

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>增高幅度也有一定程度的降低,其中党参治疗组胃泌素刺激后的胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>增高幅度与模型组相比差异显著,说明大鼠的脾虚状态经补脾方药作用后随着便溏、弓背、消瘦、背毛蓬松等整体状态恢复的同时微观病理指标亦有不同程度的恢复趋势。

总之,本实验采用血清药理学方法从中医方证角度对脾虚状态微观病理机制进行了初步探讨,表明:(1)脾虚大鼠壁细胞静息下胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>及刺激后[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的异常变化可能是脾虚证在分子水平上的病理机制之一,Ca<sup>2+</sup>的异常介导可能参与了脾虚证的病理形成过程;(2)补脾方药血清可从整体和微观不同程度调整脾虚大鼠的病理状态;(3)脾虚状态不仅仅表现为一种外在的整体的抽象概念,也与某些特定微观病理指标相联系。

#### 4 参考文献

- 1 赵海磊,刘成,赵爱光.中药复方胃肠安血清诱导肝癌SMMC-7721细胞分化.世界华人消化杂志 2003;11:1345-1348
- 2 彭智聪,黄静宁,郭宝丽,张红玲.中药血清药理学实验方法研究进展.中国实验方剂学杂志 2001;7:57-59
- 3 聂克,王汝俊,王建华.大鼠胃壁细胞的分离方法.世界华人消化杂志 1999;7:994-995
- 4 Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1998;273:22151-22158
- 5 台卫平,罗和生.黄连素对HT-29人结肠癌细胞系Ca<sup>2+</sup>的抑制作用.世界华人消化杂志 2003;11:1662-2664
- 6 Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 1987;248:313-328
- 7 Mansilla-Olivares A. Calcium, the atom triggering life and cellular function. *Cir Cir* 2004;72:139-151
- 8 Yorek MA, Davidson EP, Dunlap JA, Stefani MR. Effects of bradykinin on cytosolic Calcium in neuroblastoma cells using the fluorescent indicator fluo-3. *Biochim Biophys Acta* 1993;1177:215-220
- 9 Gascon-Barre M, Hoddad P, Provincher SJ, Bilodeau S, Pecker F, Lotersztajn S, Vallieres S. Chronic hypocalcemia of vitamin D deficiency leads to lower intracellular calcium concentrations in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994;93:2159-2167
- 10 Johnson WT, Dufaut SN. Intracellular calcium mobilization in rat platelets is adversely affected by copper deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1993;1175:263-268
- 11 Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003;23(10Pt2):68-73
- 12 Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol* 2003;65:103-131
- 13 Niv Y, Vardi I. Calcium channel blocker decreases pentagastrin-stimulated alkaline-tide: a role for extracellular calcium in gastric acid secretion. *Isr J Med Sci* 1995;31:215-217
- 14 Niki S, Rokutan K, Nakamura K, Ogihara S, Kutsumi H, Saitoh T, Aoike A, Kawai K. Calcium-dependent signaling of acid secretion in isolated parietal cells from guinea pigs and its modification by ethanol. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1992;89:1484-1490
- 15 Hinkle KL, Bane GC, Jazayeri A, Samuelson LC. Enhanced calcium signaling and acid secretion in parietal cells isolated from gastrin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G145-G153

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

• 研究快报 •

## NHE1基因调控细胞内酸碱平衡对胃癌细胞生物学行为的影响

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈刚, 王国安, 杨孟华

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈刚, 王国安, 杨孟华, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038

项目负责人: 刘海峰, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. HaiFengLIU333@hotmail.com

电话: 010-88276549

收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2004-12-28

### 摘要

**目的:** 通过基因转染技术, 研究NHE1反义基因对SGC-7901胃癌细胞生物学行为的影响, 探讨通过酸化细胞内环境诱导肿瘤细胞凋亡从而治疗胃癌的新方法。

**方法:** 利用亚克隆技术构建人NHE1反义结构基因哺乳动物真核表达质粒, 通过DOTAP脂质体介导的转染技术将反义真核表达质粒和空载体分别转入SGC-7901胃癌细胞中,

经聚合酶链反应(PCR)对转染基因的整合鉴定后, 观察基因转染对细胞形态学、细胞内pH值、体外生长状况、细胞周期以及双层软琼脂克隆形成能力和裸鼠成瘤力的影响。

**结果:** 光镜及透射电镜下细胞形态恶性程度降低。Anti-7901细胞胞内pH值显著低于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901细胞内pH值(6.77±0.05 vs 7.24±0.03, 7.26±0.03,  $P<0.01$ )。Anti-7901细胞生长速度明显减慢, 出现接触抑制, 呈单层生长, 细胞凋亡率显著高于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901凋亡率(26.1% vs 5.12%, 4.48%,  $P<0.01$ )。Anti-7901细胞在双层软琼脂中集落形成率显著低于Zeo-7901和空白对照组SGC-7901细胞(9±3.54% vs 40±4.53%, 38.6±4.63%,  $P<0.01$ )。接种Zeo-7901细胞和空白对照组

SGC-7901 细胞裸鼠皮下长出肿瘤, 成瘤率为 100%, 而接种 Anti-7901 细胞裸鼠皮下未长出肿瘤, 成瘤率为 0%.

**结论:** 反义技术干预可使 NHE1 基因表达下调, 导致细胞内酸化, 诱导细胞凋亡, 达到了有效治疗胃癌的目的, 为胃癌基因治疗提供了新的思路.

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈刚, 王安, 杨孟华. NHE1 基因调控细胞内酸碱平衡对胃癌细胞生物学行为的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3): 394-397

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/394.asp>

## 0 引言

胞膜离子交换蛋白  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  交换泵 ( $\text{Na}^+-\text{H}^+$  exchanger, NHE) 是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白, 是维持细胞内 pH 值 (intracellular pH, pH<sub>i</sub>) 在中性或偏碱性的重要膜蛋白<sup>[1]</sup>. 近年来, 随着对 NHE1 研究在肿瘤学领域的不断深入, 人们发现 NHE1 基因在肿瘤细胞中的活性明显增高, 使肿瘤细胞内 pH 值为中性或偏碱性, 与肿瘤的发生有着密切的关系<sup>[2]</sup>. 已有研究证实, pH<sub>i</sub> 下降促进细胞凋亡, pH<sub>i</sub> 升高抑制凋亡的发生<sup>[3]</sup>. 因此阻断肿瘤细胞 NHE1 基因的表达, 导致肿瘤细胞内酸化, 诱导细胞凋亡, 不失为抗肿瘤治疗的新途径, 具有重要的理论意义和实践意义. 我们前期研究发现<sup>[4]</sup>, 在慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生组织中均可检测到 NHE1 蛋白的表达, 而且随着病变程度的增加, NHE1 表达有增加的趋势, 提示 NHE1 超表达的细胞, 可能是一种癌前细胞, 与胃癌的发生有着密切的关系. NHE1 mRNA 及其蛋白在胃癌中的表达程度显著高于胃癌前病变, 提示 NHE1 基因可能是基因治疗胃癌的一个理想靶点.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *E. Coli* DH5 $\alpha$  细菌由第三军医大学西南医院烧伤研究所实验室提供; 基因表达质粒 PECE (PEAP-NHE1) 由加拿大 Jossete Noel (Montreaty University) 博士惠赠, 全长 6.5 kb, 携带包含人类 NHE1 结构基因的 3.6 kb cDNA 目的片段, 经 *EcoRI*、*HindIII* 位点插入 (5' 含 *HindIII* 酶切位点, 3' 含 *EcoRI* 酶切位点), 含有 Amp 标志基因; 哺乳动物真核表达载体 pcDNA3.1 (-)/Zeo 为 Invitrogen 公司产品, 含 *EcoRI*、*HindIII* 酶切位点 (5' 含 *EcoRI* 酶切位点, 3' 含 *HindIII* 酶切位点); 限制性内切酶 *EcoRI*、*HindIII* 购自 Takara 公司; T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; 转染细胞筛选所用抗生素 Zeocin 为 Invitrogen 公司产品; 转染用脂质体 DOTAP 为 Roche 公司产品; DNA 回收试剂盒由金泰生物技术 (厦门) 有限公司惠赠; 快速质粒提取盒 E. Z. N. A® Plasmid Miniprep Kit I 为 omega Bio-Tek 公司产品; BCECF 荧光探针购自 Eugene 公司; Nigericin 购自 Sigma 公司; Zeocin PCR 引物根据文献由上海基康公司设计合成.

**1.2 方法** 采用亚克隆重组技术进行基因重组, pcDNA3.1

(-)/Zeo 用 *EcoRI*、*HindIII* 酶切后, 等体积酚/氯仿抽提 1 次, 离心沉淀, 用去离子水溶解, 取 1  $\mu\text{L}$  电泳, 余置 -20℃ 备用. PECE 用 *EcoRI*、*HindIII* 酶切电泳后, 试剂盒回收目的片段, 目的片段与酶切后 pcDNA3.1 (-)/Zeo 在 T4DNA 连接酶作用下, 进行定向反向连接, 在 16℃ 条件下连接 16 h, 然后进行酶切凝胶电泳鉴定. 重组成功后, 采用脂质体法将质粒转染至 SGC-7901 胃癌细胞中. 采用 PCR 法扩增外源性 ZeoR 基因来鉴定转染成功. SGC-7901 胃癌细胞在 100 mL/L 小牛血清 1640 培养基中, 于 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度下培养. 用缓冲液求细胞内 pH 值的标准曲线, 缓冲液内含 (Mm): KCl 90-130, NaCl 5, MgSO<sub>4</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, 将缓冲液分装 6 只试管中, 每只 5 mL, 分别将 pH 调至不同的值, 分别为 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 6 只试管中分别加入 Nigericine 和 BCECF, 浓度分别为 30  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\mu\text{mol/L}$ , 将转染后 48 h 的细胞 PBS 洗 2 次, 分别将相同数量的细胞加入上述试管中, 37℃ 孵育 12 min, 用氩离子激光 488 nm 激发, 记录 530/640 发射荧光, 求出该比值 (FIR), 以 pH 值为横坐标, FIR 为纵坐标, 求出标准曲线, 根据标准曲线求出细胞内 pH 值<sup>[5]</sup>. 细胞周期及细胞凋亡用流式细胞仪检测. 利用酶联免疫吸附仪测定各细胞的吸光度值, 绘制细胞生长曲线. 光镜和透射电镜观察细胞结构的变化. 镜下计数软琼脂中细胞集落形成数, 镜下直径大于 75  $\mu\text{m}$  或细胞数大于 50 个以上的克隆才计数, 求出克隆形成率. 裸鼠皮下分别接种 Zeo-7901 细胞、空白对照组 SGC-7901 和 Anti-7901 细胞悬液, 观察裸鼠体内成瘤情况.

**统计学处理** 计量数据以平均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 对相关资料进行 *t* 检验, 采用 SPSS 程序包进行分析,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异非常显著.

## 2 结果

**2.1 基因重组及鉴定** pEAP-NHE1 用 *EcoRI*、*HindIII* 酶切后, 形成 2.9 kp 和 3.6 kp 两条带. 根据对 pEAP-NHE1 质粒图谱的分析, 用凝胶试剂盒回收含人类 NHE1 结构基因 cDNA 的 3.6 kp 目的片段. pcDNA3.1 (-)/Zeo 用 *EcoRI*、*HindIII* 酶切后, 形成 5.0 kp 的线性载体. 将其与目的片段进行定向反向连接, 并经细菌转化和质粒抽提, 获的重组质粒, 再用 *EcoRI*、*HindIII* 酶切后, 形成 5.0 kp、3.6 kp 条带, 提示目的片段成功插入载体中. 采用脂质体法将反义重组质粒及空载体转染至 SGC-7901 胃癌细胞中, Zeocin 筛选出稳定的克隆后, NHE1 反义基因转染的 SGC-7901 细胞命名为 Anti-7901 细胞, 空载体 pcDNA3.1 (-)/Zeo 转染的 SGC-7901 细胞命名为 Zeo-7901 细胞. 采用 PCR 法扩增外源性 ZeoR 基因, 转染反义重组质粒及空载体的 SGC-7901 胃癌细胞组可各见一条特异性条带, 大小为 357 bp, 而空白对照组 SGC-7901 胃癌细胞未见特异性条带, 说明反义重组质粒及空载体已转染至胃癌细胞内.

**2.2 细胞形态学的变化** 光镜下观察:Anti-7901 细胞胞体增大,胞质丰富,核大小相对一致,核浆比减少,核分裂相减少,异型性减小.而 Zeo-7901 和空白对照组 SGC-7901 细胞胞体大小不一,形态多样,胞质少,核大小不一,核浆比增大,核分裂相增多,异型性增大,出现较多巨核细胞和多核巨细胞.空白对照组 SGC-7901 和空载细胞相比无明显差别.透射电镜下观察:空白对照组 SGC-7901 细胞和空载细胞核大,核仁突出,核膜有皱缩,细胞器不发达,线粒体少,形状不规则,少见粗面内质网,可见大量的游离核糖体.而 Anti-7901 细胞器发达,线粒体丰富,形态较为成熟,并可见髓鞘样变,胞质内出现空泡样结构,高尔基体较发达,内质网扩张,核偏向一侧,极性增强.

**2.3 细胞内 pH 的测定** 以横坐标为 pH 值,纵坐标为发射荧光比值(FIR),求出标准曲线,回归方程: $y = 0.2144x - 0.4248$  ( $r = 0.96$ ),根据标准曲线求出的 Anti-7901 细胞胞内 pH 值为  $6.77 \pm 0.05$ ,而 Zeo-7901 细胞和空白对照组 SGC-7901 细胞内 pH 值分别为  $7.24 \pm 0.03$  和  $7.26 \pm 0.03$ ,统计学分析有显著差异 ( $P < 0.01$ ).

**2.4 细胞周期及细胞凋亡检测** 流式细胞仪检测显示, Anti-7901 细胞凋亡率为 26.1%,显著高于 Zeo-7901 细胞和空白对照组 SGC-7901 细胞凋亡率(5.12%, 4.48%,  $P < 0.01$ ). Anti-7901 细胞增生指数为 40.43%,低于 Zeo-7901 细胞和空白对照组 SGC-7901 细胞增生指数(45.48%, 44.86%),但无统计学差异. Anti-7901 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞较 Zeo-7901 细胞和 SGC-7901 轻度增加, S 和 G<sub>2</sub>M 期细胞轻度减少.

**2.5 生长曲线** 生长曲线显示, Anti-7901 细胞较 Zeo-7901 细胞及空白对照组 SGC-7901 细胞在增生速度上明显减慢.在倒置显微镜下观察发现 Anti-7901 细胞有明显的接触抑制现象,细胞失去重叠生长的能力,且易发生脱落,而 Zeo-7901 细胞和空白对照组 SGC-7901 细胞则重叠生长显著,细胞丧失接触抑制.

**2.6 软琼脂克隆形成率** 软琼脂中培养, 2 wk 左右可见空白对照组 SGC-7901 细胞和 Zeo-7901 细胞成簇生长,且集落大,数目增多,形成率分别为  $38.6 \pm 4.63\%$ 、 $40 \pm 4.53\%$ ,而 Anti-7901 细胞在软琼脂中可见散在的细胞,形成集落少,形成率为  $9 \pm 3.54\%$ ,显著少于 SGC-7901 细胞和 Zeo-7901 细胞 ( $P < 0.01$ ).

**2.7 裸鼠体内致瘤性分析** 在接种细胞约  $4 \times 10^6$  个/只裸鼠的情况下, 6 wk 后接种 Zeo-7901 细胞和空白对照组 SGC-7901 细胞的 3 只裸鼠右下侧皮下长出肿瘤,成瘤率为 100%,而接种 Anti-7901 细胞的 3 只裸鼠右上侧皮下未长出肿瘤,成瘤率为 0%.移植瘤 HE 染色,细胞胞体大小不一,胞质少,核大小不一,核浆比增大,核分裂相多,异型性大,出现较多巨核细胞和多核巨细胞.

### 3 讨论

胃癌是严重危害人类健康最常见的恶性肿瘤之一,其死

亡率在我国居恶性肿瘤的首位.和其他恶性肿瘤一样,原癌基因的激活、抑癌基因的突变是胃癌形成的重要分子基础之一,但胃癌的基因异常大多缺乏特异性,因此胃癌发生的分子机制仍然模糊不清<sup>[6]</sup>.近年研究发现,细胞凋亡异常在肿瘤发生发展过程中具有重要的意义,胃黏膜癌变过程中不仅存在细胞过度增生,同时存在细胞凋亡异常,细胞凋亡与细胞增生平衡失调在胃癌发生中具有重要意义<sup>[7-8]</sup>.对肿瘤的治疗可以通过诱导肿瘤细胞凋亡,而不单是抑制肿瘤的增生来实现.

自 1989 年 Sardet 实验室成功克隆人类 NHE1 cDNA 以来<sup>[9]</sup>,人们已知 NHE 有 8 个亚型,分别命名为 NHE1-8,他们在结构上相似,功能上相关,共同构成膜交换蛋白的一个基因家族<sup>[10-13]</sup>.NHE1 主要存在于人类的所有组织中,是一种管家基因,定位于 1P<sup>35-36</sup> 座位上, mRNA 为 3.8 kb.人类 NHE1 基因由 12 个外显子和 11 个内含子组成, cDNA 全长为 5 kb,开放阅读框长 2 445 bp<sup>[14]</sup>.我们前期研究发现<sup>[4]</sup>, NHE1 基因表达在胃癌中显著增加,与胃癌的发生有着密切的关系.为进一步了解 NHE1 基因在胃癌细胞中的作用,探讨通过使细胞内酸化来诱导肿瘤细胞凋亡从而治疗胃癌的新方法,我们利用基因转染技术,构建 NHE1 反义真核表达载体,将 NHE1 反义基因转染入 SGC-7901 胃癌细胞,研究 NHE1 反义基因对 SGC-7901 胃癌细胞生物学行为的影响.

在实验中我们成功构建了 NHE1 反义基因哺乳动物真核表达质粒,并成功转染 SGC-7901 胃癌细胞.首次发现转染 NHE1 反义基因后, SGC-7901 胃癌细胞细胞器发生数量和形态学方面的变化,胃癌细胞形态恶性程度降低.转染 NHE1 反义基因后, SGC-7901 胃癌细胞生长速度明显减慢,出现接触抑制,呈单层生长,增生指数降低,细胞凋亡增加,细胞周期左移,在软琼脂培养其中的生长能力降低,裸鼠体内致瘤能力显著降低.提示 NHE1 反义基因对 SGC-7901 胃癌细胞的恶性行为有明显抑制作用. NHE1 基因在胃癌中表达增加,形成细胞内碱外酸的微环境,可能是胃癌细胞增生、逃避凋亡的主要机制之一.

NHE1 基因的超表达对癌细胞的 pH<sub>i</sub> 调节发挥重要作用,癌细胞通过增加胞膜上 NHE1 的数量分布,从而加强 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> 交换,是其 pH<sub>i</sub> 调节的主要分子机制和特点,对维持其 pH<sub>i</sub> 稳定及恶性生长具有重要的生物学意义<sup>[15]</sup>.由于 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> 交换依赖于 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶供能,这一耗能过程又反馈地刺激癌细胞对糖的摄取和对糖酵解的依赖,胞内 H<sup>+</sup> 不断增多,从而使肿瘤细胞进行强大的 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> 交换,将大部分 H<sup>+</sup> 泵出细胞外,形成肿瘤细胞组织间液的酸性环境,保持肿瘤细胞内 pH 为中性或偏碱性,从而使肿瘤细胞免遭凋亡.我们通过转染 NHE1 反义基因成功抑制了 SGC-7901 胃癌细胞的 NHE1 基因表达,使胃癌 SGC-7901 细胞内酸化,其 Anti-7901 细胞 pH<sub>i</sub> 值较 SGC-7901 胃癌细胞、Zeo-7901 细胞明显降低. NHE1 基因表达受限的胃癌细胞增生受抑,凋亡率增加,细胞恶性程度降低,裸鼠体内致瘤能力显著降低.表明转染的人 NHE1 反义基因

成功抑制了 $\text{Na}^+-\text{H}^+$ 交换,破坏了胃癌细胞的能量代谢模式,达到了有效治疗胃癌的目的.我们的结果证实了通过使细胞内酸化诱导细胞凋亡从而治疗胃癌的可行性,为胃癌基因治疗提供了新的思路.

#### 4 参考文献

- 1 Slepko E, Fliegel L. Structure and function of the NHE1 isoform of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Biochem Cell Biol* 2002;80:499-508
- 2 黄桂君, 厉为良, 钱桂生. 人肺癌组织细胞 NHE1 mRNA 表达及其意义的研究. *激光杂志* 2000;21:60-61
- 3 Lagana A, Vadnais J, Le PU, Nguyen TN, Laprade R, Nabi IR, Noel J. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger NHE1. *J Cell Science* 2000;113(Pt 20):3649-3662
- 4 滕小春, 刘海峰, 刘永生, 段丽, 王国安, 何俊堂. NHE1 蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达及临床意义. *第三军医大学学报* 2004;26:402-404
- 5 吴国明, 厉为良, 黄桂君, 钱桂生. 双甲基氨氯吡啶抑制人肺癌细胞株  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换泵-1 活性诱导肿瘤细胞酸化和凋亡. *第三军医大学学报* 1998;12:476-479
- 6 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 门荣甫. bcl-2 蛋白在胃癌组织中的表达及意义. *肿瘤防治研究* 1997;24:269-271
- 7 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃黏膜癌前病变 Hp 感染与 bax 蛋白表达及细胞凋亡的关系. *第三军医大学学报* 2001;23:1015-1017
- 8 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃癌及其癌前病变中细胞凋亡与细胞增生间关系的研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:649-651
- 9 Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J. Growth factors induce phosphorylation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science* 1990;247:723-726
- 10 Pedersen SF, King SA, Rigor RR, Zhuang Z, Warren JM, Cala PM. Molecular cloning of NHE1 from winter flounder RBCs: activation by osmotic shrinkage, cAMP, and calyculin A. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:1561-1576
- 11 Behne MJ, Meyer JW, Hanson KM, Barry NP, Murata S, Crumrine D, Clegg RW, Gratton E, Holleran WM, Elias PM, Mauro TM. NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging. *J Biol Chem* 2002;277:47399-47406
- 12 Szaszi K, Paulsen A, Szabo EZ, Numata M, Grinstein S, Orłowski J. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of the neuron-specific  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger NHE5 isoform, Regulation by phosphatidylinositol 3'-kinase and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2002;277:42623-42632
- 13 Goyal S, Vanden Heuvel G, Aronson PS. Renal expression of novel  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger isoform NHE8. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:467-473
- 14 Putney LK, Denker SP, Barber DL. The changing face of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, NHE1: Structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:527-552
- 15 McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:676-688

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

• 研究快报 •

## 理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠血液黏附分子 CD44、CD54 的影响

范恒, 邱明义, 卢菲菲, 梅家俊, 沈关心, 刘松林

范恒, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合湖北省武汉市 430022

邱明义, 梅家俊, 刘松林, 湖北中医学院 湖北省武汉市 430061

卢菲菲, 武汉市第一医院 湖北省武汉市 430020

沈关心, 华中科技大学同济医学院 湖北省武汉市 430022

湖北省教委资助项目, No. 99Z014

项目负责人: 邱明义, 430061, 湖北省武汉市, 湖北中医学院. fanheng001@hotmail.com

电话: 027-62083591

收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-17

### 摘要

**目的:** 观察理肠四方对溃疡性结肠炎(UC)大鼠血液黏附分子 CD44、CD54 的影响, 比较四方疗效大小, 并分析其作用机制。

**方法:** 应用 2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立 UC 大鼠模型, 将 98 健康 SD 大鼠(雌雄各半), 按雌雄随机分 7 组, 分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓

白术散组、痛泻要方组、柳氮磺胺吡啶(SASP)组、模型组和正常组, 分别观察治疗后大鼠血液黏附分子 CD44、CD54 的变化, 并进行统计学比较。

**结果:** 造模后血液黏附分子 CD44、CD54 升高(模型组 vs 正常组  $q = 4.78, 5.32, P < 0.01$ ), 而乌梅丸组比模型组下降(乌梅丸组 vs 模型组,  $q = 4.63, 5.43, P < 0.01$ ), 其余各组比模型组下降, 但不一定都有显著差异(表 1), 除乌梅丸外, 理肠四方之间比较无明显差异( $P > 0.05$ )。

**结论:** 理肠四方经两两比较后, 乌梅丸疗效最好, 他们可能均有下调血液黏附分子 CD44、CD54 的作用, 从而使溃疡性结肠炎大鼠免疫功能恢复正常, 达到治疗的目的。

范恒, 邱明义, 卢菲菲, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠血液黏附分子 CD44、CD54 的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(3):397-400  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/397.asp>