

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (Volume 13 Number 14)**



**14/2005**

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 ● 2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (总第142期)

述 评	1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来 1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿
胃 癌	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众
肝 癌	1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓 1663 肝癌组织中TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 1R II和NF- $\kappa$ B的表达 缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春 1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达 吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛 1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义 吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛 1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林 1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌
病毒性肝炎	1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因 张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠 1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛 1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕 1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳
基础研究	1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用 路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚 1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进 1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成 1721 $^{103}\text{Pd}$ 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响 何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯
文献综述	1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建 1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐 1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣 1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建 1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴风华 1747 聚乙二醇 $\alpha$ -干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江 1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣
研究快报	1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏 1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓 1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周 1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋 1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定 温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿 1773 阿霉素对胃癌细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛 1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验	1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春 1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳 1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜 1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊 1787 中国人与非洲黑人 <i>H. pylori</i> 相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA 1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华 1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然 1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民 1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊
致 谢	1800 致谢世界华人消化杂志编委
封面故事	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm</a>
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 <a href="mailto:isgcon2005@yahoo.co.in">isgcon2005@yahoo.co.in</a> <a href="http://www.isgcon2005.com">isgcon2005.com</a>  Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 <a href="http://www.asge.org/education">www.asge.org/education</a>  II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 <a href="mailto:gec@stradini.lv">gec@stradini.lv</a> <a href="http://www.gastroenterologs.lv">www.gastroenterologs.lv</a>  2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 <a href="mailto:c.chase@imedex.com">c.chase@imedex.com</a> <a href="http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm">www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm</a>  10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 <a href="mailto:isde@sapmea.asn.au">isde@sapmea.asn.au</a> <a href="http://www.isde.net">www.isde.net</a>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>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 2005-07-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>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</div>	<div>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: <a href="mailto:wjgd@wjgnet.com">wjgd@wjgnet.com</a> <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a> 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</div>	<div>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.</div> <div>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.</div> <div>2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div>
--	---	---

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

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

# <sup>103</sup>Pd 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响

何贵金, 吴 荣, 高沁怡, 许书河, 高 红, 姜维国, 蒋 涛, 戴显伟, 马 凯

何贵金, 戴显伟, 马凯, 中国医科大学第二临床学院普外科  
辽宁省沈阳市 110004

吴荣, 中国医科大学第二临床学院放疗中心 辽宁省沈阳市 110004

高沁怡, 中国医科大学第一临床学院同位素室 辽宁省沈阳市 110001

许书河, 中国原子能研究院同位素研究室 北京市 100050

高红, 蒋涛, 中国医科大学第二临床学院儿外实验室  
辽宁省沈阳市 110004

姜维国, 中国医科大学第二临床学院病理科 辽宁省沈阳市 110004

何贵金, 男, 1962-6-29 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 1988 年中国医科大学  
本科毕业, 2003 年博士研究生毕业, 普外科副教授, 主要从事肝胆疾病内放  
射治疗研究。

通讯作者: 何贵金, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大  
学第二临床学院普外科。

收稿日期: 2005-03-14 接受日期: 2005-04-01

## Effect of <sup>103</sup>Pd radioactive stent on apoptosis of smooth muscle cells in bile duct and expression of caspase-3, Fas and *bcl-2* gene in dogs

Gui-Jin He, Rong Wu, Qin-Yi Gao, Shu-He Xu, Hong Gao,  
Wei-Guo Jiang, Tao Jiang, Xian-Wei Dai, Kai Ma

Gui-Jin He, Xian-Wei Dai, Kai Ma, Department of General Surgery,  
the Second Clinical College of China Medical University, Shenyang  
110004, China

Rong Wu, Center of Radiation Therapy, the Second Clinical College of  
China Medical University, Shenyang 110004, China

Qin-Yi Gao, Department of Nuclear Medicine, the Second Clinical Col-  
lege of China Medical University, Shenyang 110004, China

Shu-He Xu, Department of Isotope Research, China Institute of Atomic  
Energy, Beijing 100050, China

Hong Gao, Tao Jiang, Department of Surgical Experiment, the Second  
Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, China

Wei-Guo Jiang, Department of Pathology, the Second Clinical College  
of China Medical University, Shenyang 110004, China

Correspondence to: Gui-Jin He, Department of General Surgery, the  
Second Clinical College of China Medical University, 36 Sanhao Street,  
Heping District, Shenyang 110004, China.

Received: 2005-03-14 Accepted: 2005-04-01

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of caspase-3, Fas and *bcl-2* gene in  $\gamma$ -radiation-induced smooth muscle cells of bile duct.

**METHODS:** Twelve dogs were randomly divided into <sup>103</sup>Pd radioactive stent group (PRS, *n* = 6) and the control group (NC, *n* = 6). Stenosis models of biliary duct after injury were established. <sup>103</sup>Pd radioactive and normal stent were transplanted into the dogs of PRS and NC groups respectively. The  $\gamma$ -radiation-induced apoptosis of the smooth muscle cells and the expression of Fas, *bcl-2* gene were detected by TUNEL and immunohistochemis-

try respectively. The expression of caspase-3 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** The caspase-3 and Fas gene were highly expressed ( $0.44 \pm 0.09$ , 83.33% respectively) in dogs of PRS group, and significant apoptosis of muscle cells ( $87.90 \pm 7.96$ ) was observed. There was no marked stenosis in extrahepatic duct. However, caspase-3 and Fas were lowly expressed ( $0.16 \pm 0.02$ , 50.00% respectively) in dogs of NC group, and no significant apoptosis of muscle cells ( $5.60 \pm 0.51$ ) was observed. Significant difference existed between dogs of PRS and NC group in caspase-3, Fas and *bcl-2* expression and the apoptosis of muscle cells (*P* < 0.05). Marked stenosis appeared in extrahepatic duct. The expression of *bcl-2* gene was significantly decreased in dogs of PRS group as compared with than of NC group (16.66% vs 83.33%, *P* < 0.05).

**CONCLUSION:** <sup>103</sup>Pd radioactive stent can increase the expression of caspase-3 and Fas gene and promote the apoptosis of smooth muscle cells of bile duct. The level of *bcl-2* expression is associated with the sensitivity of muscle cells to  $\gamma$ -radiation. <sup>103</sup>Pd radioactive stent can facilitate the apoptosis of muscle cells by reducing *bcl-2* expression, so as to prevent the stenosis of extrahepatic duct.

**Key Words:** <sup>103</sup>Pd radioactive stent;  $\gamma$ -radiation; Caspase-3; Fas; *Bcl-2*; Apoptosis

He GJ, Wu R, Gao QY, Xu SH, Gao H, Jiang WG, Jiang T, Dai XW, Ma K. Effect of <sup>103</sup>Pd radioactive stent on apoptosis of smooth muscle cells in bile duct and expression of caspase-3, Fas and *bcl-2* gene in dogs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(14):1721-1724

## 摘要

目的: 探讨  $\gamma$  射线对胱冬肽酶 -3 (caspase-3), Fas 和 *bcl-2* 基因在犬胆管壁增殖平滑肌细胞凋亡中的活性影响及意义。

方法: 犬 12 只随机分 2 组, 每组 6 只; 建立胆管损伤后狭窄模型, 在犬胆管内分别植入 <sup>103</sup>Pd(<sup>103</sup>钷)放射性支架和普通胆管支架, 采用 HE, TUNEL, RT-PCR, 免疫组化检测增殖内膜中胆管平滑肌细胞增殖、凋亡及相关 caspase-3, *bcl-2* 和 Fas 基因表达, 在 JEM-1200EX 电镜下观察凋亡细胞超微结构变化, 并用计

计算机图像检测系统检测2组胆管腔面积。

**结果:**  $^{103}\text{Pd}$  支架组犬胆管组织中 caspase-3 和 Fas 基因表达较普通支架组明显 ( $0.44 \pm 0.09$  vs  $0.16 \pm 0.02$ ,  $83.33\%$  vs  $50.00\%$ ,  $P < 0.05$ ), 出现明显增殖平滑肌细胞凋亡 ( $87.90 \pm 7.96$  vs  $5.60 \pm 0.51$ ,  $P < 0.05$ ), 肝外胆管无明显狭窄;而普通支架 caspase-3 和 Fas 基因低表达, 胆管未出现增殖平滑肌细胞明显凋亡, 而肝外胆管有明显狭窄。 $^{103}\text{Pd}$  支架组犬胆管组织中 *bcl-2* 基因表达较普通支架组弱 ( $16.66\%$  vs  $83.33\%$ ,  $P < 0.05$ ), 且 *bcl-2* 基因低表达组犬胆管出现明显增殖平滑肌细胞凋亡, 而且犬肝外胆管无明显狭窄;*bcl-2* 基因高表达组犬胆管未出现增殖平滑肌细胞明显凋亡, 而肝外胆管有明显狭窄。

**结论:**  $^{103}\text{Pd}$  放射性支架可以激活 caspase-3 和 Fas 基因, 促进犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡; *bcl-2* 基因表达水平与细胞对辐射的敏感性有关,  $^{103}\text{Pd}$  放射性支架通过降低 *bcl-2* 基因表达, 促进犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡, 从而抑制犬肝外胆管狭窄。

**关键词:**  $^{103}\text{Pd}$  支架;  $\gamma$  射线; Caspase-3; Fas; *bcl-2*; 凋亡

何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯.  $^{103}\text{Pd}$  诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1721-1724  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1721.asp>

## 0 引言

Caspase 是近年来发现的哺乳动物细胞凋亡相关蛋白酶, 其中最引人属目的是 Caspase-3, 他是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶<sup>[1]</sup>, 参与  $\gamma$ -射线诱导人白血病细胞株 HL-60 细胞凋亡<sup>[2]</sup>. 绝大多数的细胞凋亡依赖于 caspase 基因的激活. 特异性地阻断 caspase-3 的活性可抑制细胞凋亡的产生<sup>[3]</sup>; Fas 表达升高后出现明显的细胞凋亡<sup>[4]</sup>, 辐射可以导致或诱发 Fas 介导的细胞凋亡. *bcl-2* 为重要的抗凋亡因子, Bcl-2 蛋白通过调节线粒体功能而制约着凋亡的发生. 我们在体内探讨  $\gamma$  射线促进 caspase-3 基因和 Fas 基因表达和抑制 *bcl-2* 基因表达引起犬胆管壁增殖平滑肌细胞凋亡<sup>[5]</sup>预防胆管再狭窄。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康本地杂种犬 12 只, 雌、雄不限, 体重 15-20 kg 由中国医科大学附属第二医院动物实验室提供, 随机分成 2 组, 每组 6 只, 先用 0.1-0.15 ml/kg 846 麻醉药, im 麻醉后, 采用上腹纵行切口逐层进入腹腔, 寻找到幽门, 在其下 2-3 cm 处切开十二指肠壁, 找到胆总管末端开口, 插入球囊导管, 于犬胆总管内, 通过压力泵向球囊内注入生理盐水, 维持压力 5 cm 水柱, 造成犬胆管黏膜撕裂, 损伤胆

总管后抽出囊内液体, 使压力为零. 重复上述损伤 2 次, 然后退出球囊导管, 用 11F 释放器将普通镍钛记忆合金支架从胆总管末端开口处释放到胆总管内.  $^{103}\text{Pd}$  支架植入犬胆管同普通支架组.  $^{103}\text{Pd}$  支架是用上述镍钛记忆合金支架将  $^{103}\text{Pd}$  由加速器将质子打入  $^{103}\text{Rh}$  并释放 1 个中子生成 [ $^{103}\text{Rh}(p, h)^{103}\text{Pd}$ ], 但需经化学方法提纯  $^{103}\text{Pd}$  含量.  $^{103}\text{Pd}$  的能量在 21-23 Kev, 释放低能量  $\gamma$  射线, 半衰期为 17d, 衰变后转为稳定态的  $^{103}\text{Rh}$ .  $^{103}\text{Pd}$  支架由中国原子能研究院同位素研究所提供, 采用化学电镀方法将上述  $^{103}\text{Pd}$  电镀于支架上, 通过电镀液含  $^{103}\text{Pd}$  的浓度及电镀时间控制支架表面  $^{103}\text{Pd}$  的量以达到金属支架释放低能量  $\gamma$  射线所需浓度. 共 10 个  $^{103}\text{Pd}$  支架,  $^{103}\text{Pd}$  的放射性活度为 3.4 mci. 两组动物术后继续喂养, 预防感染治疗 3 d, 术后 30 d 同时处死两组动物, 取出一部分胆管并用 40 g/L 甲醛溶液固定石蜡包埋, 制备成 HE 切片, 通过计算机图像分析软件测定以下指标: 两组动物总胆管腔面积, 胆管内膜厚度, 残余胆管腔面积, 狭窄程度 [(1-残余管腔面积)/总管腔面积之比], 胆管腔周长。

**1.2 方法** 凋亡细胞原位标记实验 (TUNEL) 应用 Insite Cell Death Detection kit POD (罗氏公司), 细胞核中有棕黄色染的为阳性细胞, 高倍镜下计数单位视野 TUNEL 阳性细胞数, 3 次计数求平均值. 取犬胆管新鲜标本 25 g/L 戊二醛固定, 4℃ 保存 30 min, 用 10 g/L 锇酸固定 2 h, 0.1 mol/L PBS 漂洗, 然后用梯度浓度乙醇 (30-50-70-80-90-100%) 脱水, Epon812 包埋剂浸泡包埋, 按电镜常规法制备 70 nm 超薄切片, 醋酸铀、柠檬酸铅染色, 封片, JEM-1200Ex 电镜下观察凋亡细胞超微结构变化。

**1.2.1 mRNA 分离和 caspase 克隆及序列测定** 分别用总 RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent (GIBCO 公司) 和 mRNA 提取试剂盒 Poly Attract (Promega 公司) 按说明分离纯化 mRNA. mRNA 转录成 cDNA, 以其为模板, 用简并引物半巢式-PCR 扩增. 引物序列: 上游: 5' - CAAAATGGATTATCCTGAAATGGG-3'; 下游: 5' - CCAGGAATAGTAACCAGGTGC-3'; 扩增片段: 510 bp. 序列分析按试剂盒 (70770 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit, Amersham 公司) 说明书进行. RT-PCR 产物的半定量分析用  $\Phi$  X 174-HincII 和  $\Phi$  X 174/HaeIII 为分子质量标准, 取 PCR 产物 10  $\mu$ L 在 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察电泳结果, 照相并存入计算机凝胶分析系统, 以 GAPDH 吸光度值标化 caspase-3 的吸光度值, 得到 caspase-3 的相对含量。

**1.2.2 Fas 免疫组化** 试剂盒购自武汉博士德生物公司. DAB 显色, 用兔抗 Fas 基因抗原的抗体, Fas 免疫组

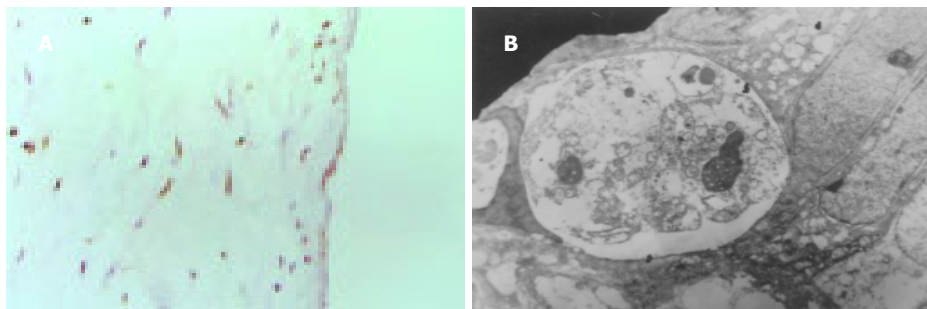


图1 术后30 d  $^{103}\text{Pd}$  支架组犬胆管组织平滑肌细胞凋亡. A: 核呈棕褐色染色( $\times 400$ ); B: 凋亡小体被细胞吞噬.

化染色后细胞质呈棕褐色的为阳性细胞, 细胞质无棕褐色染色的为阴性细胞. 阳性细胞计数分3级: 低倍镜( $10\times$ )  $1\text{ cm}^2$  视野阳性细胞数小于  $1/3$  为(+),  $1/3\sim 2/3$  为(++), 大于  $2/3$  为(+++).

1.2.3 *bcl-2* 免疫组化 试剂盒购自武汉博士德生物公司. DAB 显色, 用兔抗 *bcl-2* 基因抗原的抗体, *bcl-2* 免疫组化染色后细胞质呈棕褐色的为阳性细胞, 细胞质无棕褐色染色的为阴性细胞. 阳性细胞计数分3级: 低倍镜( $10\times$ )  $1\text{ cm}^2$  视野阳性细胞数小于  $1/3$  为(+),  $1/3\sim 2/3$  为(++), 大于  $2/3$  为(+++).

**统计学处理** 所有数据均用平均数 $\pm$ 标准差表示, 定性指标用  $\chi^2$  检验, caspase-3 采用计算机 SAS 软件系统进行 *t* 检验.

## 2 结果

2.1 胆管壁平滑肌细胞凋亡和超微结构  $^{103}\text{Pd}$  支架组平滑肌细胞凋亡数( $87.9 \pm 7.96$ )较普通支架组( $5.6 \pm 0.51$ )明显增多(图1A), 二者有显著差异( $P < 0.05$ ). 普通支架组犬胆管组织平滑肌细胞核大, 核均匀细致, 胞质内有丰富粗面内质网和线粒体.  $^{103}\text{Pd}$  支架组凋亡的平滑肌细胞可见细胞凋亡的特征性形态学变化: 细胞核缩小, 染色质凝集, 细胞表面形成许多球形突起(起泡), 突起内见被包裹的胞质与细胞器、核的碎片或整个浓缩的细胞核, 部分突起与细胞脱离, 形成凋亡小体(apoptotic bodies), 凋亡小体自细胞一端开始出现, 小体内细胞器结构仍完整, 细胞崩解成多个有膜包绕的圆形凋亡小体, 有的细胞凋亡小体被邻近的细胞吞噬(图1B).

2.2 caspase-3 mRNA 的表达 普通支架组( $0.16 \pm 0.02$ )犬胆管组织中caspase-3 mRNA表达的量明显低于 $^{103}\text{Pd}$  支架组( $0.44 \pm 0.09$ ) ( $P < 0.05$ ), 而 $^{103}\text{Pd}$  支架组犬胆管组织中 caspase-3 mRNA 表达的量较高(图2).

2.3 Fas 和 *bcl-2* 的表达 普通支架组犬胆管组织中Fas 基因表达的明显低于  $^{103}\text{Pd}$  支架组, 二者有显著差异( $P < 0.05$ ), 而 $^{103}\text{Pd}$  支架组犬胆管组织中Fas 基因有较高的表达. 普通支架组犬胆管组织中*bcl-2*基因表达的

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

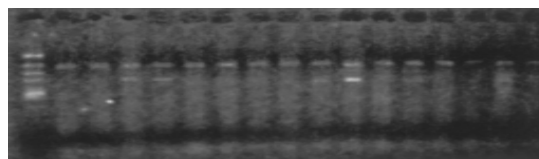


图2 术后30 d  $^{103}\text{Pd}$  支架组和普通支架组犬胆管组织 caspase-3 mRNA 表达, 3, 4, 9, 10, 12, 15 为  $^{103}\text{Pd}$  支架组; 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 16 为普通支架组, Marker 为  $\Phi \times 174\text{-Hinc II}$ .

明显高于  $^{103}\text{Pd}$  支架组, 二者有显著差异( $P < 0.05$ ), 而 $^{103}\text{Pd}$  支架组犬胆管组织中*bcl-2*基因有少量的表达(表1).

表1 Fas 和 *bcl-2* 在犬胆管组织中表达( $n = 6$ )

分组	表达(+++)	表达(++)	表达(+)	表达(-)	阳性细胞表达率%
Fas $^{103}\text{Pd}$ 支架组	2(2/6)	3(3/6)	0(0/6)	1(1/6)	83.33
Fas 普通支架组	0(0/6)	1(1/6)	2(2/6)	3(3/6)	50
<i>bcl-2</i> $^{103}\text{Pd}$ 支架组	0(0/6)	0(0/6)	1(1/6)	5(5/6)	16.66
<i>bcl-2</i> 普通支架组	1(1/6)	3(3/6)	1(1/6)	1(1/6)	83.33

2.4 胆管组织形态分析 球囊扩张30 d后, 同普通支架组比较,  $^{103}\text{Pd}$  支架组胆管最大内膜厚度显著减少( $78.33\%$ ,  $P < 0.01$ ). 普通支架组和 $^{103}\text{Pd}$  支架组胆管最大狭窄面积百分比分别为( $56.54 \pm 22.32\%$ )和( $23.47 \pm 15.65\%$ ), 两组具有极显著性差异( $P < 0.01$ ).  $^{103}\text{Pd}$  支架组胆管腔周长及胆管腔面积均比对照组明显增加( $88.24\%$   $P < 0.01$ ,  $91.52\%$   $P < 0.01$ ) (表2).

表2 胆管内放射对球囊扩张术后30d 胆管形态学和胆管狭窄的影响( $n = 6$ , mean $\pm$ SD)

分组	最大内膜厚度(mm)	胆管狭窄程度(%)	胆管腔周长(mm)	胆管腔面积( $\text{mm}^2$ )
普通支架	$1.86 \pm 0.14$	$54.73 \pm 21.64$	$6.94 \pm 1.37$	$3.48 \pm 1.75$
$^{103}\text{Pd}$ 支架	$0.78 \pm 0.12$	$17.61 \pm 14.52$	$9.66 \pm 1.58$	$5.31 \pm 1.94$

## 3 讨论

caspase 家族成员在细胞凋亡执行阶段发挥重要功能, 其家族成员都是以酶原的形式存在的, 经过水解激活形成异二聚体催化域而产生活性, 可对多种



蛋白底物进行降解,在凋亡信号传递过程中起关键作用,是凋亡的执行人<sup>[6]</sup>. caspase-3 通过降解ADP-核糖多聚合成酶(PARP)导致核内核酸内切酶的激活,从而使核小体间的DNA链水解断裂,产生凋亡特有的DNA片段化,特异性地阻断caspase-3活性可抑制凋亡的发生<sup>[7]</sup>. 本结果表明,<sup>103</sup>Pd支架组犬胆管组织caspase-3表达较普通支架组明显,且其表达水平的变化与犬胆管壁平滑肌细胞凋亡的检测结果相一致,提示在<sup>103</sup>Pd支架组,辐射引起caspase-3基因活性增加,从而引起犬胆管损伤后增殖平滑肌细胞凋亡的发生. caspase家族成员以休眠状态酶原的形式存在于正常细胞中,当接受到死亡信号时被激活,根据已发现的caspase家族蛋白保守氨基酸序列我们应用两条简并引物,提取<sup>103</sup>Pd支架组犬胆管组织凋亡的平滑肌细胞mRNA,反转录PCR,经简并引物半巢式-PCR,排除阴性对照出现的扩增产物,可扩增出参与该凋亡过程的所有caspase cDNA. 我们从<sup>103</sup>Pd支架组犬胆管组织凋亡的平滑肌细胞中扩增出一段caspase-3 cDNA,充分说明caspase-3参与了<sup>103</sup>Pd支架辐射诱导犬胆管壁平滑肌细胞的凋亡. 我们也发现,<sup>103</sup>Pd支架组犬胆管组织平滑肌细胞中caspase-3表达明显,而且<sup>103</sup>Pd支架组平滑肌细胞凋亡数较普通支架组明显增多,说明<sup>103</sup>Pd支架组伴有较明显的平滑肌细胞凋亡的发生;相反普通支架组犬的胆管组织平滑肌细胞中caspase-3表达不明显,平滑肌细胞凋亡数较<sup>103</sup>Pd支架组明显少,说明普通支架组平滑肌细胞凋亡的发生也不明显,提示,辐射通过使caspase-3激活,引起平滑肌细胞凋亡.

Fas系统与细胞凋亡存在明确关系. 射线照射诱发小鼠胸腺细胞及脾脏T、B细胞凋亡过程中,Fas表达明显升高的小鼠细胞凋亡率也明显升高,而且首先是Fas表达升高,而后出现明显的细胞凋亡,表明了辐射导致或诱发Fas介导的细胞凋亡<sup>[8]</sup>. 实验显示,<sup>103</sup>Pd支架组犬胆管壁平滑肌细胞Fas表达比普通支架组明显,且平滑肌细胞出现明显的凋亡,表明辐射后犬胆管平滑肌细胞发生了Fas介导的凋亡. *bcl-2*基因在细胞凋亡调节过程中起重要作用,他是一种凋亡抑制基因,可以抑制多种因素包括辐射诱导的凋亡,故也称为存活,在正常情况下,以*bcl-2*异源二聚体形式存在,当*bcl-2*增加时,*bcl-2*同源二聚体升高,细胞则趋于存活;*bcl-2*为重要的抗凋亡因子,定位于线粒体膜的Bcl-2蛋白质可通过调节线粒体功能而制约着凋亡的发生. 研究指出电离辐射引起DNA分子损伤,激活P<sup>53</sup>蛋白发挥转录子作用,使*bcl-2*表达下降,而使caspase-3激活,从而导致细胞凋亡,

Bcl-2蛋白质也是caspase-3的底物之一,激活的caspase-3通过降解Bcl-2蛋白,进一步地减少Bcl-2蛋白的量. 以往认为*bcl-2*抗凋亡的机制有:抑制膜内Ca<sup>2+</sup>的释放,具有抗氧化的特性,组织胞内细胞色素C的释放,通过抑制白介素-1 $\beta$ 转化酶的自身催化而抑制细胞凋亡. 我们的研究表明,在普通支架组犬的胆管组织平滑肌细胞中*bcl-2*表达比<sup>103</sup>Pd支架组明显,而具有较明显的犬胆管平滑肌细胞凋亡的<sup>103</sup>Pd支架组*bcl-2*表达反而不如犬胆管平滑肌细胞凋亡不明显的普通支架组,提示*bcl-2*的表达与平滑肌细胞凋亡呈负相关.

caspase-3和Fas在<sup>103</sup>Pd支架组表达比普通支架组表达强,而球囊扩张术后30 d发现,<sup>103</sup>Pd支架组胆管腔面积比普通支架组明显增加,胆管狭窄程度比普通支架组小,这主要是由于<sup>103</sup>Pd辐射激活Caspase-3蛋白酶和Fas基因,引起增殖平滑肌细胞凋亡,从而减轻胆管损伤后胆道愈合过程中的管腔狭窄,*bcl-2*在<sup>103</sup>Pd支架组表达比普通支架组表达弱,但其具有较明显的犬胆管平滑肌细胞凋亡,而球囊扩张术后30 d发现,<sup>103</sup>Pd支架组胆管腔面积比普通支架组明显增加,胆管狭窄程度比普通支架组小,这主要是由于<sup>103</sup>Pd辐射抑制*bcl-2*基因表达,诱导增殖平滑肌细胞凋亡,从而减轻胆管损伤后胆道愈合过程中的管腔狭窄,进一步说明了胆管内放射治疗对胆管损伤后胆管狭窄有明显的作用.

#### 4 参考文献

- 1 Lossi L, Tamagno I, Merighi A. Molecular morphology of neuronal apoptosis: analysis of caspase 3 activation during postnatal development of mouse cerebellar cortex. *J Mol Histol* 2004;35:621-629
- 2 李小明, 童新, 宋天保, 孙志贤. Caspase-3 基因在凋亡的 HL-60 细胞及肿瘤细胞中的表达. *中华放射医学与防护杂志* 1999;19:297-306
- 3 Semenov DV, Aronov PA, Kuligina EV, Potapenko MO, Richter VA. Oligonucleosome DNA fragmentation of caspase 3 deficient MCF-7 cells in palmitate-induced apoptosis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004;23:831-836
- 4 Olive PL, Durand RE. Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro? *Int J Radiat Biol* 1997;71:695-707
- 5 Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the *bcl-2* family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401
- 6 Weissman JL. Old Problems, new techniques: The interventional radiologist and the lacrimal apparatus. *Radiology* 1999;212:305-306
- 7 Eschelman DJ, Shapiro MJ, Bonn J, Sullivan KL, Alden ME, Hovsepian DM, Gardiner GA Jr. Malignant biliary duct obstruction: long-term experience with Gianturo stents and combined modality radiation therapy. *Radiology* 1996;200:717-724
- 8 Chmura SJ, Nodzenski E, Beckett MA, Kufe DW, Quintans J, Weichselbaum RR. Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1997;57:1270-1275