01
癌组织	22	0.99±0.16	
Lauren's			
弥漫型	9	0.98±0.19	>0.05
肠型	11	1.02±0.25	
浸润深度			
深肌层	5	0.98±0.17	>0.05
浆膜下	6	1.09±0.13	
透浆膜	8	0.95±0.11	
AKP			
-	9	0.83±0.10	<0.05
++~+++	11	0.98±0.13	
LAP			
-	14	0.90±0.13	>0.05
++~+++	6	0.91±0.18	
cAMP-PDE			
-	11	0.78±0.10	<0.05
++~+++	9	0.97±0.18	
cGMP-PDE			
-	14	0.80±0.17	<0.05
++~+++	6	1.09±0.20	

AKP: 碱性磷酸酶; LAP: 亮氨酸氨基肽酶; cAMP-PDE: 环腺苷酸磷酸二酯酶; cGMP-PDE: 环鸟苷酸磷酸二酯酶; P<0.05有统计学意义; P<0.01有显著意义。

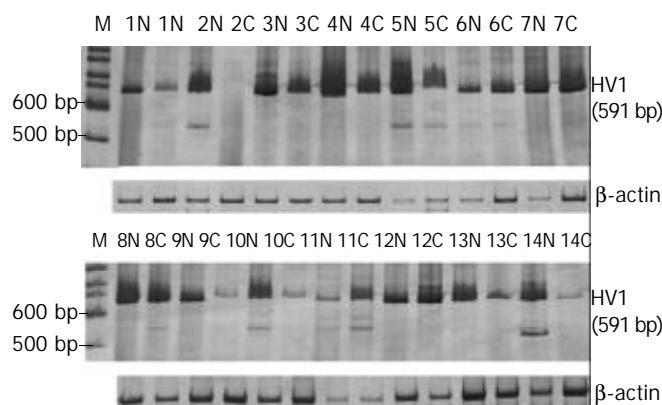


图1 HV₁区 PCR 扩增 PAGE 银染结果 M: 100 bp Ladder Marker; N: 正常组织; C: 癌组织.

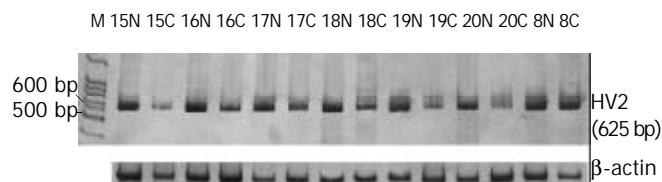


图2 HV₂区 PCR 扩增 PAGE 银染结果.

3 讨论

胃癌的发生与多个癌基因和抑癌基因改变有关^[1-10], 但确切的机制仍不十分清楚。肿瘤的生物学特征不仅取决于核内遗传物质, 而且与核外的 mtDNA 也有一定的关系。线粒体基因组缺乏损伤修复系统, 加之线粒体内氧浓度很高易产生氧自由基, 而其本身又不能合成谷胱甘肽将其有效去除所以特别易遭受内源性损伤因子和外源性致癌物质的攻击^[15-16]。线粒体内脂肪/DNA的比值很高, 使具有嗜脂性的致癌物优先在占细胞总DNA量很少的mtDNA上聚集^[17]; mtDNA缺乏组蛋白的保护, 即是裸露的^[18]。因此mtDNA是致癌物作用的重要靶点, 其损伤程度和突变率显著高于核DNA(大约10倍于核)^[19]。

mtDNA非编码D-loop区和高变区(hypervariable region, HV)是mtDNA与线粒体内膜相结合的区域, 不仅暴露于脂质过氧化物, 而且其本身的三链结构对氧化损伤也高度敏感, 因此该区更易遭受ROS的破坏^[20]。Chomyn et al^[21]认为mtDNA对细胞凋亡启动并不是必需的, 但却会影响其发生的速率, 原因是mtDNA的减少或损伤增多会导致ROS产生量增加。

细胞癌变的本质是增生不再受控制并呈现不同程度的去分化。cAMP和cGMP在调节细胞增生与分化这对矛盾中起着重要作用。cPDE是降解cAMP和cGMP的关键酶, 其活性变化直接影响cAMP和cGMP的代谢进而影响细胞的增生与分化^[22-24]。本研究组在以往的研究中发现cAMP-PDE的表达与胃癌的病理生物学行为有一定的关系。现研究表明, 特异性cPDE抑制剂可以诱导慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞凋亡, 并且与cAMP水平成剂量依赖性^[25-26]。哈利普兰(rolipram)是cPDE4抑制

剂, 弗司扣林(forskolin)是腺苷酸环化酶(adenylate cyclase)激活剂, Moon et al^[27]认为二者诱导CLL细胞凋亡可能是通过激活蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A), 诱导Bcl-2家族成员Bad去磷酸化, 使之转位至线粒体外膜电压依赖性离子通道(voltage dependent anion channel, VDAC)处, 在Bax等的共同作用下使线粒体膜去极化, 通过VDAC释放细胞色素c(cytochrome c, cyt-c), 进而激活caspase-9和caspase-3。由此可见, cPDE等所引起的核内一系列分子学改变影响了核外线粒体膜的通透性, 以至于细胞凋亡发生^[28-31]。这势必会对线粒体内的遗传物质的稳定性产生一定影响。各种凋亡刺激因子直接或间接造成ROS产生增加, ROS不仅会直接损伤mtDNA, 尤其是D-loop复制区, 导致其复制效率下降; 而且促进开启的VDAC通道进一步打开, 释放凋亡促进因子cyt-c, AIF和Smac/Diablo等。此外, 一些类型胃癌从功能分化上不但产生黏液, 而且还不同程度表达小肠吸收细胞标志酶(如AKP和LAP), 有助于水解癌周间质并向周围正常组织浸润性生长, 是胃癌功能分化的重要标志酶。AKP和(或)LAP阳性而无黏液分泌的胃癌功能分类属于“吸收功能分化型”, 主要包括高分化的乳头状腺癌和管状腺癌; 而AKP和LAP阴性有黏液分泌的胃癌功能分类属于“黏液分泌功能分化型”主要包括黏液腺癌和一些未分化型胃癌。本项研究结果显示AKP阳性胃癌, 其mtDNA拷贝数高于AKP阴性胃癌($P < 0.05$), 分析可能是分化程度低的胃癌mtDNA的受损程度更大, 所以拷贝数相对较低。mtDNA定量与AKP、cAMP-PDE和cGMP-PDE有统计学联系, 进一步证实核内遗传物质或信号分子的改变对核外线粒体基因组有一定的影响, 为进一步研究其在疾病发生方面如何作用提供依据。

胃癌组织与正常胃黏膜mtDNA定量存在显著差异, mtDNA定量有望成为一种新的肿瘤分子标志物, 但仍处于探索阶段, 具体的机制还有待于进一步研究。

致谢: 中国医科大学生物芯片中心赵雨杰教授和教研室其他工作人员为本研究提供的帮助

4 参考文献

- Li YL, He XM, Zheng HC, Wu DY, Yang XF, Xin Y, Fu BY. Expression of PTEN encoding product in malignant lesions of gastric mucosa and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1294-1296
- Yu Y, Zhang YC, Zhang WZ, Shen LS, Hertzog P, Wilson TJ, Xu DK. Ets1 as a marker of malignant potential in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2154-2159
- Han CB, Li F, Zhao YJ, Ma JM, Wu DY, Zhang YK, Xin Y. Variations of mitochondrial D-loop region plus downstream gene 12S rRNA-tRNA^{phe} and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1925-1929
- Zhang CP, Tian ZB, Zhao QX, Wu J, Liang YX. Relation between CD44v9, MMP-2 and tumor invasion and metastasis in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1531-1534
- Feng RE, Chen J, Cui QC, Zhan Y, Wang ZY. Expression of PKC β1 and PKC β2 in early gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1286-1289

- 6 Fu YG, Qu YJ, Wu KC, Zhai HH, Liu ZG, Fan DM. Apoptosis-inducing effect of recombinant Caspase-3 expressed by constructed eukaryotic vector on gastric cancer cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2003;9:1935-1939
- 7 Zhao XH, Gu SZ, Liu SX, Pan BR. Expression of estrogen receptor and estrogen receptor messenger RNA in gastric carcinoma tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:665-669
- 8 Huang HL, Wu BY, You WD, Shen MS. Prognostic factors and pathology of advanced gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1297-1301
- 9 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
- 10 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
- 11 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 12 Han CB, Li F, Xin Y. Advances in relationship between mitochondrial DNA and Peptic Tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:624-627
- 13 Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* 2001;106:62-70
- 14 Li JM, Cai Q, Zhou H, Xiao GX. Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1117-1122
- 15 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
- 16 Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002;1:9
- 17 Bianchi NO, Bianchi MS, Richard SM. Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat Res* 2001;488:9-23
- 18 Herrera B, Alvarez AM, Sanchez A, Fernandez M, Roncero C, Benito M, Fabregat I. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J* 2001;15:741-751
- 19 Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res* 2002;509:127-151
- 20 Chung YM, Bae YS, Lee SY. Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2003;34:434-442
- 21 Chomyn A, Attardi G. mtDNA Mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:519-529
- 22 Yang L, Wang YP, Wu DY, Zhang SM, Li JY, Zhang YC, Xin Y. Pathological behaviors and molecular mechanisms of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of stomach: a comparative study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:516-524
- 23 Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem* 2003;278:5493-5496
- 24 Li JM, Zhou H, Cai Q, Xiao GX. Role of mitochondrial dysfunction in hydrogen peroxide-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:562-567
- 25 Ogawa R, Streiff MB, Bugayenko A, Kato GJ. Inhibition of PDE4 phosphodiesterase activity induces growth suppression, apoptosis, glucocorticoid sensitivity, p53, and p21WAF1/CIP1 proteins in human acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2002;99:3390-3397
- 26 Sarfati M, Mateo V, Baudet S, Rubio M, Fernandez C, Davi F, Binet JL, Delic J, Merle-Beral H. Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003;101:265-269
- 27 Moon EY, Lerner A. PDE4 inhibitors activate a mitochondrial apoptotic pathway in chronic lymphocytic leukemia cells that is regulated by protein phosphatase 2A. *Blood* 2003;101:4122-4130
- 28 Frame MJ, Tate R, Adams DR, Morgan KM, Houslay MD, Vandenebeele P, Pyne NJ. Interaction of caspase-3 with the cyclic GMP binding cyclic GMP specific phosphodiesterase (PDE5a1). *Eur J Biochem* 2003;270:962-970
- 29 Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, Pamukcu R. Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* 2000;60:3338-3342
- 30 Huston M, Beard F, McCallum NJ, Pyne P, Vandenebeele GS, Houslay MD. The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 is cleaved downstream of its SH3 interaction domain by caspase-3. Consequences for altered intracellular distribution. *J Biol Chem* 2000;275:28063-28074
- 31 Gale DD, Landells LJ, Spina D, Miller AJ, Smith K, Nichols T, Rotshteyn Y, Tonelli A, Lacouture P, Burch RM, Page CP, O'Connor BJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile following oral administration of the phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitor V11294A in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54:478-484

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。



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

02>

A standard linear barcode is positioned next to the ISSN number. The numbers "9 771009 307056" are printed vertically below the barcode.