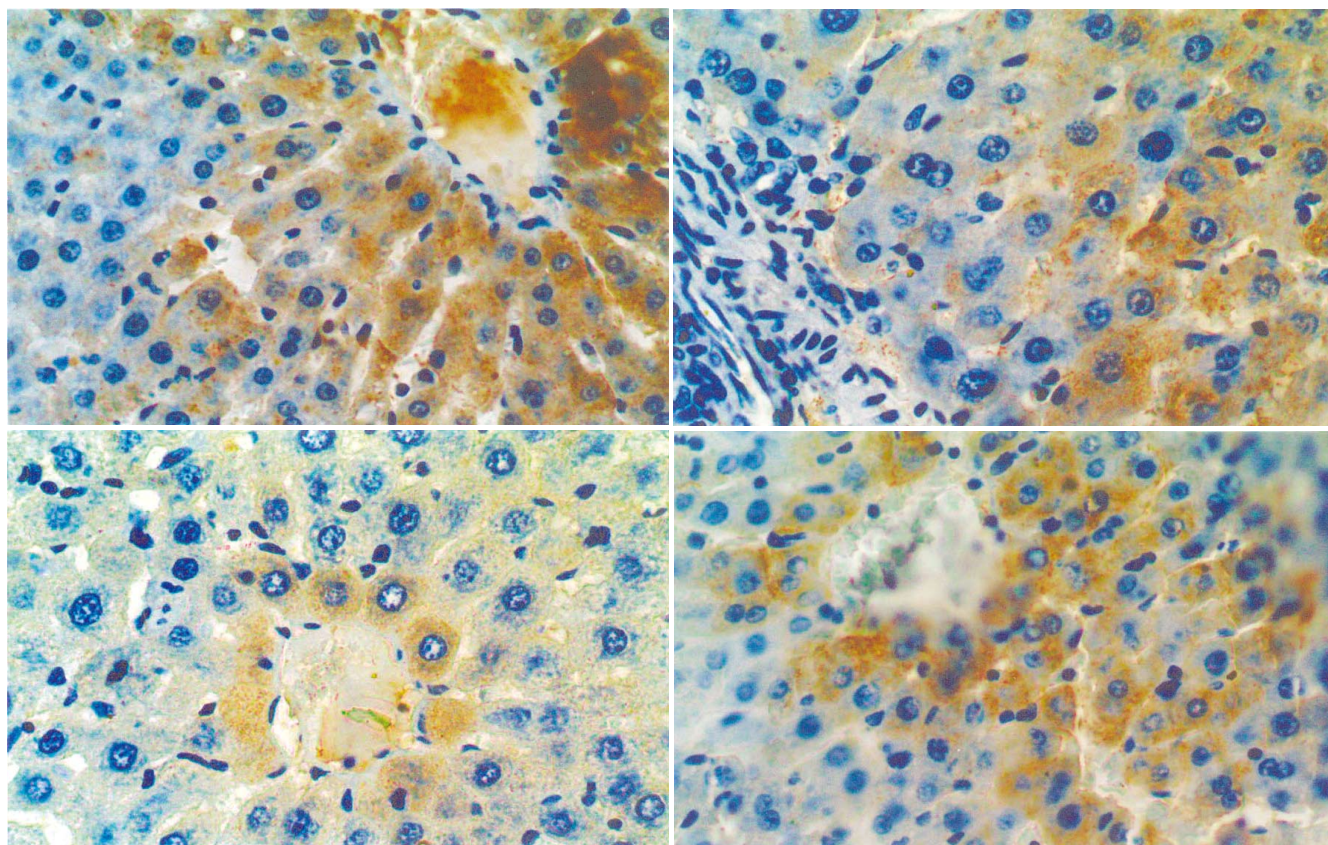


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 10 月 15 日 第 13 卷 第 19 期 (Volume 13 Number 19)



19/2005

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10月15日

第13卷

第19期

(总第147期)

述

评

- 2289 胃癌表遗传学的研究进展 滕玥, 戴冬秋
2294 胃肠癌术后应用抗生素致伪膜性肠炎 马振海, 戴冬秋, 徐惠绵

基础 研究

- 2297 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和Bcl-2、Bax蛋白表达的影响
贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆
2302 生存素siRNA表达质粒对MGC-803细胞增殖的影响
赵伟红, 郭俊明, 肖丙秀, 管忠, 肖东升
2306 人F3-GRIM19基因的克隆与表达 孙厚良, 刘洋, 李甲初, 曾昭淳
2310 解偶联蛋白-2在大鼠非酒精性脂肪肝中的表达
顾小红, 张云东, 冯爱娟
2314 COX-2在Barrett食管和食管腺癌中的表达及意义
刘心娟, 王邦茂, 阎雪燕, 刘文天, 吕宗舜, 张洁
2318 奥曲肽联合汉防己甲素对人胃癌细胞增殖的影响
王龙, 朱金水, 陈维雄, 朱励, 达伟, 王秀玲
2323 EB潜伏膜蛋白表达与肠上皮化生胃黏膜幽门螺杆菌感染的相关性
刘东屏, 于继红, 李茵茵, 王炳元
2327 瘦素及硬脂酰CoA去饱和酶-1在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝发病中的作用
陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞
2332 从肠肌间神经丛抑制性神经递质的改变探讨IBS不同亚型的发病机制
徐俊荣, 罗金燕, 尚磊, 孔武明

临 床 研究

- 2339 便秘型肠易激综合征结肠黏膜组织蛋白质组双向凝胶电泳分析
彭丽华, 杨云生, 孙刚, 王巍峰
2343 生理盐水冲洗提高多层CT门脉造影图像质量的临床研究 肖亮, 徐克

文 献 综 述

- 2349 与胃癌相关的DNA甲基化研究进展 张晔, 袁媛
2355 胃肠黏膜抗损伤和修复新进展 王玮, 孙梅
2360 钙和维生素D预防结直肠癌的机制及其临床应用 陆嵘, 房静远
2364 重症急性胰腺炎并发肾损害的发病机制 张喜平, 王蕾

研究 快报

- 2371 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒DNA PTP1的反式调节基因
高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖, 陶明亮
2375 活血健脾补肾法对结肠炎小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA表达的影响
张永锋, 陈如山, 吴正治, 李明, 陈曼茵
2378 蜜调通关散及其拆方对家兔肠道作用机制 梁劲军, 黄阳勇, 庆方
2381 复方甘草甜素下调细胞周期素依赖性激酶1启动子表达
王志凌, 成军, 张连峰, 邵凤娟, 刘蔚, 刘妍, 陶明亮

临 床 经 验

- 2386 内镜下双重色素法联合超声内镜对食管早期癌及癌前病变的诊断价值
刘一品, 黄留业, 李延青
2389 中医药对乙型肝炎患者肝癌前期状态的干预17例
屠红, 张菁, 成伟中, 韩镭, 陆敏, 曹宏伟, 陈复华, 耿沁
2392 奥沙拉秦钠对溃疡性结肠炎一氧化氮合酶表达的影响 郝俊鸣, 江学良, 佟艳铭
2395 应用SELDI-TOF-MS技术建立直肠癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型
闫志勇, 钱冬萌, 丁守怡, 宋旭霞, 王斌
2398 消化道肿瘤CT动脉造影分析83例 朱晓玲, 冯妹婷
2401 脐血与新鲜冰冻血浆治疗慢性重型肝炎的疗效比较
卢家桀, 唐红, 王晓辉, 刘真真, 叶慧

致 谢	2404 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2293 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2301 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 2309 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2317 第一届全国临床营养支持学术会议通知 2326 2006年即将召开的国际会议 2331 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2338 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2348 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2363 首届北京地坛感染病学术会议 2385 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知
封面故事	贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆. 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(19):2297-2301 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2297.asp
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 2005-10-15
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

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

October 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 19

EDITORIAL

Advancement in research of gastric cancer epigenetics

Teng Y, Dai DQ 2289

Pseudomembrane colitis induced by usage of antibiotic after gastric intestinal cancer operation

Ma ZH, Dai DQ, Xu HM 2294

BASIC RESEARCH

Effects of glutamine on glutathione content and expression of Bcl-2 and Bax protein during hepatic ischemia and reperfusion injury in rats

Jia CJ, Dai CL, Zhang X, Xu F, Cui K, XU YQ 2297

Effects of survivin siRNA expression plasmid on proliferation of MGC-803 cells

Zhao WH, Guo JM, XIAO BX, Guan Z, Xiao DS 2302

Cloning and expression of human F3-GRIM19 gene

Sun HL, Liu Y, Li JC, Zeng ZC 2306

Expression of uncoupling protein 2 in nonalcoholic fatty liver of rats

Gu XH, Zhang YD, Feng AJ 2310

Expression of COX-2 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma and its significance

Liu XJ, Wang BM, Yan XY, Liu WT, LV ZS, Zhang J 2314

Inhibitory effects of tetrandrine combined with octreotide on proliferation of gastric cancer cell lines cultured *in vitro*

Wang L, Zhu JS, Chen WX, Zhu L, Da W, Wang XL 2318

Relationship between expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein and *H pylori* infection in gastric mucosa with intestinal metaplasia

Liu DP, Yu JH, Li YY, Wang BY 2323

Roles of leptin and stearyl-CoA desaturase-1 in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease induced by a fat-rich diet

Lu YS, Fan JG, Fang JW, Ding XD, Yang ZR 2327

Role of inhibitory neurotransmitter of myoenteric plexus in carcinogenesis of irritable bowel syndrome with different subtypes

Xu JR, Luo JY, Shang L, Kong WM 2332

CLINICAL RESEARCH

Proteomic analysis of colonic mucosa by two-dimensional gel electrophoresis in constipation-predominant irritable bowel syndrome

Peng LH, Yang YS, Sun G, Wang WF 2339

Clinical application of normal saline flush in multi-detector CT photography on portal vein

Xiao L, Xu K 2343

REVIEW

Advancement in research of gastric cancer related DNA methylation

Zhang Y, Yuan Y 2349

New advancement in rehabilitation and anti-damage of gastric intestinal mucosa

Wang W, Sun M 2355

Mechanism and clinical usage of calcium and vitamin D in prevention of rectal cancer

Lu R, Fang JY 2360

Mechanism of severe acute pancreatitis combined with renal damage

Zhang XP, Wang L 2364

BRIEF REPORT

Cloning of hepatitis B virus DNA PTP1 transactivating genes by suppression subtractive hybridization technique

Gao XS, Cheng J, Zhen Z, Guo J, Zhang LY, Tao ML 2371

Effects of *Huoxue*, *Jianpi* and *Bushen* recipe on expression of TNF- α and its mRNA in mice with colitis

Zhang YF, Chen RS, Wu ZZ, Li M, Chen MY 2375

Effects of *Mitiao Tongguansan* decoction and its different ingredients on function of intestinal tract in rabbits

Liang JJ, Huang YY, Qing F 2378

Down-regulatory effects of glycyrrhizin on expression of cyclin-dependent kinase 1 gene promoter

Wang ZL, Cheng J, Zhang LF, Shao FJ, Liu W, Liu Yan, Tao ML 2381

CLINICAL PRACTICE

Evaluation of double staining combined with endosonography in detection of early esophageal cancer and precancerous lesions

Liu YP, Huang LY, Li YQ 2386

Traditional Chinese Medicine intervention for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B: an analysis of 17 cases

Tu H, Zhang J, Cheng WZ, Han L, Lu M, Cao HW, Chen FH, Geng Q 2389

Effects of olsalazine sodium on expression of nitric oxide synthase in patients with ulcerative colitis: an analysis of 36 cases

Hao JM, Jiang XL, Tong YM 2392

Establishment of serum protein pattern model for screening rectal carcinoma by SELDI-TOF-MS

Yan ZY, Qian DM, Ding SY, Song XX, Wang B 2395

Analysis of artery computed tomography angiography for digestive tumor in 83 cases

Zhu XL, Feng ST 2398

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 October 15, 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: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

强肠蠕动,缩短全结肠通过时间和结肠分段通过时间,从而起到通便作用;蜂蜜亦能使肠腔膨胀反射性地增强肠蠕动而起通便作用。至于能否在肛门直肠运动协调性障碍^[10]、直肠黏膜对容量刺激的低反应性^[11]、肛门内外括约肌舒缩功能失调^[12]等方面起作用,本实验尚不能说明。尽管中药治疗特发性便秘的研究方兴未艾,但目前尚有一些重要的方法性问题未解决,如动物病理模型^[13]、中药药理研究方法。

皂角、蜂蜜确有通便作用,未来组方中可继续保留。细辛虽说未发现针对特发性便秘病理机制的通便作用,但细辛能抑制蟾蜍坐骨神经动作电位的传导^[14],不能排除细辛具有通过影响神经传导,与皂角、蜂蜜一起协调直肠、结肠、肛门及盆底肌群运动的作用,这一切尚需进一步的实验研究。司春峰 *et al*^[15]研究了药物促结肠横肌、纵肌运动的作用,筛选出对纵肌肌条作用显著的槟榔、莱菔子、小茴香、生白术,对横肌肌条作用显著的槟榔、莱菔子、小茴香、生白术、蒲公英等药物,还观察了药物出现兴奋作用快慢和兴奋作用维持时间。以上研究方法和筛选药物对我们改进蜜调通关散具有重要的参考价值。

4 参考文献

- 1 黄艳. 中医药治疗便秘的近况. 辽宁中医学院学报 2005; 7: 23-24
- 2 张思超. 便秘在脑病发生学中的地位及意义. 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 294-295
- 3 唐学贵. 加味枳术汤煎剂治疗老年性便秘90例. 中医研究 2005; 18: 20-21
- 4 梁劲军, 郭锡泉, 肖桂玲, 庆方. 蜜调通关散注肛治疗严重特发性便秘30例. 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 306
- 5 陈明. 李乾构治疗便秘经验浅谈. 北京中医 2004; 23: 81-82
- 6 叶柏, 陈静, 徐丹华. 东垣润肠方治疗特发性便秘30例. 南京中医药大学学报 2003; 19: 371-372
- 7 赖福生, 王晓萍, 卢少军, 龚林, 易萍. 中风病人肺部感染与便秘关系的临床观察. 中西医结合心脑血管病杂志 2003; 1: 423
- 8 马丽莉. 从通便药的处方统计看便秘现状. 中国医师杂志 2004; 194-195
- 9 高利利, 陈曦, 吴本俨, 邵勇, 李园. 老年特发性便秘患者结肠、直肠和肛门动力学变化. 山东医药 2003; 43: 1-3
- 10 李爱萍, 程留芳, 郭荣斌, 杨德利. 肛门直肠运动协调性障碍与慢性特发性便秘. 中华消化杂志 2002; 22: 49-50
- 11 张安忠, 杨崇美, 刘吉勇, 叶远红, 王洪波. 慢性特发性便秘患者肛门直肠的感知阈值和动力学的改变. 中国综合临床 2003; 19: 420-421
- 12 张荣在, 林新, 林大鹏, 余智涛, 黄国杰. 直肠肛门反射及其对特发性便秘的诊断价值. 中华胃肠外科杂志 2003; 6: 227-229
- 13 郑雪平, 丁义江, 许芝银. 中药治疗功能性便秘的研究近况. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 249-250
- 14 陈超, 郑卫红, 熊素兵, 钱京萍. 细辛与verapamil镇痛协同作用的实验研究. 中国药理学通报 2003; 19: 337-339
- 15 司春峰, 魏睦新. 中药促结肠动力作用的筛选研究. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 346-348

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 BREIF REPORT •

复方甘草甜素下调细胞周期素依赖性激酶1启动子表达

王志凌, 成军, 张连峰, 邵凤娟, 刘蔚, 刘妍, 陶明亮

王志凌, 成军, 邵凤娟, 刘蔚, 刘妍, 陶明亮, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
张连峰, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

Down-regulatory effects of glycyrrhizin on expression of cyclin-dependent kinase 1 gene promoter

Zhi-Ling Wang, Jun Cheng, Lian-Feng Zhang, Feng-Juan Shao, Wei Liu, Yan Liu, Ming-Liang Tao

Zhi-Ling Wang, Jun Cheng, Feng-Juan Shao, Wei Liu, Yan Liu, Ming-Liang Tao, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Lian-Feng Zhang, Department of Gastroenterology, the First Teaching Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Dongcheng Dis-

trict, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2005-06-06 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To investigate the regulatory effects of the glycyrrhizin on the expression of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) gene promoter as well as its molecular biological mechanisms.

METHODS: The report gene expression vector pCAT3-CDK1-P was transfected into the HepG2 cell line, and then stimulated with glycyrrhizin. The HepG2 cells transfected with pCAT3-basic was used as a negative control. The expression level of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) in the transfected HepG2 cells was detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA) after 24 h.

RESULTS: pCAT3-CDK1-P activated the expression of CAT in HepG2 cells, while the glycyrrhizin inhibited it. The activity of CAT in pCAT3-CDK1-P transfected cells without stimulation was 9.3 times as high as that in pCAT3-CDK1-P transfected cells stimulated with glycyrrhizin, and 12.4 times as high as that in pCAT3-basic transfected cells.

CONCLUSION: Glycyrrhizin can down-regulate the expression of CDK1 gene promoter, and further down-regulate the expression of CDK1 gene.

Key Words: Glycyrrhizin; Cyclin-dependent kinase 1; Promoter

Wang ZL, Cheng J, Zhang LF, Shao FJ, Liu W, Liu Y, Tao ML. Down-regulatory effects of glycyrrhizin on expression of cyclin-dependent kinase 1 gene promoter. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(19):2381-2385

摘要

目的:了解复方甘草甜素调节细胞周期素依赖性激酶1(CDK1)基因启动子的活性,为甘草甜素的作用机制提供理论依据。

方法:以我室构建的细胞周期素依赖性激酶1启动子报告基因表达载体pCAT3-CDK1-P瞬时转染HepG2细胞,并用复方甘草甜素刺激,同时以转染pCAT3 basic的HepG2细胞为阴性对照,复方甘草甜素刺激后24 h后收获细胞。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性。

结果:质粒pCAT3-CDK1-P在HepG2细胞中能够激活CAT的表达,而用复方甘草甜素刺激后抑制HepG2细胞中CAT的表达。pCAT3-CDK1-P转染HepG2细胞中,CAT表达活性是

pCAT3-basic空载体的12.4倍,是甘草甜素刺激转染pCAT3-CDK1-P的HepG2细胞的9.3倍。

结论:复方甘草甜素可以下调CDK1基因启动子的活性,进而下调CDK1基因的表达,为深入了解甘草甜素在肝纤维化和肝癌中的作用机制提供新的分子生物学依据。

关键词: 甘草甜素; 细胞周期素依赖性激酶1; 启动子

王志凌, 成军, 张连峰, 邵凤娟, 刘蔚, 刘妍, 陶明亮. 复方甘草甜素下调细胞周期素依赖性激酶1启动子表达的研究. *世界华人消化杂志* 2005;13(19):2381-2385

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2381.asp>

0 引言

复方甘草甜素(glycyrrhizin, GL)是从甘草的根茎提取的一种有效药理成分,是由2分子的葡萄糖醛酸与甘草酸组成的复合物,具有多种药理作用。研究表明,甘草甜素能够抗乙型肝炎和丙型肝炎病毒、保护肝细胞、避免肝损害,并且具有潜在的抑制肝细胞肿瘤增生的作用^[1]。但是目前对甘草甜素药理作用的分子生物学机制仍不十分了解。我们用构建的pCAT3-CDK1-P报告基因载体,转染人肿瘤细胞系HepG2细胞后用甘草甜素刺激,应用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)共转染瞬时表达系统,测得下游CAT基因的表达减弱。证明甘草甜素可下调CDK1启动子活性,进而下调CDK1基因的表达。这些结果为深入了解甘草甜素的作用及其在肝纤维化中的作用机制提供相应的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞为本室保存, pCAT3-CDK1-P为本室构建。报告质粒pCAT3-basic购自Promega公司, 脂质体FuGENE6转染试剂盒、CAT-ELISA检测试剂盒均购自Roche公司。100 mL/L小牛血清、DMEM购自Sigma公司。复方甘草甜素由深圳健安医药公司提供。

1.2 方法

1.2.1 pCAT3-CDK1-P的构建 我室刘蔚 *et al*根据GenBank分析的CDK1基因组序列, 确定CDK1-P的转录起始位点并设计引物。以HepG2细胞基因组DNA为模板, 聚合酶链反应扩增CDK1启动子序列, 经过纯化回收DNA片段, 连接、转化及酶切鉴定后, 构建成CDK1启动子的真核报告载体pCAT3-CDK1-P。磁珠法提取质粒以备转染。

1.2.2 细胞培养及转染 在35 mm含100 mL/L小牛血清的DMEM培养皿中, 常规培养HepG2细胞。细胞生长至50-80%融合时, 将pCAT3-CDK1-P采用脂质体转染法转入HepG2细胞, 具体转染方法参照FuGENE6说明书进行。质粒pCAT3-cdk1-p转染24 h后收集细胞裂解液, 在酶标仪检测415 nm光波标本的吸光度A值。

1.2.3 复方甘草甜素刺激转染pCAT3-CDK1-P的HepG2细胞 HepG2细胞生长至50-80%融合时, 将pCAT3-CDK1-P转入HepG2细胞, 并将复方甘草甜素加入细胞培养液中, 复方甘草甜素终浓度为1.0 mmol/L, 同时以转染pCAT3-basic的HepG2细胞作阴性对照. 转染24 h后, 收集细胞裂解液, 用于CAT活性检测. 所有实验严格平行操作.

1.2.4 CAT表达量的检测 实验操作按照CAT ELISA试剂盒说明书进行. 取1.0 μ g/L的CAT标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液200 μ L, 加入已包被抗-CAT抗体的96孔板中, 37 $^{\circ}$ C温育2 h. 再依次加入第一抗体(地高辛标记的抗-CAT抗体)、第二抗体(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体, 抗-DIG-POD)各200 μ L. 分别在37 $^{\circ}$ C温育1 h后, 加入过氧化物酶的底物, 室温显色20 min. 用酶标仪检测标本在415 nm检测波长, 490 nm参考波长下的光波的吸光度A值, 其数值反映细胞提取物中的CAT的表达水平. 以未加入细胞裂解液的空白孔作为平行的空白对照.

2 结果

2.1 重组质粒pCAT3-CDK1-P鉴定 重组质粒pCAT3-CDK1-P分别以*Kpn*I/*Xho*I双酶切及PCR鉴定均显示510 bp正向插入条带. 说明重组质粒pCAT3-CDK1-P构建正确. pCAT3-CDK1-P鉴定电泳图谱如图1所示.

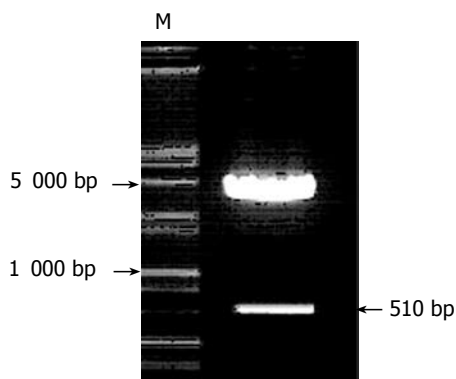


图1 pCAT3-CDK1-P鉴定电泳图谱. pCAT3-CDK1-P *Kpn*I/*Xho*I双酶切, 可见510 bp的CDK1-P DNA条带; DNA Marker: 15 000 bp+2 000 bp.

2.2 pCAT3-CDK1-P的瞬时转染实验及报告基因CAT表达的检测 空载体对照组pCAT3 basic的CAT的吸光度值为0.072, pCAT3-CDK1-P的吸光度值为0.892(图2). 此数据表明, 所构建的pCAT3-CDK1-P具有启动子活性.

2.3 重组质粒pCAT3-CDK1-P用甘草甜素刺激后CAT表达的检测 pCAT3-CDK1-P转染HepG2细胞后加甘草甜素刺激后CAT的吸光值为0.096, pCAT3-CDK1-P+GL的CAT表达水平较对照组质粒显著降低, pCAT3-CDK1-P的CAT吸光值是pCAT3-basic空载体的12.4倍, 是pCAT3-CDK1-P +GL的9.3倍. 如图2所示, 说明GL对pCAT3-CDK1-P启动子的活性具有抑制作用, 使其下游CAT基因的表达明显减弱.

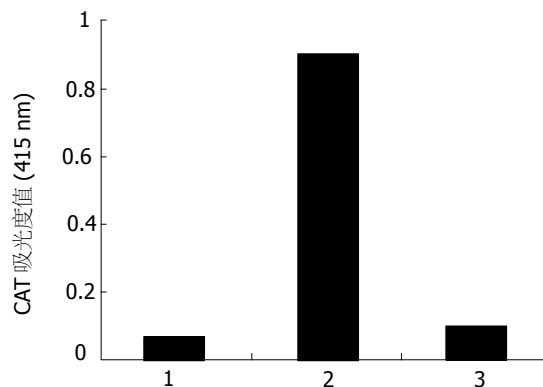


图2 CAT表达检测结果. 1: pCAT3-basic; 2: pCAT3-CDK1-P; 3: pCAT3-CDK1-P+GL.

3 讨论

复方甘草甜素具有广泛的药理作用, 在抗炎及治疗溃疡、过敏反应、皮肤病等方面具有肯定的疗效. 研究表明, 复方甘草甜素在治疗慢性乙型、丙型肝炎病毒感染, 预防肝硬化、肝细胞癌方面同样具有明显疗效^[2-5]. 近来, 复方甘草甜素在抗肝纤维化的应用中也取得了很好的效果, 它通过多种机制改善肝纤维化. 复方甘草甜素可通过减轻肝细胞变性坏死, 抑制炎症反应, 调节免疫及改善循环等因素而抑制肝内纤维的增生^[6]. 它能够降低I型、III型胶原的合成而减少细胞外基质的产生. 复方甘草甜素对皮质类固醇在肝内代谢失活有竞争性抑制作用, 它能够产生糖皮质激素样作用而降低脯氨酸羟化酶的活性, 使胶原易于分解^[7-9]. Ono *et al*^[10]在研究中进一步证实甘草甜素通过抑制肝星状细胞的增殖来降低胶原的产生, 因而改善肝纤维化.

细胞周期分为四个时相: G1期、S期、G2期和M期, 细胞周期的正常运转受到精细、严密的调控, 细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)和细胞周期蛋白(cyclin)是整个调控细胞周期网络中最重要的组成部分. CDK的主要生物学作用是启动DNA的复制和诱发细胞的有丝分裂, 其生物学作用的异常可能导致肿瘤的发生. CDK本身并无激酶活性, 它需和相应的细胞周期蛋白结合而具有蛋白酶活性, 使靶蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化而起作用^[11]. 本实验研究的细胞周期依赖蛋白激酶1又被称为细胞周期分裂基因2(cell division gene 2, *cdc2*), *cdc2*是最早发现的细胞周期蛋白依赖性激酶, 被命名为CDK1. 它主要通过抑制视网膜母细胞瘤基因产物Rb的活性, 促进细胞周期各时相的转换, Rb蛋白对细胞周期中最关键的调控点G1/S期、G2/M期起着“闸门”的作用, Rb蛋白的磷酸化和非磷酸化最终决定细胞周期的进程^[12]. Loyer *et al*^[13]在研究中发现CDK1在静止的大鼠肝细胞不表达, 但在通过细胞周期G1期和G1/S期转换时表达增加, 在S、G2和M期达到最高水平. CDK1是M期的促进因子, 广泛地存在于从酵母到人所有的真核细胞里, 有活性的CDK1触

发G2/M期的转换^[14]。Krek *et al*^[15]研究证实CDK1的功能是调控G1/S期转换和有丝分裂的起始。CDK1的催化活性主要通过翻译后修饰调整,包括磷酸化作用和去磷酸化作用,它与细胞周期蛋白共同作用发挥效应。许多研究证实cdc2是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它是有丝分裂的诱导剂,被磷酸化作用及结合到细胞周期素B所调整。它必须与细胞周期素B协同作用才能发挥效能。cdc2调控细胞的有丝分裂,cdc2/cyclin B对有丝分裂的正确起始至关重要。有丝分裂中G2/M期的转换,要求cdc2的激活,cdc2被cyclinB1正向调节,而苏氨酸14和酪氨酸15的磷酸化作用起负向调节,苏氨酸14和酪氨酸15磷酸化使CDK1的磷酸化位点被抑制,导致G2/M期阻滞^[16-18]。显然cdc2活性被抑制阻碍细胞进入M期^[19]。细胞的异常增生是肿瘤最基本的表型特性,诱使细胞持续的增生是肿瘤形成的关键因素^[20]。肝致癌物质WY14 643能使细胞分裂的控制酶CDK1在肝细胞的表达增加,CDK1的增加刺激肝细胞的增生,很多证据已证实异常的CDK1的表达同肿瘤之间有着相互关系。CDK1在90%的乳腺癌细胞系和所有的胃癌、结肠癌可过度表达^[21-24]。Santoni-Rugiu *et al*^[25]证实在肝癌(HCC)中cdc2过度表达,诱使细胞的有丝分裂增加。

现代研究证实CDK1的调整还包括肿瘤抑制基因p53及和CDK1抑制蛋白p21^{Waf1}的相互作用。磷酸化的p53通过与靶蛋白及相关调控因子相互作用,诱导细胞周期阻滞、凋亡或DNA修复。p53诱导的细胞周期阻滞除p21介导的G1期阻滞外,其余均表现为G2期阻滞^[26]。El-Deiry *et al*^[27]认为p53磷酸化还能作为p21^{Waf1}的转录调节蛋白而起作用。而p21^{Waf1}不仅可以介导p53的功能,还对细胞的增殖、分化和衰老都起着重要的作用。它是一个广谱的细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制蛋白。p21^{Waf1}能通过对CDK1、CDK2、CDK4和PCNA复杂的调节而抑制增殖^[28,29]。Ma *et al*^[30]证实作为对CDK1过分表达的反应,p21^{Waf1}可能扮演双重的角色,它通过抑制CDKs而阻滞细胞进入S期,而且可能直接通过抑制PCNA抑制DNA的复制。他们还认为CDK1在细胞周期活动中是测量DNA合成的一个独立因素。CDK1表达增加能刺激肝细胞增生,而肝细胞p21^{Waf1}表达增加抑制CDK1,致使G1/S期阻滞,细胞周期被抑制。当前研究充分证实CDK1在细胞生长增殖及肿瘤的发生中扮演一个重要的角色。

总之,CDK1对细胞周期的调控表现为复杂的机制。我们证实复方甘草甜素抑制CDK1启动子的表达,从而使CDK1的基因表达下调,导致细胞周期的阻滞,使细胞的生长受到抑制。该实验从分子生物学角度为进一步了解复方甘草甜素在肝纤维化和肝癌治疗中的作用机制提供了理论证据。

4 参考文献

- Khaksa G, Zolfaghari ME, Dehpour AR, Samadian T. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of disodium glycyrrhetic acid hemiphthalate. *Planta Med* 1996; 62: 326-328
- Zhang YH, Isobe K, Nagase F, Lwin T, Kato M, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Glycyrrhizin as a promoter of the late signal transduction for interleukin-2 production by splenic lymphocytes. *Immunology* 1993; 79: 528-534
- Zhang YH, Kato M, Isobe K, Hamaguchi M, Yokochi T, Nakashima I. Dissociated control by glycyrrhizin of proliferation and IL-2 production of murine thymocytes. *Cell Immunol* 1995; 162: 97-104
- Jeong HG, You HJ, Park SJ, Moon AR, Chung YC, Kang SK, Chun HK. Hepatoprotective effects of 18beta-glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacol Res* 2002; 46: 221-227
- Tanahashi T, Mune T, Morita H, Tanahashi H, Isomura Y, Suwa T, Daido H, Gomez-Sanchez CE, Yasuda K. Glycyrrhizic acid suppresses type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression *in vivo*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80: 441-447
- 贾道全, 张正, 罗成福, 黄丽彬. 甘草甜素逆转肝纤维化及早期肝硬化的作用探讨. *中华传染病杂志* 1995; 13: 241-247
- 王吉耀, 刘维田, 胡美亚, 朱无难, 董家琪. 甘草酸对成纤维细胞1.3型前胶原mRNA表达的抑制作用. *中华消化杂志* 1997; 2: 60-61
- Sekizawa T, Yanagi K, Itoyama Y. Glycyrrhizin increases survival of mice with herpes simplex encephalitis. *Acta Virol* 2001; 45: 51-54
- Kayano K, Sakaida I, Uchida K, Okita K. Inhibitory effects of the herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) on cell proliferation and procollagen gene expressions in cultured rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1998; 29: 642-649
- Ono M, Miyamura M, Kyotani S, Saibara T, Ohnishi S, Nishioka Y. Effects of Sho-saiko-to extract on liver fibrosis in relation to the changes in hydroxyproline and retinoid levels of the liver in rats. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1079-1084
- 李海燕. 星型胶质细胞瘤与细胞周期. *中华实用医学* 2001; 3: 33-35
- 李淑萍, 张宗玉, 童坦君. 衰老细胞相关信号传递系统. *实用老年医学* 2002; 16: 60-64
- Loyer P, Glaise D, Cariou S, Baffet G, Meijer L, Guguen-Guillouzo C. Expression and activation of cdk1 (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 1994; 269: 2491-2500
- Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 378-383
- Krek W, Nigg EA. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J* 1991; 10: 305-316
- Badie C, Itzhaki JE, Sullivan MJ, Carpenter AJ, Porter AC. Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2358-2366
- 曹燕飞, 陈汉春. Pin1与细胞周期调控及相关人类疾病的关系. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2003; 23: 380-382
- Clemens DL, Calisto LE, Sorrell MF, Tuma DJ. Ethanol metabolism results in a G2/M cell-cycle arrest in recombinant Hep G2 cells. *Hepatology* 2003; 38: 385-393
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, Kitagawa M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 2004; 6: 661-672
- Farber E. Hepatocyte proliferation in stepwise development of experimental liver cell cancer. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 973-978
- Steinmann KE, Pei XF, Stoppler H, Schlegel R, Schlegel R. Elevated expression and activity of mitotic regulatory proteins in human papillomavirus-immortalized keratinocytes. *Oncogene* 1994; 9: 387-394
- Yasui W, Ayhan A, Kitadai Y, Nishimura K, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *Int J Cancer*

- 1993; 53: 36-41
- 23 Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1112-1116
- 24 Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 1995; 11: 136-140
- 25 Santoni-Rugiu E, Jensen MR, Thorgeirsson SS. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c-myc and transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 1998; 58: 123-134
- 26 Ling YH, Zou Y, Perez-Soler R. Induction of senescence-like phenotype and loss of paclitaxel sensitivity after wild-type p53 gene transfection of p53-null human non-small cell lung cancer H358 cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 693-702
- 27 El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54: 1169-1174
- 28 Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-704
- 29 Waga S, Marsman DS, Beach D, Stillman B. The p21Waf1 Inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369: 574-578
- 30 Ma X, Stoffregen DA, Wheelock GD, Rininger JA, Babish JG. Discordant hepatic expression of the cell division control enzyme p34cdc2 kinase, proliferating cell nuclear antigen, p53 tumor suppressor protein, and p21Waf1 cyclin-dependent kinase inhibitory protein after WY14,643 ([4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid) dosing to rats. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 69-78

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006 年第 5 届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知

本刊讯 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展,由中华医学会肝病学会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第 5 届全国肝脏疾病学术研讨会”定于 2006-05 在辽宁省大连市召开。届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题继续进行继续教育讲座,并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分。现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1) 病毒性肝炎发病机制的研究进展; (2) 病毒性肝炎的治疗策略; (3) 乙型病毒性肝炎的长期治疗; (4) 丙型肝炎的抗病毒治疗; (5) 肝纤维化发病机制研究进展; (6) 肝纤维化的防治; (7) 肝硬化的规范化治疗; (8) 肝细胞癌的病因学研究进展; (9) 肝癌的发病机制研究进展; (10) 肝癌的早期诊断; (11) 肝癌的手术治疗及方案选择; (12) 肝癌的非手术治疗; (13) 肝癌的生物治疗; (14) 自身免疫性肝病的发病机制; (15) 自身免疫性肝病的诊断和治疗; (16) 肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗; (17) 生物人工肝的应用及进展; (18) 小儿自身免疫性肝病; (19) 肝肾综合征; (20) 肝功能衰竭; (21) 肝干细胞的研究进展及临床应用; (22) 脂肪肝及酒精性肝病; (23) 非酒精性脂肪性肝病。

2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及 500 字(词)左右中文摘要各一份,应包括目的、材料与方法、结果、讨论,并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿,恕不退稿)。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文,不再受理。

3 论文寄至地址

400010, 重庆市渝中区临江路 74 号, 中华肝脏病杂志编辑部收。请在信封左下角注明“会议征文”。欢迎用软盘和电子邮件方式投稿。电子邮件地址 zhgz@vip.163.com。征文截稿日期: 2006-02-28(以邮戳为准)。

欢迎从事肝病临床和基础研究工作的医务人员及科研工作者踊跃投稿,参加会议。