靶向于胰岛素样生长因子受体的基因导入系统

任常春　田培坤　曲淑敏　姚　明　顾健人
上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室　上海　200000

恶性肿瘤、心血管疾病、心脏疾病已成为现代人健康三大“杀手”，而肝癌在我国属高发而死亡率最高的恶性肿瘤之一。临床治疗除小肝癌外，疗效较差。而手术治疗后，复发与转移率亦较高。免疫治疗与其他生物治疗刚刚起步。恶性肿瘤本质上是一种细胞异常生长和分化的疾病，癌基因的激活和抑癌基因的失活，导致细胞分化受阻和分裂增殖，最后导致恶性肿瘤。因此基因治疗作为一种新的生物治疗方法，用于肝癌具有重要的现实意义，它将有可能成为其他疗法的重要补充。

目前基因治疗亟待解决的关键问题有三：一是有效的治疗基因太少，这有待于基因组计划的成功，寻找到更多的有效的目的基因；二是基因导入系统的效率太低，无靶向性；三是导入基因难以调控。但对于恶性肿瘤的基因治疗最为首要的问题是没有高效的靶向性的基因导入系统。病毒型载体中逆转录病毒安全性较好，但体内导入率极低且无靶向性[1] 腺病毒不但体内导入率低，无靶向性，并有引起体液免疫反应的潜在危险[2]。非病毒型载体脂质体局部注射肿瘤的效率仍不高[3]，也无靶向性。裸 DNA 体内导入率低且无靶向性。因此建立一种靶向于肿瘤的高效导入系统对于恶性肿瘤的基因治疗具有重要意义。

受体介导的基因转移利用细胞表面的受体特异性识别相应配体并将其内吞的机理，将与配体结合的外源 DNA 靶向地转移至特定类型的细胞。 Wu 等利用去唾液酸糖蛋白（Asialoglycoprotein，ASG）或转铁蛋白（Transferrin，TF）与多聚赖氨酸形成复合多肽成功地将外源基因导入体外培养的肝细胞[4,5]。该系统存在的一个问题是被细胞内吞的复合体可能在体内溶酶体系统中被降解。氯喹可改变溶酶体的 pH 值而抑制其酶活性[6]，但不适用于体内导入。腺病毒与流感病毒的部分功能域可使内吞小泡释放其内吞物，从而辅助外源基因逃逸溶酶体的降解[7]。本实验室首次组建了一个复合多肽系统，包括一段辨认特定细胞受体的寡肽——配体寡肽（Ligand oligopeptide，LOP），多聚阳离子多肽（Polycationic polypeptide，PCP）及内吞小泡释放寡肽（Endosome releasing oligopeptide EROP），三者以 LOP－PCP－EROP 或 LOP－PCP，PCP－EROP 的形式与外源基因质粒 DNA 形成复合物，构成一种新型的，以肿瘤细胞表面受体为靶向的基因导入系统。

根据胰岛素样生长因子Ⅰ号及Ⅱ号受体（IGFⅠR，IGFⅡR）在人原发性肝癌中过量表达[8]，我们设计并合成了针对 IGFⅠR及 IGFⅡR 的 14 肽 E5，同时合成了流感病毒血凝素功能域 20 肽 HA20作为内吞小体释放寡肽 EROP，将它们分别与多聚阳离子多肽 PCP－多聚赖氨酸 PL 共价连接，通过静电效应与 DNA 形成受体介导的靶向性非病毒型基因导入系统，即 E5－PCP，PCP－HA20 ，以下简称 E5 基因导入系统。体外细胞实验与荷人瘤裸小鼠体内实验证明 E5 导入系统可高效地将外源基因导入人肝癌中并得到预期表达。应用此系统将细胞周期素依赖的蛋白激酶抑制物基因 p15，p16，p21 导入肝癌细胞 SMMC 7721，明显抑制肝癌细胞生长。体内将 p21 导入荷人肝癌细胞 SMMC 7721 瘤裸小鼠，能显著抑制裸小鼠皮下肿瘤的生长。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

材料与方法

一、基因导入系统的设计与合成

1. E5, HA20 的设计与合成　根据配体与受体相互结合的机理，采用电脑图像模拟设计了与 IGF Ⅰ R, IGF Ⅱ R 结合的一系列寡肽。用 HBI 公司的多肽合成仪(Applied Biosystems 430 A Peptide Sunthesizer) 按其多肽合成操作手册进行合成。经功能筛选，得到能与 IGF Ⅰ R, IGF Ⅱ R结合的有效寡肽 E5(EPFRSPDLALETYG)。HA20(GLFEIAEFIEGGWEGLIEG)，为一内吞小体释放寡肽，根据流感病毒外膜血凝素 N－端氨基酸同源的病毒外膜相关蛋白功能域设计并合成。所有合成多肽均用 ABI 公司的 C8 反相柱(10mm×250mm)通过高效液相层析纯化。

2. E5－PCP, HA20－PCP 的合成

(1)多肽—PDP 制备：PCP 即 PL(分子量 28 600, SIGMA), E5, HA20　均溶于 0.1 M PBS (pH 7.4), SPDP[N－succinimidyl 3－　(2－pyridyldithio)propionate, SIGMA]20 mM　溶于无水乙醇。PCP, E5, HA20 分别以摩尔数比 1:2, 1:8, 1:10　在 25℃，反应 60 min，反应产物分别置 MWCO 500 透析袋(SPECTRUM®)中，用 Milli－Q 水透析至无游离 SPDP，冷冻干燥，重溶于 0 1 M PBS(pH＝7.4 即得 PCP－PDP, E6－PDPHA20－PDP。

(2)PCP－SH 制备　在 PCP－PDP 中加入终浓度 25 mM 的 DTT(Dithiothreit, Boehriger Manheim), 37℃ 反应 30 min，反应产物置 MWCO 500 透析袋中，用 Milli－Q 水透析至无游离 DTT 冷冻干燥，重溶于 0.1 M PBS(pH＝7.4) 即得 PCP－SH。

(3)E5－PCP, HA20－PCP　制备　E5－PDP, HA20－PDP 分别与 PCP－SH 的摩尔数为 10:1, 37℃反应 24 h，反应产物分别上 Sephadex G50 柱(1.2cm×50cm)，收集第一峰，冷冻干燥，分别溶于 Milli－Q水中即得到 E5－PDP, HA20－PDP。

3. pSV－β－gal 质粒 DNA 的提取与纯化　按 QIAGEN 公司的质粒 DNA 提取与纯化 Kit 操作进行操作。

4. 基因导入系统（多肽./DNA 四元复合体)的制备

(1)E5－PCP, HA20－PCP 分别与 pSV－β－gal 质粒 DNA 结合的最佳配比：不同量的 E5－PCP, HA20－PCP 与一定量的 pSV－β－gal 质粒 DNA 混合，25℃ 30 min，取少量样品进行 1%琼脂糖凝胶电泳阻抑实验，观察 DNA 阻滞情况，确定共价连接物与质粒 DNA 完全结合的最佳配比。

(2)基因导入系统（多肽./DNA 四元复合体)的制备　根据 E5－PCP 与 HA20－PCP 与质粒 DNA 的最佳配比，将 E5－PCP 与 HA20－PCP 按相应质量数混合，再用最佳配比的 pSV－β－gal 质粒 DNA 与其混合，25℃ 30 min，取少量样品进行 1%琼脂糖凝胶电泳阻抑实验证实四元复合体的形成。

二、体外细胞实验

1. 细胞培养　SMMC 7721 人肝癌细胞株由上海第二军医大学培养建立，*L02* 正常肝细胞株由中科院细胞所提供，均培养在含 10%小牛血清的 DMEM(GIBCO)中。R02原代培养人正

常肝细胞，取人非肝癌正常组织（上医大中山医院肝癌研究所提供），按常规原代培养方法培养，培养液为含 20%胎牛血清的 DMEM(GIBCO)。

2.体外基因导入实验　培养细胞（SMMC 7721，L02)提前 24 h 消化，并接种于培养瓶(R02 原代培养人正常肝细胞培养至一定满度），第二天满度为 60% 左右，弃培养液，换含 2 μg/ml的 E5 四元复合体(E5－PCP/β－gal/HA20－PCP)的完全培养液，37℃，5% CO_2 培养转染过夜，更换新鲜完全培养液，继续培养 48 h，进行 β－半乳糖苷酶组织化学染色检测 β－gal 基因导入后的表达情况。

3.β－半乳糖苷酶组织化学染色[9]　细胞以 PBS(pH＝7.4)洗两遍，用固定液(2%甲醛，0.2%戊二醛溶于 PBS，pH＝7.4)，于 4℃固定 10 min，再用相同 PBS 洗两遍，加入适量 X－gal (Boeherigerll Manheim)组织化学反应液(5 mM 铁氰化钾，5 mM 亚铁氰化钾，2 mM $MgCl_2$ 溶于 PBS，pH＝7.4，X－gal 终浓度为 1 mg/ml)，37℃过夜，在光学显微匀下观察细胞染上兰色的情况，按着色细胞百分数评估基因导入率。

4.体外有效实验　在培养瓶内将构建有目的的基因 p15，p16，p21 的真核表达载体 PCEI 及无目的基因的空载体 PCEP 质粒分别转染 SMMC 7721 肝癌细胞，24 h 后换液，48 h 消化接种于 24 孔板，隔天消化计数 1 次，共数 4 次，每个样本 3 孔，每孔计数 2次，取其平均值作生长曲线。另平行转染的细胞在转染后 72 h 抽提细胞 DNA 进行 Southern 杂交。

三、体内动物实验

1.动物准备　动物准备 5～6 周龄小鼠，皮下接种大小为 1.5 mm^3 ± 的 SMMC 7721 瘤块，当瘤长至直径约 0.5～1 cm 随机分组，开始给药。

2.E5 四元复合体的制备　pSV－β－gal 或 p21 plasmid DNA 20 μg 按上文方法与相应配比的 E5－PCP，HA20－PCP 混合，总体积缩小至 100 μl，为每只小鼠注射用量。

3.体内导入实验

实验分组：①pSV－β－gal；②E5 四元复合体。皮下瘤周注射裸小鼠后，在不同的时间牺牲裸小鼠(12 h，24 h，48 h，60 h，72 h，96 h)，迅速剥出瘤块，心、肝、肺、脾、肾，用 PBS(pH＝7.4)漂洗 3 次，4%多聚甲醛(溶于 PBS，pH＝7.4)固定 30 min，再用相同 PBS 漂洗 3 次，放入 X－gal 组织化学反应液（同上)，37℃过液，观察，拍照。

4.体内有效实验

实验分组：①E5－PCP，PCP－HA20；②E5－PCP/p21/PCP－HA20　。皮下瘤周注射，每星期 2 次，共注射 4 次，最后一次注射后 3 天牺牲裸小鼠，量瘤体大小，拍照，取其肿瘤块，称重、拍照。并取其心、肝、肺、脾、肾液氮速冻保存备用。肿瘤组织 DNA 按常规方法抽提，进行 Southern 杂交。

结　　果

一、基因导入系统(多肽/DNA 四元复合体)的制备

多肽—多聚赖氨酸共价连接物与 DNA 在低离子强度，接近中性 pH 值条件下，通过静电作用形成复合体，1%琼脂糖凝胶电泳阻抑实验可证实复合体的形成。共价连接物 E5－PCP

与 β－gal 的最佳质量数比为 1∶1.5，HA20－PCP 与 β－gal 的最佳质量数比为 1∶1。

二、体外细胞实验

1. 不同方式导入 β－gal 基因

实验分组如下：①PBS 组（PBS）；②pSV－β－gal 组（β－gal）；③二元复合体（PCP/β－gal）；④三元复合体（E5－PCP/β－gal）；⑤三元复合体（HA20－PCP/β－gal）；⑥四元复合体（E5－PCP/β－gal/HA20－PCP），结果见表 1，单纯 β－gal 不能导入，三元复合体 E5－PCP/β－gal 导入率 10%，二元复合体与三元复合体 HA20－PCP/β－gal 仅有 0.1%～0.2%的导入，而四元复合体导入率达 60%。

表 1　不同方式导入 β－gal 基因的导入率

实验分组	PBS	β－gal	PCP－β－gal	E5－PCP/β－gal	HA20－PCP/β－gal	E5－PCP/β－gal/HA20－PCP
β－gal 阳性细胞百分数（%）	0	0	0.1	10	0.2	60

2. E5 基因导入系统靶向性导入 β－gal 基因至肝癌细胞　β－半乳糖苷酶染色结果显示 E5 四元复合体对 SMMC 7721 肝癌细胞导入率达 60%，而对 L02 正常肝细胞与 R02 原代培养人正常肝细胞导入率仅 0%～1%，说明 E5 基因导入系统能高效、靶向地转移外源基因进入富于 IGFⅠR，IGFⅡR 的肝癌细胞，而 L02 正常肝细胞与 R02 原代培养人正常肝细胞由于该类受体表达低而导入率明显低于肝癌细胞。

3. 体外有效实验　生长曲线显示，与空载体 PCEP 转染组对照，3 种目的基因转染组细胞生长缓慢，到第 6 天曲线下降，说明细胞死亡速率大于细胞分裂速率，第 8 天生长抑制率分别为：p15，50%；p16，30%；p21，60%.

抽提转染后的细胞 DNA 进行 Southern 杂交，证实外源性 p15，p16，p21 是导入 SMMC 7721 肝癌细胞[10]。

三、体内动物实验

1. 体内导入实验　皮下瘤周注射荷人肝癌 SMMC 7721 裸小鼠 24 h 后，对照组 pSV－β－gal（A），实验组 E5 四元复合体（B）的 X－gal 染色肿瘤巨体标本，证实 pSV－β－gal 对照组没有 β－gal 基因的表达，而 E5 四元复合体实验组有 β－gal 基因的表达，肿瘤组织块被染成蓝色。

E5 基因导入系统导入 β－gal 基因后 12 h，即有少量 β－半乳糖苷酶表达，24 h 达高峰（染色后 4 h 就观察到整个肿瘤组织块被染成蓝色），48 h 表达开始下降，一直持续至 96 h 仍有表达，而其他脏器（心、肝、肺、脾、肾）没有表达。

2. 体内有效实验　体内有效实验结果显示，实验组肿瘤明显小于对照组，根据其重量（W）与体积（V）计算，抑瘤率分别为 76.1%%（W），75.3%（V）。统计学处理（t 检验）$P<0.05$，认为有显著性（表 2）。

表 2 体内有效实验结果

分 组	观察项目	
	肿瘤体积 $\bar{V}(cm^3)$	肿瘤重量 $\bar{W}(g)$
E5－PCP,PCP－HA20	0 85±0.05	0.23±0.006
E5－PCP/p21/PCP－HA20	0.21±0.06	0.055±0.02
抑瘤率	75%	76.1%
P 值	<0.05	<0.02

抽提肿瘤块组织 DNA ,进行 Southern 杂交,结果表明 E5－PCP,PCP－HA20 转染组仅一条内源性 p21 杂交带,而 E5－PCP/p21/PCP－HA20 转染组除内源性杂交带外，另有一条外源性杂交带，证实外源性 p21 基因已导入肝癌组织细胞。

讨 论

E5为 IGFⅡ中的一个片断，具有辨认与结合细胞表面相应受体的功能，能携带外源基因进入细胞，因此具有对富有 IGFⅡR 或 IGFⅠR 的细胞的靶向性，同时流感病毒血凝素功能域寡肽 HA20可防止复合体内吞后 DNA 的降解，从而明显提高外源基因的表达。 PCP与外源基因质粒 DNA通过正负电荷结合形成静电复合体，在正常人体 pH范围(7.0～8.0),该复合体是稳定的,并可在 4℃保存 3 个月不解离。LOP,PCP,EROP 形成的复合多肽可能以 LOP－PCP－EROP存在,也可能以 LOP－PCP,PCP－EROP 的形式存在,实验证明,以上 3种元件缺一不可,单独 PCP,或单独 LOP－PCP,PCP－EROP 与 DNA 形成的复合物，肝癌细胞导入率极低(表 1),说明只有 3种元件构成的基因导入系统才具有高效率与靶向性。该载体系统对外源基因质粒 DNA 的大小无限制，还可同时导入两种不同的外源基因。

虽然 E5导入系统是针对富于 IGFⅡR 或 IGFⅠR 的肝癌细胞，但生长因子受体表达并不仅限于肝癌或其他肿瘤细胞，某些正常组织与介于正常与肿瘤之间的组织也会有生长因子受体的表达，因此，靶向性是相对的，而不是绝对的。我们选择细胞周期素依赖的蛋白激酶(CDK) 抑制物CKI)类基因 p21、p15、p16作为目的的基因，因为此类基因对正常细胞仅阻断于 G_0期，对癌细胞则诱导其凋亡[11]，还可能修复某些细胞的损伤，同时可能提高放疗与化疗的敏感性。应用 E5基因导入系统将 p21、p15、p16 导入人肝癌细胞 SMMC 7721,BEL 7402,肝母细胞瘤 Hep G_2，体外具有抑制细胞生长的作用，而对于肝细胞 L02,原代培养人正常肝细胞 R02则无作用。同时，我们观察到外源基因 p21诱导肝癌细胞凋亡[10]。p21 通过 E5 系统体内导入对裸小鼠移植的人肝癌 SMMC 7721皮下肿瘤，具有明显的抑制作用，抑瘤率达 76%.

E5载体系统将外源基因导入细胞的机理有待进一步实验研究，从受体结合，到内吞，以及怎样逃逸溶酶体的降解等，这部分工作已着手进行。根据目前的实验结果，高效的、靶向性的 E5基因导入系统与能抑制恶性肿瘤细胞生长，而不杀伤正常细胞的 CKI 基因 DNA 结合的系统，可能成为新的肝癌基因治疗方案，具有应用前景。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

参考文献

1 Mill AD, Law MF, Verma IM. Generation of helper－free amphotropic retroviruses that transduce a dominant－action, methotrexate－resistant dihydrofolate reductase gene. Molecular Cellular Biology, 1985;5:431

2 Mcdonald RJ, Lukason MI, Raobe OG, *et al* Safety of airway gene transfer with Ad2/CFTR2: Aersol administration in the nonhuman primate. Human Gene Therapy, 1997;8:411

3 Walther FJ. Uptake of antioxidants in surfactant liposomes is enhanced by SP－A. American J. Physiol, 1993;265:1330

4 Wu GY, Wu CH. Receptor－mediated in vitro transformation by a soluble DNA carrier system. J. Biol. Chem, 1987;262:4429

5 Wu CH. Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo. J. Bio Chem. 1989;264:19685

6 Cotton M. Langle RF. Kirlappos H. *et al*. Transferrin－polycation－mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. PNAS, 1990;87:4033

7 Midar P. Mendes C. Legrand A. *et al* Specific gene transfer mediated by lactotated poly－L－lysine into hepatoma cells. Nuc Aci Res, 1993;21:871

8 周筱梅，陈渊卿等．人胰岛素样生长因子受体及其生长因子在原发性肝癌中同时过量表达。肿瘤，1991;11:241

9 Xu. Pirollo KF Chang EH. Transferrin－liposome－mediate p53 sensitization squamous cell carcinoma of the head and neck to radiation in vitro. Human Gene Therapy, 1997;8:467

10 任常春，田培坤，田淑敏等．细胞周期素依赖的蛋白激酶抑制物诱导肝癌细胞凋亡。科学通报，1997;42(22):2428

11 Harper JW Elledge SJ. CDK inhibitors in development and cancer. Current Opinion in Genetics & Development, 1996;6:56

顺铂肾毒性的早期诊断

任 莉[1] 周清华[1] 邱 萌[1] 李 献[2] 易 成[1] 侯 梅[1]

1.华西医科大学附属第一医院肿瘤中心化疗科 成都 610041

2.华西医科大学附属第一医院肿瘤中心内科 成都 610041

顺铂(DDP)是治疗实体肿瘤最有效和最常用的药物之一，其疗效与用药剂量呈正比，但其剂量的增加却受顺铂肾毒性（发生率 28%～36%[1]）的限制。为了更好地发挥顺铂的抗肿瘤作用，对其肾毒性的早期诊断尤为重要。为此，我们对大剂量顺铂 100～120 mg/m^2)化疗后多项肾功能指标的动态变化进行观察，筛选出能早期诊断顺铂肾毒性的检测指标。现将结果报告如下：

对象与方法

一、观察对象

1998年3月至1999年4月我院肿瘤中心收治的恶性肿瘤患者48例，其中，男38例，女10例；年龄32～67岁，平均52.4岁；病种：肺癌32例，鼻咽癌4例，食管癌3例，乳腺癌、卵巢癌、软组织肉瘤和黑色素瘤各2例，骨肉瘤1例；Karnofsky评分＞80分；化疗前三大常规，血清尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)，以及尿 β_2－微球蛋白(β_2－MG)、α_1－微球蛋白(α_1－MG)、白蛋白(Alb)、转铁蛋白(TRF)、维生素 A_1 结合蛋白(RBP)、N－乙酰－β－氨基葡萄糖苷酶(NAG)和总氨基酸(TAA)等均正常。

二、方法

48例患者采用含DDP 100～120 mg/m^{2}的联合化疗方案。每例用两个周期。第1周期化疗结束时，上述各项检测指标未恢复正常者第2周期不纳入本实验。化疗第一天只用DDP，输液量2 000 ml/m^2；其他化疗药于第2天开始用，输液量1 200 ml/m^2·d。常规止吐，不用利尿剂、脱水剂、氨基糖苷类和头孢菌素类药物。

DDP用药前后第1、3、5、10、15及21天各采血2 ml，并收集DDP用药前和用药后第1～5天、10、15及21天的24 h尿。由我院内科实验室专人采样置于－20℃恒温培养箱中保存待测。

采用北京原子能研究所放免试剂盒，SN－68 z γ－计数仪测定尿 β_2－MG和 α_1－MG；福建太阳生物技术公司ELISA法试剂盒，BIDRAO 550酶标测试仪测定尿Alb、TRF、RBP、NAG和TAA；生化常规测定血清BUN和Cr。

各项指标化疗周期异常率的比较采用 χ^2 检验，两标本间均数的比较采用 t 检验。

结　果

1. 大剂量DDP化疗后尿的多项指标异常率动态观察（表1）。

表1　87个周期尿多项指标的异常率

时间(天)	尿异常率(%)						
	β_2－MG	α_1－MG	Alb	TRF	RBP	NAG	TAA
1	54.0(47)	36.8(32)	5.7(5)	9.2(8)	0(0)	1.1(1)	2.3(2)
2	64.4(56)	54.0(47)	10.3(9)	9.2(8)	2.3(2)	0(0)	5.7(5)
3	65 5(57)	58.6(51)	16.1(14)	13.8(12)	8.0(7)	4.6(4)	4.6(4)
4	59.8(52)	49.4(43)	11.5(10)	10.3(9)	5.7(5)	6.9(6)	5.7(5)
5	41.4(36)	39.1(34)	9.2(8)	9.2(8)	5.7(5)	2.3(2)	4.6(4)
10	28 7(25)	29.1(26)	9.2(8)	4.6(4)	1.1(1)	0(0)	1.1(1)
15	19.5(17)	16.1(14)	1.1(1)	2.3(2)	0(0)	0(0)	0(0)
21	9.2(8)	8.0(7)	2.3(2)	1.1(1)	0(0)	0(0)	0(0)

注：* 第1～5天的 β_2－MG和 α_1－MG异常率明显多于其他指标（$P<0.001$）。　* 括号内为异常周期数

2.大剂量 DDP 化疗后不同时间血清 BUN 和 Cr 的异常率与尿 β_2－MG 和 α_1－MG 的异常率比较（表 2）。

表 2 87 个周期血与尿指标的异常率比较

时间(天)	血清异常率(%)		尿异常率(%)		P 值
	BUN	Cr	β_2－MG	α_1－MG	
1	8.0(7)	4.6(4)	54.0(47)	36.8(32)	<0.001
2	－	－	64.7(56)	54.0(47)	
3	11.5(10)	8.0(7)	65.5(57)	58.6(51)	<0.001
4	－	－	59.8(52)	49.4(43)	
5	16.1(14)	9 2(8)	41.4(36)	39.1(34)	<0.001
10	25 3(22)	19 5(17)	28.7(25)	29 1(26)	>0.05
15	19.5(17)	13.8(12)	19.5(17)	16.1(14)	>0.05
21	6.9(6)	2.3(2)	9.2(8)	8.0(7)	>0.05

注：(1)P 值为尿 β_2－MG 及 α_1－MG 分别与血清 BUN、Cr 之间异常率比较所得。
(2) 括号内为异常周期数

3.将化疗早期尿 β_2－MG 或 α_1－MG 增高者分为甲乙两组，甲组为化疗后期（第 10 天或第 15 天）出现 BUN 或 Cr 异常者，余者为乙组。比较两组间 β_2－MG 和 α_1－MG 的差异（表 3）。

表 3 化疗早期尿 β_2－MG 和/或 α_1－MG 异常程度比较

项目	甲组(n=23)	乙组(n=36)	P 值
β_2－MG(ug/L)	467 5±74	192 4±32	<0.05
α_1－MG(mg/L)	25.4±4.2	8.28±3.6	<0.05

4.有 12 例患者在第一周期化疗中，尿 β_2－MG、α_1－MG 及血清 BUN 和 Cr 均异常增高，尽管在化疗后 21 天左右上述指标恢复正常，但第 2 周期化疗时，上述指标再度异常，且异常程度高于第一周期，甚至有 2 例出现血清 BUN、Cr 持续异常，以致后期化疗难以进行。

讨　论

DDP 的肾毒性为其主要毒副作用之一，表现为肾小管上皮细胞急性坏死、变性，间质水肿，肾小管扩张，严重时引起肾功能衰竭。肾损害的发生率和程度与 DDP 的剂量呈正相关，即肾毒性为 DDP 的剂量限制性毒性[2]。长期以来，临床上将血清肌酐、肌酐清除率和尿素氮作为 DDP 肾毒性的监测指标，但上述指标主要反映肾小球滤过功能，而 DDP 若损害肾小球影响滤过功能时，常提示肾功能损害已达到相当严重的程度[3~5]。血清肌酐、肌酐清除率和尿素

氮难以早期反映肾小管损害情况，从而可能延误治疗，造成严重的后果。因此，在加大 DDP 剂量以求提高疗效的同时，寻找更敏感、更特异的检测指标对 DDP 肾毒性进行早期诊断尤为重要。

β_2－MG和 α_1－MG 均为低分子蛋白，它们均可自由通过肾小球滤过膜，绝大部分在肾近曲小管重吸收和降解，故正常人尿中仅含极少量。当 DDP 损害肾小管重吸收功能时，尿中 β_2－MG或 α_1－MG可明显升高，并与肾小管损害程度呈正相关[5,6]。α_1－MG在尿中稳定，不受酸碱度影响，尤其在低 pH尿中亦稳定，此点优于 β_2－MG，后者在酸性尿中不稳定。故有学者主张在反映早期肾小管损害方面，首推 α_1－MG[6,7]。

本研究通过对 48例 87个周期大剂量 DDP 化疗患者的血清和尿的多项指标的动态观察，发现在 DDP化疗早期(d_{1-5})，大多数患者的尿 β_2－MG 和/或 α_1－MG增高，尤其在化疗后第3天最明显，增高率分别达 65.5% 和 58.6%，而此时血清 BUN和 Cr 及尿白蛋白等其他指标尚无明显变化。化疗早期 β_2－MG 和/或 α_1－MG 异常增高的 23个化疗周期的患者，在化疗后期(d_{10}或 d_{15})均出现血清 BUN、Cr 异常增高。这说明尿 β_2－MG 和 α_1－MG 能早期反映 DDP的肾功能损害，有利于临床上 DDP 肾毒性的早期诊治。

此外，本组 12例患者在化疗第一周期尿 β_2－MG、α_1－MG和血清 BUN、Cr 均异常增高，在化疗后 21天左右上述指标均恢复正常，但在第二周期化疗时，这些指标不仅再度异常增高，且异常程度高于第一周期，甚至有 2例患者表现为持续血清 BUN、Cr 异常，以致后期化疗难以继续进行。由此可见，尿 β_2－MG和 α_1－MG 能预测 DDP肾毒性的程度。若第一周期化疗中，尿 β_2－MG＞(467.5±74) μg/L 或 α_1＞(25.4±4.2) mg/L ，应及时调整 DDP 剂量或停药，以免第二周期肾毒性加重，对肾功能造成不可逆的损害。

综上所述，尿 β_2－MG和 α_1－MG 用于监测大剂量 DDP化疗所致的肾功能损害，有以下特点：①二者增高较其他指标出现时间早，灵敏度高；②化疗早期尿 β_2－MG 或 α_1－MG 异常增高者，其化疗后期多有血清 BUN、Cr异常；③当 β_2－MG＞(467.5±74) μg/L 或 α_1－MG＞(25.4±4.2) mg/L时有可能导致不可逆的肾功能损害。

由此可见，尿 β_2－MG和 α_1－MG 是两种较灵敏的监测顺铂肾毒性的指标，值得临床进一步观察应用。

参 考 文 献

1 张兴，吴光瑛，黄维丽等．顺铂的肾毒性及 β_2－MG测定在肾毒性监测中的应用．癌症，1992；11(6)：479

2 谢立平，C. Skrezek，H. Wand. 顺铂肾毒性早期发病机理的初步研究．实用肿瘤杂志，1996；11(6)：268

3 Kuhlmann MK，Burkhardt G，Kohler H. Insight into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and there clinical application [editorial]. Nephrol－Dial－Transplant，1997；12(12)：2478

4 丁大成，周际昌，贾莹莹等．顺铂肾毒性的临床多因素分析．中华肿瘤杂志，1992；14(1)：64

5 吴先明，曹建湘．μ_2微球蛋白测定对肾脏疾病肾功能的评价．现代内科医生，1998；3(4)：42

6 彭冬迪，李琮辉 α_1微球蛋白与肾脏早期损害临床荟萃，1997；12(3)：97

7 Hayashi M，Numaguchi M，Watabe H，*et al* Cisplatin induced nephrotoxicity and the protective effect of fosfomycin on it as demonstrated by using a crossover study of urinary matabolite levels. Acta－Obstet－Gynecol－Sand，1997；76(6)：590

黄曲霉毒素高暴露和体内 HPRT 基因突变频率升高

旷双远　王金兵　吴一迁　万曙光　朱源荣　钱耕荪
上海市肿瘤研究所化学致癌研究室　上海　200000
江苏启东肝癌防治研究所　启东　226200

前　言

动物实验已经证明黄曲霉毒素是强致肝癌化学物质。流行病和分子流行病资料揭示黄曲霉毒素和乙肝病毒具有协同致肝癌作用[1,2]。因此，黄曲霉毒素的监测是一项重要工作。目前，通过检测人尿液中黄曲霉毒素代谢物和血液黄曲霉毒素白蛋白加成物来估计人体黄曲霉毒素的摄入量和暴露量，这些生物标志物对确立黄曲霉毒素在人体肝癌病因和化学预防的研究中是很有价值的[3,4]。然而，它们只反映了数日内和短时间内黄曲霉毒素的暴露水平，不是反映黄曲霉毒素暴露的长期标志物，因此用于个体危险评估尚有局限性。 HPRT 基因突变频率是反映在受化学致癌物、致变物长期暴露后体内 DNA 损伤情况[5,6]。体外研究中，人淋巴细胞 HPRT 基因受黄曲霉毒素功击后外显子 3 的突变谱已经清楚，突变热点是外显子 3 上的 209 碱基所发生的 GC→TA 替换，发生频率在 17% 左右[7]。目前，关于人体内致癌物和基因突变频率的关系的研究报道不多。我们的研究主要是探讨人体内黄曲霉毒素暴露量和体内 HPRT 基因突变频率的关系。

材料和方法

一、T－淋巴细胞克隆测试(T cell clonal assay)[8]

1. 10 ml 全血被抽入 leukoprep 管后，立即离心分离出血浆、红细胞、白细胞。RPMI 培养液洗涤白细胞二次，离心、重悬、冷冻保存。

2. 快速融化冷冻细胞，细胞悬浮液滴加到 20 ml 含 20% NBS RPMI 1640 培养液中，洗涤离心后，细胞重悬，记数并稀释到 1×10 cells/ml，加入 PHA 到 lug/ml 浓度，孵育 36～40 h。离心和洗涤后，细胞接种到 96 孔板，非选择板接种量为 1,2,5 或 10 个细胞/孔。选择板量为 1 或 2×10^4 细胞/孔。生长培养液由 5%小牛血清，20% HL－1 培养液，25 mM HEPES，2 mM L－gluatmine，100 U/ml 青霉素，10 μg/ml 硫酸链霉素，适量 TCGF，IL－2 和 0.125 μg/ml PHA。选择孔 10^{-5}M 6－thioguanine(6－TG)，同时孔内含有 1×10^4 被照射过(8 krad) TK6 lymphoblastoid feeder cells，总体积为 0.2 ml。细胞孵育 10～14 d，在倒置显微镜下记录细胞数目。

二、AFB－ALBUMIN ADDUCTS 的放射免疫测定方法[9]

血清样品经 Amicon 公司的 Microcon－50 微量浓缩器高速离心过滤后，血清中白蛋白得

到纯化和浓缩。总蛋白量由 Bio－Rad 公司总蛋白测定试剂盒定量。白蛋白量由 Sigma 公司白蛋白试剂盒定量（溴甲酚紫染料结合法）。血清白蛋白经蛋白酶水解后，加入丙酮，离心去沉淀，挥干丙酮水，PBS缓冲液溶解残余物。进行放射免疫测定。

三、HPRT 基因突变频率的计算

突变频率＝选择克隆效率/非选择克隆效率

结果和讨论

结果见表 1：

90 人队列中，42 名男性有 3 名 HBsAg 阳性者；48 名女性有 6 名 HBsAg 阳性者。队列年龄从 40 岁到 65 岁，男性平均年龄为（50.9±7.3）岁，女性平均年龄为（49.6±6 3）岁。黄曲霉毒素白蛋白加成物平均值是 0.66 pmol AFBl/mg Albumin，范围在 0.27 到 1.19 pmol AFB/mg Albumin。血液学测试、血液化学测试、尿液分析和肝功能测试的结果表明参加者没有血液、肾脏、肝脏疾病。

以队列中 HPRT 突变频率中位值 27.4×10^{-6} 突变数/T 细胞为界线将突变频率值二分为高值和低值。又根据队列 AFB_1－ALBUMIN ADDUCTS 平均值 0.66 pmol AFB/mg albumin 为界线二分为高值和低值。

表 1 人体内黄曲霉毒素暴露和体内 HPRT 基因突变频率的关系

参数变量	突变频率（# of 突变数 每个细胞）						OR	95%CI
	≥27 4×10^{-6}（n=11）			<27 $4\times^{-6}$（n=23）				
	No	%	Mean±SE	No	%	Mean±SE		
			53±8			49±7		
年龄（岁）								
性别：								
女性	3	27%		9	39%		1 00	
男性	8	73%		14	61%		0 58	0 12.2 8
黄曲霉毒素								
（pmol afb/mg albumin）			0 70±0.12			0 41±0 19		
低值	1	10%		15	68%		1 00	
高值	9	90%		7	32%		19 3·	2 0.183
HBsAg								
阴性	10	91%		21	91%		1 00	
阳性	1	9%		2	9%		1 05	0 08,12 9
尿液白细胞（尿液分析）								
阴性	10	91%		21	91%		1 00	
阳性	1	9%		2	9%		1 05	0 08,12 9
克隆效率			2 0±1.0			6.0±5 0		
临床病理								
结果：								
SGPT（IU）			19 7±4.7			18.0±5 3	1 07	0 92,1 25
白细胞（#/mm^3）			6 000±1 486			5 313±1 154	1 00	0 99,1 00
血红蛋白（gm/dl）			141±13			139±17	1 00	0.96,1 06
血小板（千/mm^3）			100±22			113±37	0.99	0 96±1 01

需要全本请访问 www.ertongbook.com

从表 1 中可以看到在年龄、性别、HBsAg，尿液白血球、血液白细胞、SGPT、血红蛋白、血小板对 HPRT 基因突变频率高和低，均没有影响。但是，黄曲霉毒素高暴露组和低暴露组相比，以黄曲霉毒素低暴露组比值比 OR 为 1.00，则黄曲梅毒素高暴露组 HPRT 基因突变频率为低暴露组的 19.3倍（OR=19.3，95%Cl=2.0，183），具有统计学显著性差异（$P<0.05$）。这一结果表明黄曲霉毒素可以引起体内 DNA 损伤，HPRT 基因可以作为黄曲霉毒素长期暴露指标的替代物。

参 考 文 献

1 Linsell CA Incidence of hepato－carcinoma in relationship to aflatoxin intake. Archives of Toxicology Suppl, 1980;3:13

2 Decker RH, Kuhns MC. Epidemiology of primary liver cancer. Biochemical and Molecular Epidemiology of Cancer, 1986;227

3 Qian G, Ross RK, Yu MC, *et al*. A follow－up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shang hai, People's Republic of China. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 1994;3:3

4 Groopman JD, DeMatos P, Egner PA, *et al*. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin－N7－guanine and serum aflatoxin albumin adducts predicts chemoprotection by 1,2－dithiole－3－thione in rats. Carcinogenesis. 1992; 13(1):101

5 Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP. Somatic cell gene mutations in humans: biomarkers for genotoxicity. Enviromental Health Perspercive Supplements. 1993;101(suppl. 3):193

6 Cariello NF, Skopek TR. Analysis of mutations occurring at the human HPRT. J Mol Biol. 1993;9(9):322

7 Cariello NF, Cui L, Skopek TR. In vitro mutational spectrum of aflatoxin Bl in the human hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase gene. Cancer Research, 1994;54:4436

8 O'Neill JP. Mc Ginniss MJ, Berman JK, Sullivan LM, Nicklas JA, Albertini RJ. Refinement of a T－lymphocyte cloning assay to quantify the in vivo thioguanine－resistant mutant frequency in humans. Mutagenesis, 1987;2 (2):87

9 Wang J, Qian G, Zarba A, *et al*. Temproral patterns of aflatoxin－albumin adducts in hepatitis B surface antigen positive and negative residents of Daxin, Qidong County, People's Republic of China. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 1996;5:253

浅表性胃炎、胃粘膜不典型增生及胃癌组织中 COX－1、COX－2、INOS 表达的意义

罗玉琴[3] 赵一岭[1] 王文勇[1] 李玉松[1] 潘伯荣[2] 吴开春[2] 樊代明[2] 张学庸[2]
1.第四军医大学病理教研室 西安 710032
2.第四军医大学西京医院消化内科 西安 710032
3.解放军 222 医院消化内科 吉林 132011

前 言

流行病学研究表明，应用阿司匹林可降低胃肠道肿瘤的发病率。动物实验中非甾类抗炎药(NSAIDs）可抑制肿瘤的形成，使其发生数量明显减少，肿瘤体积缩小。 NSAIDs 抑制肿瘤的机理在于抑制它的靶分子环氧合酶－2(Cyclooxygenase－2,COS－2)的活性[1]，有学者提出 COX－2 与肿瘤的形成有关。这方面研究国内尚无报道。一氧化氮（NO）是新近发现的重要的信使分子，在机体多个系统、多种细胞中具有广泛的生理意义，还参与多种疾病的发生过程。NO在体内由 3 种一氧化氮同工酶(NOS)催化经 L－精氨酸－NO(L－Arg－NO)途径生成，3 种 NOS 包括内皮性 NOS(eNOS)、神经性 NOS(nNOS）和巨噬细胞性 NOS(mNOS）。一般认为 eNOS和 nNOS 是原生型，而 mNOS 是诱生型 (iNOS)[2]。iNOS 在静息状态下不表达，在病理状态下大量产生，继而产生大量 NO,NO 在慢性感染、炎症及致癌过程中起双重作用[3]，幽门螺杆菌(Helicobacter Pylori,Hp ）感染是胃癌发生的危险因素。有学者提出 Hp 感染与作为宿主部分免疫反应的反应氮类一氧化氮和过亚硝酸盐持续产物形成有关[4]。NO 还可通过结合到 COX－2 的活性位点上激活 COX－2，为了探讨 COX－2、iNOS 与胃癌的关系，我们对 COX－1,COX－2,iNOS在浅表性胃炎简称胃炎，胃粘膜不典型增生及胃癌中的表达进行了检测，同时对 Hp 的感染率进行了检测。

材料和方法

一、材料

第四军医大学病理科 1997－04/1997－12 连续性石蜡标本 92 例。胃炎标本 33 例年龄 26～73 岁，平均 50.4 岁，男 21 例，女 12 例，胃粘膜不典型增生标本 30 例(轻度 17 例，中度 7 例，重度 6 例)，年龄 30～70 岁，平均 55.3岁，男 22 例，女 8 例。胃癌标本 29 例(低分化 8 例，中分化 13 例，高分化 8 例)，年龄 34～74 岁，平均 56.2 岁，男 19 例，女 10 例。第四军医大学病理教研室明确 5－HT 染色阳性的小鼠小肠石蜡切片 12 张 COX－1,COX－2 多克隆抗体由西京医院消化内科吴开春教授惠增，iNOS 多克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司。

二、方法

采用常规 ABC 法。主要步骤：①切片常规脱蜡至水；②尿素消化 30 min；③10 ml/L 双氧

水封闭内源酶 30 min;④正常羊血清 37℃30 min;⑤滴加Ⅰ抗 4℃过液;⑥滴加生物素化羊抗兔 IgG(1∶100)37℃ 40 min;⑦滴加 ABC 复合物(1∶100)37℃ 40 min;⑧DAB 显色，苏木精衬染、脱水透明封片。设阴性对照（以 PBS 置换Ⅰ抗）以及阳性对照（明确 5－HT 染色阳性的小鼠小肠切片）;⑨光镜下观察与计算、每片观察相对染色较强、阳性细胞较多的一个 400 倍。视野，统计阳性细胞所占的百分率，综合阳性细胞所占面积比例及染色强度分为 1～Ⅳ级。

结　果

iNOS 主要表达在巨噬细胞、中性粒细胞等炎细胞中，平滑肌细胞、脂肪细胞、粘膜上皮细胞亦有表达，胞质显色，弥漫或颗粒状分布，COX－1 主要表达在胃粘膜上皮细胞，腺上皮细胞、壁细胞、炎细胞，胞质显色，弥漫性分布(表 1～5)。COX－2 主要表达在胃癌细胞中，血管平滑肌细胞、不典型增生腺上皮细胞（表 1～5）中有表达，胞质显色，弥漫性分布，极少量正常粘膜上皮细胞、炎细胞亦显色、但很弱。

表 1　胃粘膜炎症、不曲型增生及胃癌中 COX－1、COX－2、iNOS 阳性表达率(%)

组织分型	COX－1	COX－2	iNOS	Hp 阳性率
浅表性胃炎	45.5(15/33)	18 2(6/33)	18.2(6/33)	51 5(17/33)
不典型增生	56.2(17/30)	33.3(10/30)	36.1(11/30)	40.0(12/30)
胃癌	20.7(6/29)	65.5(19/29)b	62.1(18/29)b	3.5(1/29)b

b $P<0.01$ vs 浅表性胃炎

表 2　胃粘膜不同程度不典型增生 COX－1、COX－2 及 iNOS 的表达强度

不典型增生	n	COX－1				COX－2				iNOS			
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
轻	17	5	3			4	2			2	3	1	
中	7	1	4				2			1		1	
重	6	2	1	1		1	1			1	1	1	

表 3　不同分化程度胃癌 COX－1、COX－2 及 iNOS 的表达强度

分化程度	n	COX－1 阳性				COX－2 阳性				iNOS			
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
低	8	2				4	1	1		3	1		
中	13	2				5	1	1		3	4		
高	8			2		4	1	1		2	4	1	

表 4 COX-1 与 HP及 COX-2 与 iNOS的吻合率

病理组织类型	COX-1 与 HP	COX-2 与 iNOS
浅表性胃炎	+27.3%	+12.1%
浅表性胃炎	-27.3%	-69.7%
胃粘膜不典型增生	+30.0%	+23.3%
胃粘膜不典型增生	-30.0%	-50.0%
胃癌	+0.0%	+34.5%
胃癌	-75.9%	-6.9%

表 5 Hp感染患者的胃粘膜切片中 COX-1、COX-2、iNOS 阳性表达率

病理组织类型	COX-1	COX-2	iNOS
胃癌	0.0%	0.0%	100.0%
胃粘膜不典型增生	75.0%	8.3%	25.0%
浅表性胃炎	47.1%	29.4%	35.3%

讨论与结论

环氧合酶(COX)是一种膜结合蛋白,为前列腺素(PGs)合成过程中的一个重要的限速酶,可将花生四烯酸代谢为各种前列腺产物。维持机体的各种病理生理过程。

COX-1 存在于大多数细胞中，其功能是合成前列腺素（PGs）来调节细胞的正常生理活性，保持内环境稳定，对消化道粘膜起保护作用[5]。COX-1 被认为是“看家基因”,所编码[6]一般情况下酶的浓度保持稳定，但在激素或生长因子刺激下，酶浓度可增加 2～4倍。COX-2 被认为是迅速应答基因，静息状态下不表达，当细胞接受各种刺激（细胞因子、生长因子、癌基因及促肿瘤剂）后便可从头合成 COX-2 mRNA 很快增加，并在升高水平上维持 6～8 h,24 h 后降至基础水平，其升高可达 20～40 倍，几乎所有的细胞均存在 COX-2。COX-1、COX-2 启动子不同，提示各种激活物分子对两种酶表达的调节作用亦不一样。

一般认为原生型 NOS为 Ca^{2+} - 钙调素依赖性，当含有该酶的细胞受某些因素的刺激，如乙酰胆碱(内皮细胞)或谷氨酸盐(脑细胞),则引起胞内钙$^{2+}$浓度增加，激活 NOS 并以脉冲式少量释放 NO。原生型 NOS 主要存在于神经元和血管内皮细胞,参与机体防御／免疫功能,调节心血管功能和脏器血流，参与神经信息传递等。而 mNOS在静止的巨噬细胞中检测不到，许多致炎因子，如内毒素(LPS)和多种细胞因子如白介素 -1α(IL-1α)，肿瘤坏死因子 -β(TNF-β)和 γ-干扰素(IFN-γ)，可诱导巨噬细胞和平滑肌细胞等产生 iNOS,iNOS一旦被激活，酶活力持续时间很久,iNOS被激活 4～6 h,可生成大量的 NO,不需钙离子和钙调节蛋白参与。iNOS并非仅存在于巨噬细胞和平滑肌细胞中，实际上 iNOS很可能在所有组织中都产生。

本结果表明:①COX-1 在胃粘膜不典型增生的表达率高于胃炎、而在胃癌中的表达率低

于前两者（统计学无显著差异）。②COX－2、iNOS 在胃炎、胃粘膜不典型增生及胃癌中的表达呈平行性递增趋势，胃癌与胃炎中的表达有显著差异（$P<0.01$）。③胃炎、胃粘膜不典型增生中 Hp 感染率与胃癌中 Hp感染率有显著差异（$P<0.01$）。这与胃癌所致胃内 Hp生存环境改变有关。④COX－1、COX－2、iNOS每种酶于轻、中、重度胃粘膜不典型增生中的表达差异不显著。⑤COX－1、COX－2、iNOS 每种酶于不同分化程度的胃癌中的表达无明显规律。 ⑥胃炎、胃粘膜不典型增生有无 Hp 感染 COX－1 的表达无显著差异。但 Hp 阳性的不典型增生胃粘膜表达 COX－1 增强。⑦胃炎、胃粘膜不典型增生及胃癌中 COX－2 及 iNOS 同时表达率占各自表达率 50％以上。⑧胃炎 Hp 感染的切片中，COX－2、iNOS 表达率高于胃粘膜不典型增生及胃癌，分别为 29.4％，35.3％。

实验结果表明：①从胃炎→胃粘膜不典型增生 COX－1 表达率增加，COX1 的确参与看家活动，而在胃癌中表达率低于前者，说明 COX－1 维持机体的生理过程，保持内环境稳定的基本作用在胃癌中减弱。②COX－2、iNOS 于胃癌中表达明显上调，两种酶可能参与肿瘤的形成，可能为胃肠道肿瘤的形成的早期事件。③COX－2、iNOS 于胃炎、胃粘膜不曲型增生及胃癌中同时表达率占各自表达率 50％以上，说明两种酶的激活物质相类似。④胃炎伴 Hp 感染的切片中，COX－2、iNOS 的表达率占胃炎中两种酶表达率的 1/3。明显高于胃粘膜不典型增生及胃癌，如果 COX－2、iNOS 为胃肠道肿瘤形成的早期事件，则胃内炎症及 Hp 感染为胃癌的更早期事件，Hp 致癌的机理尚不明，但已知慢性 Hp 感染可能导致慢性萎缩性胃炎及胃粘膜处于高增生状态，细胞增殖即增加了 DNA 复制错误的机会，又增加了 DNA 发生突变的机会，这是 Hp 可能诱发癌变的机理之一，Hp 感染致炎症，产生大量的炎性因子，激活 COX－2、iNOS 这可能为诱发癌变的机理之二。

众多研究表明，COX－2 与肿瘤的发生、发展主要表现在以下几个方面：①COX－2 可能导致突变发生：丙二醛的产生：丙二醛在细菌和哺乳动物中是一内源性突变原，在鼠中可能为致癌物质，丙二醛来源有二[7]：一是环氧合酶通路的花生四烯酸代谢产生直接作用的突变原；二是脂质体的过氧化、环氧合酶依赖的致癌物质活化[7,8]。②COX－2 抑制凋亡发生，促进细胞粘附[9]。③COX－2 延长细胞周期 G_1 降低细胞周期蛋白 D_1 水平，细胞不能进行分裂期，而持续增殖（亦不发生凋亡），使细胞发生突变而异常并使异常细胞生存时间延长，更增加了发生第二次突变的机率[10]。④COX－2 使肿瘤侵润转移能力增强[11]。⑤COX－2 使免疫机制下降[12]。原生型 NOS 被激活后，NO 以脉冲式少量释放，维持稳定，大量 NO 系来自 iNOS。许多研究表明，NO 可以介导免疫细胞杀伤肿瘤细胞，同时在生物体内超量也可引起基因突变致癌。有关 NO 致突变性机理尚不清楚，目前有如下证据：①NO 诱导 DNA 碱基脱氨基后发生错误修复[13]。②体内黄嘌呤和次黄嘌呤极为不稳定，其半衰期过短，不能通过 DNA 切除修复系统进行损伤修复，造成 DNA 脱嘌呤和链断裂[14]。③NO 损伤 DNA 双链中嘌呤的芳香环重氮基，与另一条链嘌呤的游离氨基酸形成链内交叉联结，发挥细胞毒和致突变效应。 ④NO 诱导 GC→AT 转换突变[15]，炎症激活 MΦ 生成的 NO 及其衍生物在致癌多阶段中起重要作用。表现在以下几个方面：①活化的 MΦ介导亚硝基化反应，直接生成强致癌性的亚硝胺[16]。机理为 NOS 催化 L－Arg 生成 NO；NO 被氧化成 NO_2；NO_2 与 N_2O_3 及 N_2O_4 等氮氧化合物处于平衡状态，中性 pH 条件下，他们与胺类形成亚硝胺。②NO 促进内源性亚硝胺形成[17]。③内源性亚硝胺成为感染和炎症组织发生肿瘤的危险因素，Ohshima 等[18]建立了叙利亚地鼠 O. viverrini 感染模型，用特异性 iNOS 抗体的免疫组化显示，在肝吸虫侵袭肝胆管周围炎症区，

MΦ 和嗜酸性粒细胞胞浆的 iNOS活性较高，为肝吸虫感染能诱导 iNOS 高表达的假说提供了直接依据。

综上所述从理论上及实验结果分析得出炎症及 Hp 感染可诱导 COX－2、iNOS表达，这将促进肿瘤的发生－胃癌的发生。亦充分地解释了慢性感染成为某些肿瘤发生危险因素之一的原因。因此研究出更具有选择性 iNOS、COX－2 抑制剂、有效根除 COX－2、iNOS激活因子及 Hp，对肿瘤的防治，起重要的作用，这将给人类带来更大的社会效益和经济效益。

参 考 文 献

1 Ristimaki A, Honkanen N, Jankala. Expression of cyclooxygenase－2 in human Gastric carcinoma Cancer Res, 1997;57(4):1276

2 曲东明.一氧化氮及其合酶.国外医学生理、病理科学与临床分册，1997;17(3):270

3 藏梦维.一氧化氮的致突变性和致癌性.国外医学生理、病理科学与临床分册，1998;18(1):37

4 Mannick EE, Bravo LE, Zarama G. Inducible Nitric Oxide Synthase, Nitrotyrosine, and Apoptosis in Helicobacter Pylori Gastritis. Effet of Antibiotics and Antioxidants, 1996;56(15):3238

5 陈望忠.两种新的选择性还氧化酶－2抑制剂.国外医学药学分册，1997;24(3):168

6 殷明昭节.最近发现的环氧化酶同工酶对非甾体类抗炎药研究的影响.国外医学药学分册，1998;25(3):156

7 Marnett LT. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. Cancer Res, 1992;52(20):5575

8 Subbaramiah K, Zokim D, wersler BB, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. Proc Soc Exp Biol Med, 1997;216(2):201

9 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase－2 cell, 1995;83(3):493

10 Du Bois RN, Shao JY, Tsujii M, *et al*. G_1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase－2 Cancer Res, 1996;56(4):733

11 Tsujii M, Kawano S, Dubois RN. Cyclooygenase－2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential Proc Natl Acad Sci USA, 1997;94(7):3336

12 Tsujii M, Kawano s, Tsujii S, Cyclooxygenase regulates angiogenesis in duced by colon cancer cells. DDW－New Orleans, 1998;2376

13 LavaL F, Wink DA. Inhibition by nitric oxide of the repair protein, 06－methylguanine－DNA－methyltransferase Carcinogenesis, 1994;15(3):443

14 Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, *et al*. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. Proc Natl Acad Sci USA, 1992;89(7):3030

15 Thomas TS, Gannia UB, Thomasll T. Polyamine－induced B－DNA to Z－DNA Conformational Transition of a plasmid DNA with (dG－dc)n Insert. J Biol Chem, 1991;266(10):6137

16 Grisham MB, Ware K, Gilleland－HE Jr, *et al*. Neutrophil－mediatednitrosamine formation: role of nitric oxide in rats Gastroenterology, 1992;103(4):1260

17 Wu Y, Brouet I, Calmels S, *et al*. Increased endogenous N－nitrosamine and nitrateformation by caused by propionibacterium acnes and lipopolysaccharide administration. Carcinogenesis, 1993;14(1):7

18 Ohshima H, Bartsch H, Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat Res, 1994;305(2):253

需要全本请访问 www.ertongbook.com