

由 TGF $\beta$  诱导的胶原细胞中胶原蛋白的生成<sup>[15]</sup>, 丹参对胶原蛋白产生的抑制作用是否也与胶原基因启动子的竞争性结合有关, 值得进一步研究.

最近的研究证明, 丹参抗纤维化的有效成分之一的丹参酚酸 B 可通过干扰 TGF $\beta$ 1 在肝星状细胞胞质中的信号通路进而影响肝星状细胞的胶原生成<sup>[4, 14]</sup>, 和本研究中丹参影响成纤维细胞 TGF $\beta$ 1 的细胞核内信号转导的结果相结合, 可看到丹参抗纤维化作用的一些作用位点和机制, 为丹参的进一步临床应用和开发提供理论依据.

#### 4 参考文献

- 1 王晓玲, 刘平, 董普德, 谭英姿, 钱汝红, 胡旭东, 蒋文娟. 丹参对转化生长因子  $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 细胞表达 I 型胶原和 c-fos mRNA 的影响. 中西医结合肝病杂志 2001;11:19-20
- 2 王晓玲, 刘平, 刘成. 转化生长因子  $\beta$ , 对 I 型胶原基因转录的调节. 中西医结合肝病杂志 1998; 8(增刊):196-199
- 3 胡义扬, 刘平, 刘成, 顾宏图, 徐列明, 刘成海, 季光. 丹参提取物对 CCl<sub>4</sub> 和 DMN 诱导的大鼠肝纤维化的影响. 上海中医药杂志 1999;10:7-10
- 4 刘成海, 刘平, 胡义扬, 朱大元. 丹酚酸 B 盐对转化生长因子 - $\beta$ 1 刺激肝星状细胞活化与胞内信号转导的作用. 中华医学杂志 2002;82:1267-1272
- 5 余亚新, 杨汉青, 朱立专, 曹莉, 刘宗良, 朱礼尧, 张尔康, 田永明, 沈怀成, 滕士超. 大剂量丹参治疗肝纤维化的临床观察. 上海中医药杂志 1994;2:8-10
- 6 张灵芝, 赵元昌, 韩德五, 陈贤明, 许瑞龄, 尹镭, 马学惠. 丹参在抗肝细胞坏死中的钙拮抗作用. 中国病理生理杂志 1993;9:191-195
- 7 Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research* 1983;11:1475-1489
- 8 Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay MD, Philippe M, Sassy-Prigent C, Bariety J, Michel JB. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone. *Hypertension* 1995;26: 101-111
- 9 Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Anania FA, Mezey E. A transient increase in c-myc precedes the transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblast-like cells. *Liver* 1999; 19:135-144
- 10 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- 11 Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 1994;14:3810-3821
- 12 Jardine H, MacNee W, Donaldson K, Rahman I. Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1. *J Biol Chem* 2002;277: 21158-21166
- 13 Smart DE, Vincent KJ, Arthur MJ, Eickelberg O, Castellazzi M, Mann J, Mann DA. JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2001;276:24414-24421
- 14 王晓玲, 刘平, 谭英姿, 董普德, 蒋文娟. 丹参酚酸乙对转化生长因子  $\beta$ 1 刺激的大鼠肝星状细胞的观察. 中华肝病杂志 2001;6: 96-97
- 15 Meisler NT, Chiu JF, Cutroneo KR. Promoter competitors as novel antifibrotics that inhibit transforming growth factor- $\beta$ 1 induction of collagen and noncollagen protein synthesis in fibroblasts. *J Cell Biochem* 1999;75:196-205

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

郝悦, 周新民

郝悦, 武警海南总队医院消化内科 海南省海口市 570203  
周新民, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化内科 陕西省西安市 710033  
项目负责人: 郝悦, 570203, 海南省海口市文明东路 49, 武警海南总队医院消化内科. haikouhaoyue@hotmail.com  
电话: 0898-68284056 传真: 0898-65343033  
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-03-26

#### 摘要

目的: 探讨左旋精氨酸(L-arg)对大鼠肝脏缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用.

方法: 将 24 只 SD 大鼠随机分为对照组(n =12)和灌喂精氨酸组(n =12). 制备大鼠肝 I/R 损伤模型, 观察损伤后谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)和肝组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量变化及肝组织病理变化.

结果: L-arg 组: ALT、AST、LDH 明显下降 t 分别为 3.66,

14.28, 6.22 (P <0.01). MDA 含量明显降低(t =3.21, P <0.01), SOD 及 NO 活性明显升高(t =3.71, 8.93, P <0.01), 组织的病理改变也轻于对照组.

结论: 左旋精氨酸具有减轻肝 I/R 引起的肝功损害和脂质过氧化损害, 其机制可能与血清 NO 含量增加有关.

郝悦, 周新民. 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1636-1638

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1636.asp>

#### 0 引言

肝 I/R 损伤是临床上广泛关注的问题, 常见于许多临床病理过程和创伤外科疾病的肝脏手术过程, 如失血性休克, 肝切除和肝移植等. 肝 I/R 时, 肝脏组织细胞发生了一系列代谢、结构和功能的紊乱<sup>[1]</sup>. 本实验探讨精氨酸对大鼠肝 I/R 损伤的作用及影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD 大鼠 24 只, 体重 200-250 g, 由第四军医大学实验动物中心提供. MDA、SOD、NO 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, L-arg 为 Alexis 产品.

1.2 方法 随机将大鼠分为 2 组, 每组 12 只. 普通喂养, 饲料为大鼠标准饲料, 自由进饮进食. 肝 I/R 模型制备前 1 wk 对照组用生理盐水灌喂 1 mL/次, 2 次/d; L-arg 组: 70 g/L 的 L-arg 溶液 1 mL/次, 2 次/d 经口灌喂. 实验用 SD 大鼠术前禁食 12 h, 经腹腔注射氯胺酮 100 mg/kg 麻醉后, 上腹正中切口进腹, 分离肝脏周围诸韧带, 解剖肝门, 用小号无损伤动脉夹阻断左、中叶肝蒂, 90 min 后开放, 恢复被阻断肝叶血供, 建立部分肝 I/R 模型<sup>[2,3]</sup>. 血样检测: 两组大鼠于肝脏再灌注 2h 后经下腔脉留取 4-5 mL 血样, 离心(4 °C, 4 000 r/min, 10 min), 取部分上清液用日本柯达 250 型全自动生化分析仪测定 ALT、AST、LDH; 部分上清液置于 -70 °C 冰箱保存, 硝酸还原法测定 NO; 组织检测: 各组大鼠于肝脏再灌注 2h 后取部分肝组织制成匀浆, 保存于液氮中用相应试剂盒测定抗氧化酶活力及脂质过氧化产物, 操作均按试剂盒说明进行. 部分肝组织保存于含 100 mL/L 甲醛的金属沉淀液中用于 HE 染色, 光镜检查.

统计学处理 全部数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 均数间的比较采用 t 检验, 采用 SPSS 软件, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义.

## 2 结果

2.1 肝功能酶学的变化 肝缺血再灌注 120 min, L-arg 组血清 AST、ALT 及 LDH 明显低于对照组( $P < 0.01$ , 表 1), 提示 L-arg 组肝脏受到的损害较轻或功能恢复更快更好.

表 1 大鼠血清 ALT、AST、LDH 的变化( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

| 组别      | ALT(U/L)      | AST (U/L)       | LDH (U/L)         |
|---------|---------------|-----------------|-------------------|
| 对照组     | 532.9 ± 194.7 | 1 602.2 ± 279.7 | 7 173.2 ± 817.3   |
| L-arg 组 | 317.9 ± 58.5  | 385.9 ± 93.4    | 3 597.6 ± 1 812.5 |

$P < 0.01$  vs 对照组.

表 2 大鼠肝组织 MDA、SOD 及血清 NO 变化( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

| 组别      | MDA(μmol/g)  | SOD(U/g)       | NO(μmol/L)   |
|---------|--------------|----------------|--------------|
| 对照组     | 18.54 ± 3.48 | 127.79 ± 19.09 | 13.90 ± 2.69 |
| L-arg 组 | 11.14 ± 4.09 | 153.58 ± 14.70 | 29.66 ± 5.49 |

$P < 0.01$  vs 对照组.

2.2 抗氧化酶、脂质氧化产物及 NO 含量变化 肝缺血再灌注 120 min, L-arg 组肝组织的抗氧化酶活力较对照组明显升高( $P < 0.01$ ), 而相应的脂质过氧化产物明显减少( $P < 0.01$ ), 血清 NO 水平较对照组明显升高( $P < 0.01$ , 表 2).

2.3 病理组织学改变 光镜下结构: 对照组肝小叶结构紊乱, 肝血窦和中央静脉有程度不同的瘀血, 肝血窦变窄或消失, 内皮细胞及肝细胞普遍水肿变性, 大量的中性粒细胞附壁及小灶样坏死. L-arg 组肝小叶结构基本正常, 散在肝细胞肿胀变性, 少量粒细胞浸润.

## 3 讨论

近年研究表明, 肝微循环障碍是导致肝 I/R 损伤的病理基础<sup>[4]</sup>. 其机制是肝缺血时, 肝细胞 ATP 含量减少, 钙离子大量内流致肝细胞缺氧水肿, 肝细胞骨架结构受损, 肝血窦变窄<sup>[5]</sup>. 也有人认为氧自由基的大量释放是导致损伤后早期组织器官功能障碍的重要原因<sup>[6-9]</sup>. 本实验结果表明, 肝 I/R 损伤导致肝功能酶学发生变化, ALT、AST、LDH 明显升高, MDA 含量增高, 而 SOD 活力明显下降, 证明氧自由基的参与引发了肝组织的脂质过氧化损伤.

L-arg 作为 NO 合成的前体, 在一氧化氮合酶(NOS)的作用下生成 NO, 后者具有多种生物学功能, 扩张血管, 抑制血小板黏附<sup>[10-13]</sup>, 参与杀菌<sup>[14]</sup>等作用. 近年来认识到严重创伤及缺氧时导致肝细胞变性甚至坏死, 已证明 NO 是最主要的血管内皮舒张因子. 从理论上讲预先用 L-arg 补充 NO 生成的前体, 可使组织血管扩张<sup>[15,16]</sup>, 损伤后缺氧状况可以改善. 本实验证明了这一点, L-arg 组 I/R 损伤后血清 NO 及肝组织 SOD 含量明显升高, MDA 含量减少, 说明经口喂 L-arg 可增加肝组织局部 NO 合成, 改善局部血流灌注. 因此口喂 L-arg 具有减轻肝 I/R 所引起的脂质过氧化损害和保护肝细胞的作用.

## 4 参考文献

- Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM. Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 1998;10:182-191
- Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85:1936-1943
- 董满库, 崔彦, 周立艳, 施清华, 王强, 王平, 吉敏, 李晓鸥. 山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:82-84
- Kurokawa T, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1999;31:1775-1776
- Li XK, Matin AF, Suzuki H, Uno T, Yamaguchi T, Harada Y. Effect of protease inhibitor on ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation* 1993;56:1331-1336
- Yamaguchi Y, Matsumura F, Liang J, Okabe K, Ohshiro H, Ishihara K, Matusda T, Mori K, Ogawa M. Neutrophil elastase and oxygen radicals enhance monocyte chemoattractant protein-expression after ischemia/reperfusion in rat liver. *Transplantation* 1999;68:1459-1468
- Gasbrini A, pasini P, Nardo B, De Notariis S, Simoncini M, Cavallari A, Roda E, Bernardi M, Roda A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. *Free Radic Biol Med* 1998;24:211-216
- Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 1999;29:49-55

- 9 陈玺华, 鲍民生, 李正中. 大鼠肝缺血腺苷预处理的作用机制. 世界华人消化杂志 1999;7:298-299
- 10 Stoclet JC, Muller B, Andriantsitohaina R, Kleschyov A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc)* 1998;63:826-832
- 11 Endlich K, Muller C, Barthelmebs M, Helwig JJ. Role of shear stress in nitric oxide-dependent modulation of renal angiotensin II vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 1999;127:1929-1935
- 12 Olszanecki R, Chlopicki S. Endotoxaemia in rats: role of NO, PAF and TXA2 in pulmonary neutrophil sequestration and hyperlactataemia. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:443-454
- 13 Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Heliadis N, Herodotou A, Hatjopoulou E, Petridou E, Sarris K. The implication of nitric oxide in the process of bacterial translocation. *Int Surg* 2000;85:23-26
- 14 Fierro IM, Nascimento-DaSilva V, Arruda MA, Freitas MS, Plotkowski MC, Cunha FQ, Barja-Fidalgo C. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J Leukoc Biol* 1999;65:508-514
- 15 王万铁, 王卫, 徐正, 林丽娜, 李东. 肝缺血 - 再灌注损伤中脂质过氧化反应及左旋精氨酸的干预作用. 中国危重病急救医学 2003;15:91-93
- 16 朱永安, 张西洲, 哈振德, 张芳, 韩敏, 朱金山. 左旋精氨酸治疗高原肺水肿患者血流动力学观察. 中国急救医学 2002;22:217-218

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 端粒酶在大肠癌细胞中的活性表达及临床意义

鲁明良, 林富林, 郑国宝, 姜朝晖

鲁明良, 林富林, 姜朝晖, 中国人民解放军解放军第117中心医院肛肠科 浙江省杭州市 310013  
郑国宝, 浙江大学医学院肿瘤研究所 浙江省杭州市 310000  
项目负责人: 鲁明良, 310013, 浙江省杭州市灵隐路14号, 中国人民解放军解放军第117中心医院肛肠外科. lum1505@sohu.com  
电话: 0571-87348628  
收稿日期: 2003-01-15 接受日期: 2003-03-28

### 摘要

目的: 探讨端粒酶活性的改变在大肠癌发生发展过程中的作用以及端粒酶活性检测作为一种新的大肠癌临床诊断的生物学标志的可行性。

方法: 采用TRAP(telomeric repeat amplification protocol)结合聚酰胺凝胶电泳银染法检测46例配对大肠癌及癌旁组织, 4例大肠癌肝转移病灶组织内端粒酶的活性, 并用Southern-blot-ECL (enhanced chemiluminescence)法对上述标本内端粒酶平均长度进行检测。

结果: 肿瘤组内端粒酶活性明显高于对应癌旁组织, 在肿瘤组织内, 端粒酶的活性表达升高与大肠癌的病理学分期呈显著相关性( $P < 0.01$ ,  $t = 8.3477$ ), 而与肿瘤的大小、部位, 肿瘤的恶性程度、分级、浸润深度、CEA表达水平等无显著相关性, 与肿瘤组相比, 在肝转移病灶内, 端粒酶的活性表达无显著升高, 肿瘤组内的端粒酶平均长度明显大于对应的癌旁组织。端粒酶平均长度与大肠癌的病理学分期呈显著相关性。

结论: 端粒酶的活化及其长度的缩短可能成为早期检测大肠癌癌变的临床指标。

鲁明良, 林富林, 郑国宝, 姜朝晖. 端粒酶在大肠癌细胞中的活性表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1638-1640  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1638.asp>

### 0 引言

大肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均有上升趋势, 大肠癌的早期诊断尚缺乏有效的临床指标。近年来, 端粒酶在细胞衰老和癌变过程中的作用已受到人们的重视。研究者普遍认为, 端粒酶的激活是肿瘤形成过程中的关键步骤, 为了进一步明确端粒酶的激活与在大肠癌形成发展过程中的确切作用, 我们对46例配对大肠癌及癌旁组织, 4例大肠癌肝转移病灶组织内端粒酶的活性及端粒酶平均长度进行了检测。

### 1 材料和方法

1.1 材料 46例配对大肠癌及癌旁组织, 4例大肠癌肝转移病灶组织均取自2000-01/2000-12我院住院手术的患者。其中, 癌旁组织均取自肿瘤切除标本的远癌断端, 所有标本均于手术切除术后20 min内取材, 并迅速置 $-180^{\circ}\text{C}$ 液氮内冻存待用。

#### 1.2 方法

1.2.1 端粒酶活性检测 严格按端粒反复扩增法(telomeric amplification protocol)试剂盒说明书进行操作。(1)组织提取液的制备: 从液氮中取出冻存组织500 mg, 剪碎, 清洗, 离心, 弃上清, 组织匀浆器将组织制成匀浆, 加组织裂解液, 离心, 上清经蛋白定量后液氮中保存待用。(2)合成TS和CX引物,(3)建立TRAP反应体系(50  $\mu\text{L}$ ), 反应参数如下:引物延伸 $25^{\circ}\text{C}$  30 min, 端粒酶灭活 $94^{\circ}\text{C}$  5 min. 扩增: 变性 $94^{\circ}\text{C}$  30 s, 退火 $50^{\circ}\text{C}$  30 s, 延伸 $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 循环30次, 延伸 $72^{\circ}\text{C}$  10 s,  $4^{\circ}\text{C}$ 抑制。

1.2.2 聚丙烯凝胶电泳, 增强化学发光法(ECL)显影 取25  $\mu\text{L}$ 上述PCR产物, 于120 g/L非变性聚丙烯凝胶电