

# 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 <sup>ras</sup> , 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 <sub>22</sub> 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Ic-fos表达 杨 玲, 朱清静, 笪邦红, 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 孙凤莲, 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, 田宇彬, 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 肛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, 杨凤江, 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
- 490 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 a 1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](mailto:isgcon2005@yahoo.co.in)  
[www.isgcon2005.com](http://www.isgcon2005.com)
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course  
November 18-19, 2005  
[www.asge.org/education](http://www.asge.org/education)
- II Latvian Gastroenterology Congress  
November 29, 2005  
[gec@stradini.lv](mailto:gec@stradini.lv)  
[www.gastroenterologs.lv](http://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](mailto:c.chase@imedex.com)  
[www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm](http://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](mailto:isde@sapmea.asn.au)  
[www.isde.net](http://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](mailto: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

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# 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

廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪, 广州中山大学中山医学院病理学教研室 广东省广州市 510080  
廖冰, 女, 1975-09-16 生, 广东省湛江市人, 汉族. 1998 年广州中山大学医学学士, 2003 年广州中山大学医学硕士, 在读医学博士生, 助教. 主要从事肝癌及消化系统肿瘤研究.  
国家教委回国人员启动基金资助项目, No. 2000479  
国家自然科学基金资助项目, No. 30170473  
项目负责人: 薛玲, 510080, 广东省广州市中山二路 74 号, 中山大学中山医学院病理教研室. lxue99@pub.guangzhou.gd.cn  
电话: 020-87330525 传真: 020-87331679  
收稿日期: 2003-06-26 接受日期: 2003-09-18

## Effect of oncogenes on differentiation and transformation of rat oval cells

Bing Liao, Ling Xue, Ping He, Guo-Qiang Zhao, Li-Hong Che

Bing Liao, Ling Xue, Ping He, Guo-Qiang Zhao, Li-Hong Che, Department of Pathology, Zhongshan Medical College, Zhongshan University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China  
Supported by the Foundation of National Education Committee, No. 2000479 and National Natural Science Foundation of China, No.30170473  
Correspondence to: Dr. Ling Xue, Department of Pathology, Zhongshan Medical College, 74 Zhongshan 2th Road, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. lxue99@pub.guangzhou.gd.cn  
Received: 2003-06-26 Accepted: 2003-09-18

## Abstract

**AIM:** To study the effects of oncogenes on differentiation and transformation of oval cells by detecting and characterizing the expression of AFP and *Ha-ras*, *c-myc* genes of rat oval cells *in vitro*.

**METHODS:** Proliferation of rat oval cells was induced by chemical carcinogen, 3'-Me-DAB. By using Percoll density gradient centrifugation method, oval cells were isolated, followed by continuous cultivation *in vitro*. The expression of *Ha-ras* and *c-myc* genes and AFP in the oval cells from cultures was dynamically observed by RNA-DNA slot blot hybridization and flow cytometry.

**RESULTS:** The expression of AFP and *Ha-ras*, *c-myc* genes in the cultured oval cells from different phases was synchronous: At the beginning of oval cell cultivation *in vitro*, both of AFP and oncogenes displayed a higher level expression and then declined. Up to 20<sup>th</sup> passage, the expression of AFP and oncogenes went up again and then kept a lower level. To 65<sup>th</sup> passage, the oval cells not only presented a growth rate increased, population doubling time shortened, adiploid chromosomes and growing on soft agar, but also the expression of oncogenes and AFP went up again.

**CONCLUSION:** Oncogenes and their products participate not only in the regulation of cellular transformation, but also in the process of cell differentiation.

Liao B, Xue L, He P, Zhao GQ, Che LH. Effect of oncogenes on differentiation and transformation of rat oval cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):344-346

## 摘要

**目的:** 通过对体外培养的大鼠卵圆细胞进行 AFP 和 *c-ras*、*c-myc* 基因的动态测定, 观察二者在卵圆细胞转化过程中的变化特点, 探讨癌基因对细胞分化和转化的影响。

**方法:** 用化学致癌剂 3'-Me-DAB 诱发出 SD 大鼠肝卵圆细胞增生, 采用 Percoll 密度梯度离心法分离之, 并进行长期体外培养. 在培养过程中, 通过免疫荧光流式细胞仪和 RNA-DNA slot blot 杂交分别测定细胞 AFP 及癌基因的表达情况。

**结果:** AFP 及 *c-ras*、*c-myc* 在卵圆细胞体外培养的不同时期呈现同步升高或降低: 培养初期, 卵圆细胞 AFP 及癌基因均呈高表达, 而后下降; 第 20 代时再次升高, 之后维持在较低的表达水平. 至第 65 代时, 卵圆细胞不仅呈现出生长速度加快、群体倍增时间缩短、多倍体核型及软琼脂生长, 而且癌基因及 AFP 的表达亦第 3 次升高。

**结论:** 癌基因及其产物不仅参与细胞的转化过程, 亦可调节细胞的分化。

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(2):344-346

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/344.asp>

## 0 引言

细胞的体外转化与体内肿瘤的形成一样, 涉及到多种原癌基因的激活、抑癌基因的失活及一系列复杂的调控机制失常<sup>[1-18]</sup>. 实验证实, *myc* 和 *ras* 基因属两类不同的原癌基因, 二者在细胞的转化过程中起协同作用, 共同维持细胞的恶性转化表型. 卵圆细胞是肝内的干细胞, 在原发性肝癌的发生中可能具有重要作用. 通过对卵圆细胞在体外培养过程中癌基因及 AFP 的表达变化的观察, 对于探讨癌基因对细胞转化和分化过程的作用及影响具有重要意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我校动物中心提供二级标准 SD 大鼠, 体重 100-120 g, 稳定饲养 1 wk 后, 改喂含 0.6 g/L 致癌剂 3'-Me-DAB(东京化成工业株式会社)的饲料. 4 wk 后, 取动物肝脏, 用 Percoll 密度梯度离心法分离出卵圆细胞, 并接种于塑料培养瓶, 加入含 20% 小牛血清及各种氨基酸的培养液, 置 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养. 自 15 代开始, 在培养液中加入 20 mg/L EGF 继续培养.

**1.2 方法** 将 10 万细胞接种于直径 6 cm 的塑料培养皿



中, 第2 d计数活细胞数作为基数, 以后连续7 d, 每天数3个平皿, 取其平均数, 计算倍增时间并绘制生长曲线. 从第10代起, 每隔5-10代进行1次测定. 卵圆细胞培养转化过程中染色体制作参照鄂征主编的《组织培养技术》一书中介绍的方法进行. 油镜下至少数50个完整的分散好的中期分裂相细胞, 计数其染色体数目. 制备双层琼脂, 其中上层琼脂含10万个细胞, 凝固后置于37℃ CO<sub>2</sub> 孵箱中培养4 wk后观察结果. 从培养的第35代起, 每10代进行1次Balb/c裸小鼠接种成瘤试验. 接种细胞数为5 × 10<sup>6</sup>, 接种部位为腋窝下, 4 wk后观察有无成瘤.

1.2.1 卵圆细胞<sup>ras</sup>P21、AFP免疫荧光FCM测定 收集不同培养时期的卵圆细胞, 700 mL/L酒精固定, 离心后PBS洗2次, 不锈钢网过滤除去细胞团块. 调整细胞数至5 × 10<sup>9</sup>/L. 取样本100 μL, 分别加入一抗<sup>ras</sup>P21 (Dako公司)和AFP(Dako公司), 室温孵育30 min. 加入荧光标记抗体, 室温30 min. 加PBS 1 mL, 吹打细胞至均匀的单细胞相, 即行测定. 阴性对照管不加一抗. 所用流式细胞仪(epics elite)检测的激发波长488 nm, 发射波长525 nm. 检测细胞数为5 000-10 000个. 上样测定前用人红细胞对仪器进行调整校对. 所有标本一次测完, 使其处于同一测定条件下.

1.2.2 卵圆细胞总RNA的提取及RNA-DNA Slot blot杂交 常规提取不同培养时期卵圆细胞的总RNA, 用狭缝点样器将变性之RNA点于尼龙膜(宝灵曼)后进行杂交. 所用癌基因探针质粒(c-Ha-ras PBR322, 6.6 kb, Bam H I, Ki-ras PBR322 1.0 kb EcoR I, c-myc PBR322 8.5 kb Hind III /EcoR I)由北京中国医学科学院肿瘤研究所提供, DIG标记(标记试剂盒为德国宝灵曼公司产品), 标记方法为随机引物法. 常规洗膜. 将尼龙膜封入杂交袋内, 加入CSPD(宝灵曼), 5 min后倾出CSPD液, 将膜压入X光暗盒曝光于X光胶片, 常规显影、定影. 胶片用Kontron IBASS 2.0图像分析处理仪(German)扫描分析结果.

## 2 结果

卵圆细胞的生长速度随着体外培养时间的增长而加快, 传代时间从最初的10-14 d一代缩短至2-3 d一代, 且细胞由单层生长变为重叠生长. 细胞的群体倍增时间随着培养代数的增高而缩短, 第10代时为40.9 h, 第35代时为18.9 h, 至第65代时减至15.65 h, 呈明显的递减趋势. 卵圆细胞体外培养过程中染色体数目在第10代时, 基本为整倍体; 第35代时染色体数目为29-61, 异倍体细胞率为80%; 第65代时, 则染色体数目范围为23-81, 异倍体细胞率达82%. 卵圆细胞在体外培养至第35代, 将细胞接种于软琼脂中, 4 wk后在倒置显微镜下可见少数克隆生长, 3个平皿分别可见2, 5, 7个克隆, 平均克隆数为4.7个, 且克隆较小, 其直径为0.1 mm. 当卵圆细胞培养至65代时, 软琼脂克隆形成数目大大

增多, 3个平皿分别见7 865, 5 875和6 960个克隆生长, 平均克隆数为6 900个, 且克隆体积较第35代时明显大, 直径大于0.1 mm, 表明细胞生长异常活跃. 从卵圆细胞体外培养至第35代起, 每10代进行一次裸鼠皮下接种细胞成瘤实验, 但至第65代仍未能成瘤.

2.1 <sup>ras</sup>P21、AFP的表达 卵圆细胞体外培养转化过程中, 正常肝细胞<sup>ras</sup>P21及AFP荧光强度值FCM测定与阴性对照无明显差别, 故我们视之为<sup>ras</sup>P21及AFP表达阴性. 卵圆细胞培养的初期, <sup>ras</sup>P21与AFP均有较高水平的表达, 而后下降; 当第15代加入EGF后, 第20代细胞再次出现<sup>ras</sup>P21和AFP的表达升高; 以后虽然各代细胞均有<sup>ras</sup>P21、AFP的表达, 但水平较低, 至第65代时又再次升高(表1).

表1 卵圆细胞<sup>ras</sup>P21、AFP免疫荧光值及c-myc、Ha-ras、Ki-ras mRNA的表达

细胞代数	荧光强度(mean±SD)		平均灰度		
	<sup>ras</sup> P21	AFP	c-myc	Ha-ras	Ki-ras
P10	2.87 ± 1.58	1.95 ± 1.01	12.22	9.93	6.64
P15	1.86 ± 1.30	0.63 ± 0.30	8.3	4.82	
P20	2.82 ± 2.16	1.75 ± 1.24	11.65	8.6	
P25	1.98 ± 0.59	0.96 ± 0.43	3.22	5.96	
P35	1.86 ± 1.31	0.86 ± 0.54	9.82	6.24	
P45	1.76 ± 1.85	0.51 ± 0.26	11.45	11.79	5.81
P55	1.77 ± 1.80	0.55 ± 0.38	8.67	5.56	
P65	2.66 ± 1.64	1.36 ± 0.92	13.21	7.5	3.34

2.2 c-myc、Ha-ras、Ki-ras mRNA的表达 卵圆细胞在体外培养转化过程中, c-myc、Ha-ras和Ki-ras三种癌基因的表达不是呈持续性升高或持续性降低, 而是表现为升高、降低交替出现. 在细胞生长的早期阶段, 三种癌基因均保持在一定的高表达水平, 而后下降. 第35代(开始出现软琼脂生长)时c-myc和Ha-ras再次升高, 但Ki-ras未能检测到. 至第45代, c-myc、Ha-ras和Ki-ras均升高, 直至第65代(表1). 总体来说, 三种癌基因的表达基本保持同步升高或降低.

## 3 讨论

癌基因与细胞的生长、发育、分化及癌变密切相关<sup>[1-18]</sup>. 在致癌因素的作用下, 原癌基因被激活并高度表达, 产生大量转化蛋白, 使正常细胞的增生和分化机制发生紊乱, 导致细胞无控制地增生, 从而引起细胞癌变. 已知myc和ras基因属两类不同的原癌基因, 前者的产物为一种转化蛋白, 位于细胞核内, 在细胞增生过程中起重要作用, 可使原代培养细胞获得永生性而具有无限生长能力, 同时参与细胞分化的调节; 后者的产物位于细胞质膜内面, 具有与G蛋白相似的功能, 并有GTase活性, 其作用是使细胞处于激发状态, 并使细胞表型发生变化. c-myc与c-ras基因在细胞的转化过程中起协同作用, 共同维持细胞的恶性转化表型<sup>[19-20]</sup>. 过去认为原癌基因仅同细胞分裂、生长及转化有关, 现已

有证据表明,原癌基因至少在人体和动物的某些组织、个体发育的某个特定阶段参与调节细胞的分化,因为在胚胎组织中可检测到不少原癌基因的明显表达。

本实验中,<sup>ras</sup>P21有三次升高,且均与ras mRNA的表达升高保持同步,提示<sup>ras</sup>P21的增高可能是ras基因放大或过表达所引起。同时我们推测,第一次升高的P21蛋白与后两次升高的P21蛋白可能是不同性质的ras基因产物:设想当致癌剂作用于肝脏后,引起ras基因扩增并过表达,产生较多的野生型P21蛋白参与卵圆细胞的增生与分化调节。已知GF具有某些癌基因产物的作用,可通过调节其他癌基因的表达和影响细胞的信号传导而促进细胞生长,加速细胞转化<sup>[20-23]</sup>。卵圆细胞培养至15代后,由于EGF的介入(可能还有其他因素的参与),不仅引起c-myc和Ha-ras再次过表达,同时亦可能引起了基因的突变(点突变、基因重排等),由此导致其表达产物P21蛋白不仅在量上发生了变化,而且在质上亦发生了改变(即编码产生突变型P21蛋白)。这种改变导致了细胞朝着恶性转化方向发展,不仅使细胞有了恶性表型(包括生长加快、形态变化、核型改变等),同时在c-myc的协同作用下获得了永生性并不断增生,最终发生转化。

AFP是肝细胞癌重要的标志物之一。由于他在人的胚胎时期有高表达(由胚胎肝细胞和卵黄囊产生),而出生后则迅速降低,故而AFP既可作为幼稚肝细胞和肝癌细胞的标志物,亦可作为卵圆细胞具有肝细胞某些表型特点的佐证。从我们的实验结果可见,卵圆细胞在体外培养、转化过程中,AFP与Ha-ras和c-myc mRNA的表达一样,反复出现了三次升高。结合相应时期细胞的形态、生长速度、核型变化及软琼脂生长与否,我们认为,第1次AFP的升高(第10代)主要为未分化幼稚的卵圆细胞所产生,他表明卵圆细胞具有肝细胞的某些表型特征。AFP的再次升高(第15代)可视为在癌基因及其产物的作用下,卵圆细胞逐步增生、转化成为具有某些恶性性质的群体(至少有部分细胞如此)。而AFP的第3次升高(第65代),此时卵圆细胞无论在核型、倍增时间、或是软琼脂生长方面都表现出恶性细胞的特点,而AFP的升高则进一步提示卵圆细胞此时可能转化为具有一定恶性表型、可表达AFP的肝肿瘤细胞。

综观卵圆细胞体外培养转化过程中c-myc、Ha-ras、Ki-ras mRNA、<sup>ras</sup>P21及AFP的表达变化,提示细胞的体外转化有赖于两种或两种以上癌基因的协同作用;癌基因及其产物不仅参与细胞的转化过程,亦可调节细胞的分化。

#### 4 参考文献

- 1 Lin GY, Chen ZL, Lu CM, Li Y, Ping XJ, Huang R. Immunohistochemical study on p53, H-rasp21, c-erbB-2 protein and PCNA expression in HCC tissues of Han and minority ethnic patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:234-238
- 2 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun

- proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001;7:33-36
- 3 Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1059-1062
- 4 Martins C, Kedda MA, Kew MC. Characterization of six tumor suppressor genes and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *World J Gastroenterol* 1999;5:470-476
- 5 Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001;7:131-135
- 6 Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR. Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001;7:136-139
- 7 Jiang Y, Zhou XD, Liu YK, Wu X, Huang XW. Association of hTcf-4 gene expression and mutation with clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:804-807
- 8 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF-II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
- 9 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:356-360
- 10 Zhao LS, Qin S, Zhou TY, Tang H, Liu L, Lei BJ. DNA-based vaccination induces humoral and cellular immune responses against hepatitis B virus surface antigen in mice without activation of C-myc. *World J Gastroenterol* 2000;6:239-243
- 11 Luo D, Liu QF, Gove C, Naomov N, Su JJ, Williams R. Analysis of N-ras gene mutation and p53 gene expression in human hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 1998;4:97-99
- 12 Zuo LF, Lin PZ, Qi FY, Guo JW, Liu JH. Flow cytometric analysis of DNA, telomerase content and multi-gene expression in esophageal epithelial dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2409-2412
- 13 Wang Q, Lin ZY, Feng XL. Alterations in metastatic properties of hepatocellular carcinoma cell following H-ras oncogene transfection. *World J Gastroenterol* 2001;7:335-339
- 14 Yin ZZ, Jin HL, Yin XZ, Li TZ, Quan JS, Jin ZN. Effect of Boschniakia rossica on expression of GST-P, p53 and p21(ras) proteins in early stage of chemical epatocarcinogenesis and its anti-inflammatory activities in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:812-818
- 15 Boivin-Angele S, Lefrancois L, Froment O, Spiethoff A, Bogdanffy MS, Wegener K, Wesch H, Barbin A, Bancel B, Trepo C, Bartsch H, Swenberg J, Marion MJ. Ras gene mutations in vinyl chloride-induced liver tumours are carcinogen-specific but vary with cell type and species. *Int J Cancer* 2000;85:223-227
- 16 De La Coste A, Mignon A, Fabre M, Gilbert E, Porteu A, Van Dyke T, Kahn A, Perret C. Paradoxical inhibition of c-myc-induced carcinogenesis by Bcl-2 in transgenic mice. *Cancer Res* 1999;59:5017-5022
- 17 Fang JY, Lu J, Chen YX, Yang L. Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:1976-1980
- 18 Ouyang GL, Li QF, Peng XX, Liu QR, Hong SG. Effects of tachyplesin on proliferation and differentiation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1053-1058
- 19 薛玲, 廖冰, 赵国强, 胡瑞德, 车丽洪, 董郡. 大鼠肝癌形成过程中癌基因表达变化的意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:904-907
- 20 施秀清, 李功, 李春生, 倪灿荣, 梁汛, 曲阳. 胃癌中癌基因ras, c-myc mRNA表达的临床意义. *华人消化杂志* 1998;6:123-124
- 21 凌昌全, 钱妍, 赵江安, 金岩. 实验性肝癌形成过程中c-myc IGF-II基因与CyclinD1的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:1452-1453
- 22 王朝晖, 张雪梅, 战敏, 唐凤仙, 李利. 大肠癌转化生长因子β及其受体的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:462-463
- 23 范子荣, 杨冬华, 覃汉荣, 黄纯焯, 徐重, 邱庆林. 肝癌和癌旁肝组织中IGF-I, IGF受体mRNA的表达. *世界华人消化杂志* 1999;7:848-850



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

