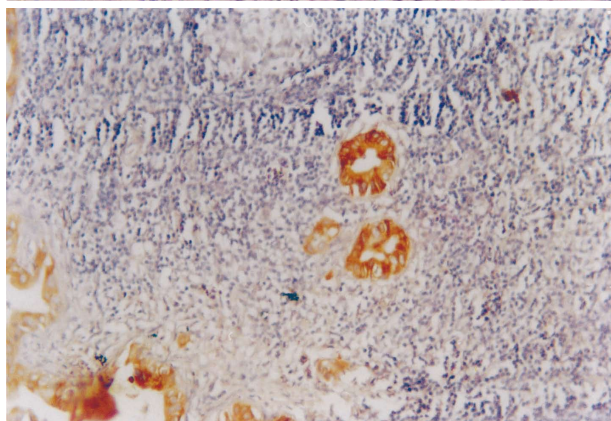
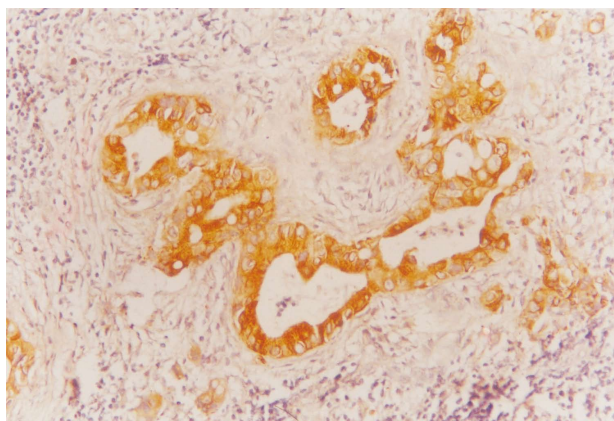
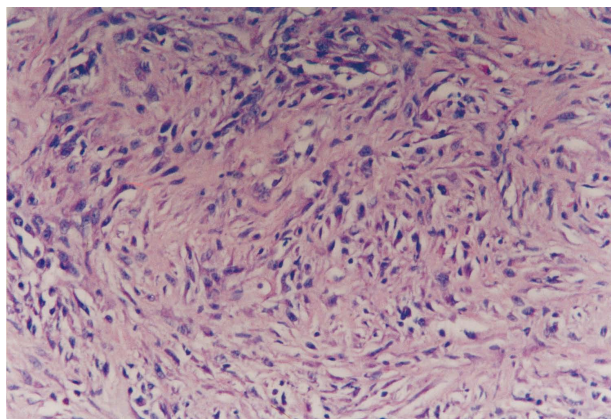
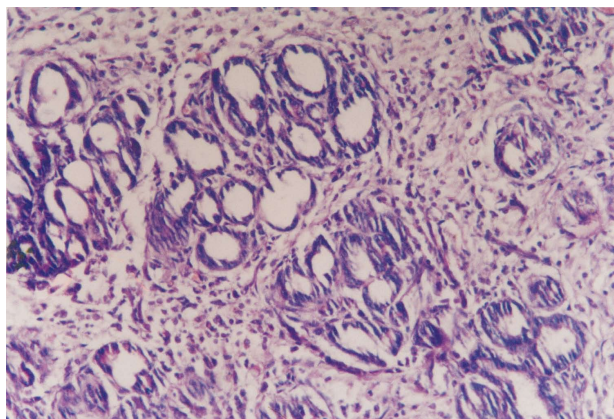


# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2005 年 9 月 28 日 第 13 卷 第 18 期 (Volume 13 Number 18)**



**18/2005**

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 9 月 28 日

第 13 卷

第 18 期

(总第146期)

## 述 评

- 2173 临床试验刍议 谭学瑞, 张学中  
2179 RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展 韩苏夏, 马瑾璐

## 基 础 研 究

- 2183 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达  
王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山  
2188 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA 汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞  
2193 肝癌细胞 BEL7402 中神经元特异性烯醇化酶的表达  
朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽  
2197 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用  
王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林  
2201 慢性丙型肝炎患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞表达增加 杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄  
2205 草苈蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用 朴熙绪, 黄红果, 朴东明  
2210 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达  
谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽  
2213 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响  
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏  
2217 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡  
李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生  
2222 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害  
田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩  
2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达  
杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

## 文 献 综 述

- 2231 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体 庾庆华, 杨倩  
2235 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系 江春平, 丁义涛  
2238 Id 基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展  
杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦  
2243 影响拉米夫定相关乙肝病病毒 YMDD 变异的因素 陆德云, 王甦, 赵连三  
2246 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略 马跃峰, 李相成  
2251 肝细胞癌生物标志物的研究进展 王嘉信, 刘连新  
2257 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生 王旭丹, 袁学勤

## 研 究 快 报

- 2263 sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响 唐文, 蒋明德, 李小安  
2266 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响 王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

## 临 床 经 验

- 2269 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例  
崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴凤郁  
2272 中晚期肝门部胆管癌诊治15例  
张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星  
2275 肝病患者 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义 刘冬妍, 刘沛  
2278 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义 战学雷, 田素礼  
2281 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响 黄坚, 陆士奇, 陈建荣

## 病 例 报 告

- 2284 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化 1 例  
朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉  
2287 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌 1 例  
郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光

致 谢	2288 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2187 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 2200 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2209 首届北京地坛感染病学术会议 2221 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2226 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2234 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2237 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2250 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2256 2006年即将召开的国际会议 2262 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2286 中国生物医学基金论文摘要注册方法
封面故事	2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达 杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp</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 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 2005-09-28  
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)



# World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 18

## EDITORIAL

Meager opinions on clinical experimentation

Tan XR, Zhang XZ 2173

Advancement of RNA intervention in the treatment of hepatic diseases

Han SX, Ma JL 2179

## BASIC RESEARCH

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS 2183

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R 2188

Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L 2193

Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL 2197

Increase of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Yang JH, Zhang YX, Su CH, Sun NX 2201

Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao XX, Huang HG, Piao DM 2205

Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L 2210

Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M 2213

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS 2217

Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y 2222

Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY 2227

## REVIEW

*Lactobacillus* as a new living vaccine carrier in delivery of antigen

Yu QH, Yang Q 2231

Influence of nitric oxide and nitric oxide synthase on tumor radiotherapy sensitivity

Jiang CP, Ding YT 2235

Advance in effect of Id family gene on solid tumor in digestive system

Yang HY, Liu LX, Qu ZB, Liu GY, Chen W, Guo HX, Chen X 2238

Influential factors of Lamivudine associated YMDD variations of hepatic B virus

Lu DY, Wang S, Zhao LS 2243

Preventive methods for small-for-size liver syndrome in adult-to-adult living-donor liver transplantation

Ma YF, Li XC 2246

Advance in research of biological markers of hepato-cellular carcinoma

Wang JB, Liu LX 2251

Occurrence of inflammatory intestinal disease mediated by intestinal mucosal immunoregulation disturbance

Wang XD, Yuan XQ 2257

## BRIEF REPORT

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Tang W, Jiang MD, Li XA 2263

Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rat

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X 2266

## CLINICAL PRACTICE

Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY 2269

Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX 2272

Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Liu DY, Liu P 2275

Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Zhan XL, Tian SL 2278

Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Huang J, Lu SQ, Chen JR 2281

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 28, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

# 肝癌细胞BEL7402中神经元特异性烯醇化酶的表达

朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽

朱爱萍, 山西医科大学第二医院检验科, 山西省太原市 030001  
张青云, 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所免疫研究室  
北京肿瘤医院检验科 北京市 100036  
王雅明, 徐建军, 孙丽, 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所免疫研究室 北京市 100036  
朱爱萍, 女, 1965-01-01生, 山西省太原市人, 汉族, 2004年山西医科大学免疫学硕士生, 副主任医师, 主要从事肿瘤相关酶类的研究。  
北京市肿瘤分子生物学高技术实验室基金资助项目, No. 953850500  
国家重点基础研究发展计划(973), No. 2004CB518708分题  
通讯作者: 张青云, 100036, 北京市, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院检验科, 北京市肿瘤防治研究所免疫研究室。 qingyuzhang@btamail.net.cn  
电话: 010-88115736  
收稿日期: 2005-07-28 接受日期: 2005-08-03

## Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Ai-Ping Zhu, Qing-Yun Zhang, Ya-Ming Wang, Jian-Jun Xu, Li Sun

Ai-Ping Zhu, Department of Medical Laboratory, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Qing-Yun Zhang, Department of Medical Laboratory, Beijing Cancer Hospital, Peking University, Beijing 100036, China  
Qing-Yun Zhang, Department of Immunology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China  
Qing-Yun Zhang, Ya-Ming Wang, Jian-Jun Xu, Li Sun, the School of Oncology, Peking University, Beijing 100036, China  
Correspondence to: Dr. Qing-Yun Zhang, Department of Immunology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China. qingyuzhang@btamail.net.cn  
Received: 2005-07-28 Accepted: 2005-08-03

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of neuron-specific enolase(NSE) in hepatocellular cancer cells BEL7402 at the levels of transcription, protein and cells.

**METHODS:** The fragment of NSE gene was amplified from human hepatocellular cancer cell strain BEL7402 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with NSE specific primers. The NSE expression was detected in the BEL7402 cells by Western blot and immunocytochemical (ICC) staining.

**RESULTS:** NSE product with a length of 1 305 bp was obtained by RT-PCR. Western blot confirmed that Mr 50 000 NSE protein was expressed in BEL7402 cells. Positive reaction of BEL7402 with anti-NSE monoclonal antibody was observed by immunocytochemistry. The expression of NSE existed in BEL7402 cells at the levels of transcription, protein and cells.

**CONCLUSION:** The NSE can be expressed and transcribed in hepatocellular carcinoma cells BEL7402.

**Key Words:** Neuron-specific enolase; Hepatocellular carcinoma; BEL7402 cells

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L. Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2193-2196

## 摘要

**目的:** 分别从转录水平、蛋白水平及细胞水平检测人神经元特异性烯醇化酶(NSE)在肝癌细胞BEL7402中的表达情况。

**方法:** 利用NSE特异引物, 通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从人肝癌细胞BEL7402中扩增人NSE基因的转录产物, 采用免疫印迹(Western blot)、免疫细胞化学(ICC)染色技术检测NSE在肝癌细胞中的表达。

**结果:** 通过RT-PCR方法可以从BEL7402中扩增1 305 bp的NSE产物; Western blot方法证实BEL7402细胞可以表达Mr 50 000的NSE蛋白; 免疫细胞化学染色显示BEL7402与抗NSE单抗呈阳性反应, 这说明从转录水平、蛋白水平及细胞水平均检测到了NSE在肝癌细胞BEL7402中的表达。

**结论:** NSE可在肝癌细胞BEL7402转录和表达。

**关键词:** 神经元特异性烯醇化酶; 肝癌细胞; BEL7402细胞

朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽. 肝癌细胞BEL7402中神经元特异性烯醇化酶的表达. *世界华人消化杂志* 2005;13(18):2193-2196  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2193.asp>

## 0 引言

神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)广泛分布于人类及各种动物的成熟神经元、周围神经的神经内分泌细胞和一些感觉细胞中<sup>[1-4]</sup>。它在正常人脑组织含量最高, 起源于神经内分泌细胞的肿瘤组织也有异常表达。常见于神经母细胞瘤、小细胞肺癌、胰腺癌、前列腺癌<sup>[5]</sup>、嗜铬细胞瘤等。目前在临床上, NSE可作为神经元损伤的标志酶<sup>[6-11]</sup>; 也是小细胞肺癌首选的肿瘤标志物<sup>[12-14]</sup>, 可用于对SCLC的

鉴别诊断,放化疗效果、预后、恶变情况等的监测<sup>[15-20]</sup>. 我们应用PCR, Western-blot和免疫细胞化学方法在不同的水平上,发现NSE可在肝癌细胞中表达,报告如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞BEL 7402及肺癌细胞A549由北京市肿瘤防治研究所免疫208研究室保存;鼠抗人NSE mAb由北京市肿瘤防治研究所免疫研究室208室研制<sup>[21]</sup>;羊抗鼠-HRP二抗由北京市肿瘤防治研究所生化202研究室惠赠;胎牛血清为天津市川页生化制品有限公司产品;RPMI 1640培养基、DMEM为GIBCO公司产品;Trizol为Sigma公司产品;RNA酶抑制剂、M-MLV逆转录酶、5×M-MLV Buffer、dNTPs、Taq DNA Polymerase为Promega公司产品;EnVision 试剂盒购自Dako公司;硝酸纤维素膜购自Amersham 公司;DAB、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺为北京鼎国生物技术公司产品;甘氨酸、甲醇、十二烷基磺酸钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris碱)等为北京化学试剂公司产品.

**1.2 方法** 肝癌细胞BEL7402和人肺癌细胞A549在含120 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基,5 mL/L CO<sub>2</sub>, 37℃温箱中培养. Trizol法提取细胞总RNA(按说明书操作). 逆转录合成cDNA, 逆转录(RT)反应体系为:细胞总RNA 5 μL、Oligo dT(0.5 g/L)1 μL、DEPC H<sub>2</sub>O 6 μL,在70℃孵育10 min.再加RNAsin(50 MU/L)1 μL、5×M-MLV Buffer 4 μL, dNTP(10 mmol/L)2 μL, M-MLV(200 MU/L)1 μL,反应总体积20 μL, 37℃ 1 h后,立刻放入冰中,即为逆转录后的NSE-cDNA. 随后进行PCR反应扩增NSE基因片断. 上、下游引物分别为5'-GAATTCATGTCCATAGAGAAGATCTG-3'和5'-TCTAGAAGAGGAATCACAGCACAAGT-3',及通用β-actin引物(均由上海申友生物技术公司合成并测序). PCR条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增30个循环; 72℃延长反应10 min. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定.

**1.2.1 Western blot检测肿瘤细胞中NSE 的表达** 将BEL 7402, A549细胞用0.2 g/L EDTA消化后,细胞计数,1 000 r/min离心5 min. 加入PBS洗1次,取2×10<sup>6</sup>细胞加入PBS 100 μL、PMSF 2 μL,液氮冷冻,37℃溶化反复3次,混匀后与2×SDS凝胶加样缓冲液等量混合,煮沸5 min,100 g/L SDS-PAGE电泳. 120 mA, 10℃条件下电转移硝酸纤维素膜,105 min. 取出NC膜,用1'丽春红S染色液染色2-3 min,用蒸馏水洗净染料. 50 g/L脱脂奶粉37℃ 2 h封闭NC膜, TBST洗3次. 加入NSE mAb作为一抗,4℃过夜,0.5 g/L TBST洗3次. 加入羊抗鼠-HRP(1:1000),室温孵育1 h. 0.5 g/L TBST 洗3

次,再用TBS洗1次. 加入10 mL DAB染液染色至有条带出现, PBS终止显色. 晾干,室温保存.

**1.2.2 细胞化学方法检测肿瘤细胞中NSE的表达** 0.2 g/L的EDTA消化细胞,加培养液调整细胞浓度为1-1.5×10<sup>9</sup>个/L,滴于干净的玻片上,37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4-6 h. 冷丙酮/甲醇(1:1)固定5-7 min,自来水冲洗3遍,晾干后-20℃保存. 从-20℃取出固定好的片子,在30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS中浸泡10 min以去除内源性的过氧化物酶, PBS浸洗3次,100 mL/L 马血/PBS 37℃封闭60 min,加入抗NSE mAb 30 μL 37℃ 1 h, PBS浸洗3次,加EnVision工作液30-50 μL,室温放置60 min, PBS浸洗3次; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DAB显色,苏木精复染13 h, 10 mL/L 盐酸/酒精分色30 s. 将复染后的细胞片脱水后用树脂胶封片,镜下观察.

## 2 结果

**2.1 NSE- cDNA PCR 结果** 以逆转录的NSE cDNA为模板进行PCR扩增,扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析,可见在1375 bp附近出现一特异条带,与NSE片断的1 305 bp分子大小相符,300-400 bp之间有一条带与β-actin看家基因扩增片段大小相符(图1).

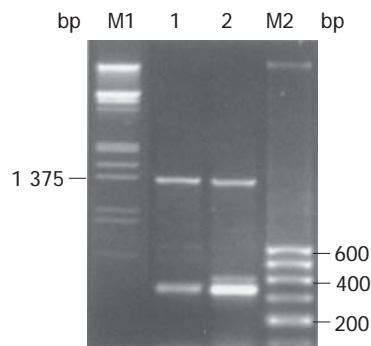


图1 NSE片段的PCR扩增. M1: DNA 分子质量标准: Lambda DNA/ EcoRI+HindIII; M2: 100 bp DNA 分子质量标准. 1: RT-PCR扩增A549细胞中NSE产物; 2: RT-PCR扩增BEL 7402细胞中NSE产物.

**2.2 Western blot检测肿瘤细胞中NSE 的表达** MS2-NSE融合蛋白在约M<sub>r</sub>57 000处有一特异性条带(图2A第1道),肝癌BEL7402及肺癌A549细胞蛋白在约M<sub>r</sub>50 000之间有一条较强的杂交带(图2A第3, 4道),其分子质量大小与NSE的分子质量相符(图2). 虽然在聚丙烯酰胺凝胶电泳可以见到无关蛋白MS2-GRP呈M<sub>r</sub>18 000的蛋白带(图2B第2道),但在Western blot反应中因为与NSE mAb不相关而不能呈现特异反应带(图2A第2道).

**2.3 免疫细胞化学方法检测肿瘤细胞中NSE的表达** NSE在以上两种肿瘤细胞中经细胞免疫化学染色均呈棕黄色阳性反应,着色部位主要位于胞质(图3A, B). 而在使用正常鼠血清作一抗对人肝癌细胞BEL7402染色的阴性对照中则呈阴性反应(图3C).



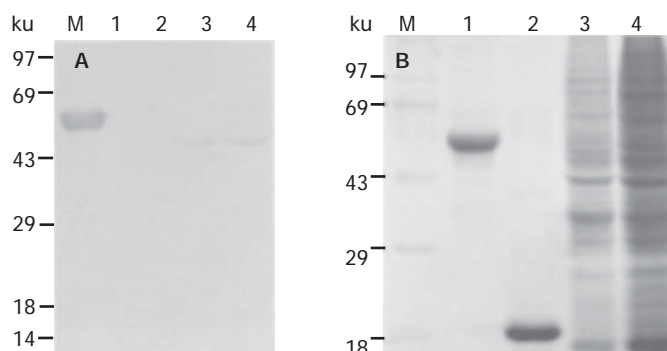


图2 抗NSE单抗Western blot蛋白印迹. A: 和聚丙烯酰胺凝胶电泳. B: 结果. M: 蛋白分子质量标准; 1: 融合蛋白 MS2-NSE; 2: 融合蛋白MS2-GRP; 3: A549细胞裂解总蛋白; 4: BEL7402细胞裂解总蛋白.

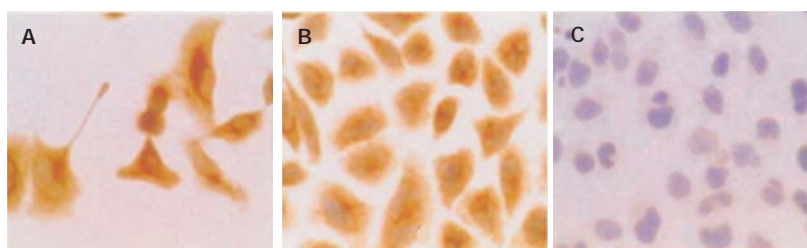


图3 肝癌BEL7402和肺癌A549细胞中NSE的表达(EnVision × 400). A: 肺癌细胞A549; B: 肝癌细胞BEL7402; C: 肝癌细胞BEL7402 (阴性对照).

### 3 讨论

从人肝癌细胞BEL7402及A549肺癌细胞中提取总RNA, RT-PCR得到NSE cDNA. 用特异性引物、Taq DNA聚合酶扩增了NSE基因片段, 长度为1 305 bp. 从人BEL7402肝癌细胞及A549肺癌细胞系中都能扩增出NSE和 $\beta$ -actin cDNA, 表明这两种细胞都有NSE的转录. BEL7402细胞和A549细胞表达的蛋白在 $M_r$ 50 000处有一特异性条带, MS2-NSE融合蛋白在57 000处有一特异性条带, GRP融合蛋白则没有任何条带, 这与预测结果完全一致. 我们克隆的NSE编码序列可编码434个氨基酸, 分子量约为 $M_r$ 50 000. MS2蛋白 $M_r$ 9 000, MS2-NSE融合蛋白为 $M_r$ 57 000. A549细胞和BEL7402细胞都能特异性表达NSE蛋白. NSE在人肝癌细胞BEL7402及肺癌细胞A549中均呈阳性反应, 着色部位主要位于胞质. 这与PCR, Western blot检测结果完全一致. 说明从转录水平、蛋白水平及细胞水平都能检测到NSE的表达.

烯醇酶是参与糖酵解的关键酶, 由 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 三种亚基以二聚体的形式组成 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\alpha\beta$ 五种同工酶. 其中 $\gamma\gamma$ 型特异性存在于神经元和神经内分泌细胞中, 称神经元特异性烯醇化酶(NSE), 约占脑内可溶性蛋白的1.5%, 最初NSE用于神经母细胞瘤及小细胞肺癌(神经内分泌瘤)的诊断, 但近年来一些研究证实急性脑血管病、癫痫、急性脑外伤、新生儿缺氧性脑病、心源性缺氧性脑损伤等多种中枢神经系统疾病中血清NSE均有明显改变<sup>[22-29]</sup>, 并提出NSE可作为诊断中枢神经系统疾病及脑损伤的一个有价值的指标.

如肝硬化时NSE的变化可特异反映毒性物质对中枢的影响情况, 可能作为亚临床期肝性脑病的临床判断指标<sup>[30]</sup>. 但未见NSE在肝癌细胞中表达的报道, 且肝癌并不是起源于神经内分泌细胞的肿瘤. NSE在肝癌中表达可能(1)由于NSE为涉及能量代谢的酶, 肿瘤组织糖酵解加强, 细胞增殖周期加快, 细胞内的NSE释放进入血液增多, 导致此酶在血清内含量增高; (2)NSE存在于细胞质内, 在细胞被破坏时释放出来进入血液循环. 因此NSE在肝癌细胞中表达的机制及在肝癌中的表达和意义还有待进一步研究, 以便为肝癌的发生预测和早期诊断寻求新的指标, 为肝癌的预防和早期治疗开辟新的途径. 此外, 本研究是一种定性实验, 若能从转录水平、蛋白水平及细胞水平定量分析肝癌细胞中NSE的表达水平将会有助于研究NSE在肝癌的临床诊断及预后判断中的意义.

### 4 参考文献

- 1 Ingebrigtsen T, Romner B. Biochemical Serum Markers of Traumatic Brain Injury. *J Trauma* 2002;52:798-808
- 2 Orlino EN Jr, Olmstead CE, Lazareff JA, Peacock WJ, Fisher RS, Fluharty AL. An enzyme immunoassay for neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid. *Biochem Mol Med* 1997;60:41-46
- 3 Tracy MR, Hedges SB. Evolutionary history of the enolase gene family. *Gene* 2000;259:129-138
- 4 Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci* 1987;10:269-295
- 5 Kamiya N, Akakura K, Suzuki H, Isshiki S, Komiya A, Ueda T, Ito H. Pretreatment Serum Level of Neuron Specific Enolase(NSE) as a Prognostic Factor in Metastatic Prostate Cancer Patients Treated with endocrine therapy. *Eur Urol*

- 2003;44:309-314
- 6 Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M. Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 1999;30:1190-1195
- 7 Herrmann M, Jost S, Kutz S, Ebert AD, Kratz T, Wunderlich MT, Synowitz H. Temporal profile of release of neurobiochemical markers of brain damage after traumatic brain injury is associated with intracranial pathology as demonstrated in cranial computerized tomography. *J Neurotrauma* 2000;17:113-122
- 8 Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Neuron-specific enolase serum levels after controlled impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 2001;18:569-573
- 9 Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock* 2001;16:165-177
- 10 Selakovic V, Raicevic R, Radenovic L. The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *J Clin Neurosci* 2005;12:542-547
- 11 Herrmann M, Curio N, Jost S, Grubich C, Ebert AD, Fork ML, Synowitz H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:95-100
- 12 Schneider J, Velcovsky HG, Morr H, Morr H, Katz N, Neu K, Eigenbrodt E. Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer. *AntiCancer Res* 2000;20:5053-5058
- 13 Hatzakis KD, Froudarakis ME, Bouros D, Tzanakis N, Karkavitsas N, Siafakas NM. Prognostic value of serum tumor markers in patients with lung cancer. *Respiration* 2002;69:25-29
- 14 Hoogenboom HR, de Beuine AP, Hufton SE, Hoet Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998;4:1-20
- 15 Kulpa J, Wojcik E, Reinfuss M, Kolodziejewski L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem* 2002;48:1931-1937
- 16 Shibayama T, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, Miyatake K, Kitajima T, Harada M. Complementary roles of pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in diagnosis and prognosis of small-cell lung cancer (SCLC). *Lung Cancer* 2001;32:61-69
- 17 Niho S, Nishiwaki Y, Goto K, Ohmatsu H, Matsumoto T, Hojo F, Ohe Y, Kakinuma R, Kodama T. Significance of serum pro-gastrin-releasing peptide as a predictor of relapse of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen. *Lung Cancer* 2000;27:159-167
- 18 Ferrigno D, Buccheri G, Giordano C. Neuron-specific enolase is an effective tumour marker in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2003;41:311-320
- 19 Muley T, Ebert W, Stieber P, Raith H, Holdenrieder S, Nagel D, Furst H, Roth HJ, Luthe H, Blijenberg BG, Gurr E, Uhl W, von Pawel J, Drings P. Technical performance and diagnostic utility of the new Elecsys neuron-specific enolase enzyme immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:95-103
- 20 Satoh H, Ishikawa H, Kurishima K, Yamashita YT, Ohtsuka M, Sekizawa K. Cut-off levels of NSE to differentiate SCLC from NSCLC. *Oncol Rep* 2002;9:581-583
- 21 朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军. 人神经元特异烯醇化酶基因克隆及单克隆抗体的制备与鉴定. *中华检验医学杂志* 2005;28:197-199
- 22 Fridriksson T, Kini N, Walsh-Kelly C, Hennes H. Serum neuron-specific enolase as a predictor of intracranial lesions in children with head trauma: a pilot study. *Acad Emerg Med* 2000;7:816-820
- 23 Fujii EY, Kozuki M, Mu J, Ino Y, Ushioda N, Tomimatsu T, Fukuda H, Kanzaki T, Nakayama M, Murata Y. Correlation of neuron-specific enolase and S100B with histological cerebral damage in fetal sheep after severe asphyxia. *Brain Res* 2004;1018:136-140
- 24 abinowicz AL, Correale J, Boutros RB, Couldwell WT, Henderson CW, DeGiorgio CM. Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring. *Epilepsia* 1996;37:122-125
- 25 Anand N, Stead LG. Neuron-Specific Enolase as a Marker for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review. *Cerebrovasc Dis* 2005;20:213-219
- 26 Ert AD, Fork ML, Synowitz H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg psychiatry* 2001;70:95-100
- 27 Berger RP, Adelson PD, Pierce MC, Dulani T, Cassidy LD, Kochanek PM. Serum neuron-specific enolase, S100B, and myelin basic protein concentrations after inflicted and noninflicted traumatic brain injury in children. *J Neurosurg* 2005;103:61-68
- 28 Herrmann M, Ebert AD, Tober D, Hann J, Huth C. A contrastive analysis of release patterns of biochemical markers of brain damage after CABG and VR and their association with the neurobehavioral outcome after cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:513-518
- 29 Selakovic V, Raicevic R, Radenovic L. The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *J Clin Neurosci* 2005;12:542-547
- 30 Strauss GI, Christiansen M, Moller K, Clemmesen JO, Larsen FS, Knudsen GM. S-100b and neuron-specific enolase in patients with fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2001;7:964-970

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁