

提示 Pro/Pro 基因型是贲门腺癌的遗传易感因素.

4 参考文献

- 1 Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003;33:357-365
- 2 Schneider-Stock R, Mawrin C, Motsch C, Boltze C, Peters B, Hartig R, Buhtz P, Giers A, Rohrbeck A, Freigang B, Roessner A. Retention of the arginine allele in codon 72 of the p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *Am J Pathol* 2004;164:1233-1244
- 3 Shepherd T, Tolbert D, Benedetti J, Macdonald J, Stemmermann G, Wiest J, DeVoe G, Miller MA, Wang J, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. Alterations in exon 4 of the p53 gene in gastric

- carinoma. *Gastroenterology* 2000;118:1039-1044
- 4 张蕾, 邢德印, 何祖根, 林东昕. p53 基因第 72 位密码子多态与食管癌风险. *中华医学遗传学杂志* 2002;19:10-13
- 5 Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB, Chang-Claude J. Intron 3 16bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics* 2002;12:269-272
- 6 Vos M, Adams CH, Victor TC, van Helden PD. Polymorphisms and mutations found in regions flanking exons 5 to 8 of the TP53 gene in a population at high risk for esophageal cancer in South Africa. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140:23-30
- 7 Saranath D, Khan Z, Tandle AT, Dedhia P, Sharma B, Contractor R, Shrivastava S, Dinshaw K. HPV16/18 prevalence in cervical lesions/cancers and p53 genotypes in cervical cancer patients from India. *Gynecol Oncol* 2002;86:157-162

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

IκB 激酶在肝脏缺血再灌注中的作用

王磊, 窦科峰, 于丽萍, 王江

王磊, 中国人民解放军第五医院普外科 宁夏回族自治区银川市 750004
 窦科峰, 王江, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科
 陕西省西安市 710032
 于丽萍, 宁夏医学院第二附属医院内分泌科 宁夏回族自治区银川市 750001
 项目负责人: 王磊, 750004, 宁夏回族自治区银川市胜利南街, 中国人民解放军第五医院普外科. angley@ fmmu. edu. cn
 电话: 0951-4091131
 收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-21

王磊, 窦科峰, 于丽萍, 王江. IκB 激酶在肝脏缺血再灌注中的作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(8):1957-1959

<http://www.wjnet.com/1009-3079/12/1957.asp>

摘要

目的: 探讨 IκB 激酶(IKK)在肝脏缺血再灌注(HIR)中的作用.

方法: Wistar 大鼠随机分为对照组、缺血再灌注组(HIR 组)、PDTC 保护组(HIR+PDTC 组). HIR 组将肝左叶及肝中叶入肝血流阻断 60 min 后再灌注. 保护组先经阴茎背静脉注射 PDTC 120 mg/kg⁻¹ 后立即依 HIR 组致伤, 对照组仅显露肝中叶及肝左叶肝蒂, 不阻断, 自阴茎背静脉注射无菌生理盐水 1 mL. 分别采用原位杂交、EMSA、免疫组化及赖氏法检测再灌注后 1、6、12 h IκB 激酶表达、NF-κB 活性、TNF-α 的表达及血浆中 ALT 含量.

结果: 损伤后 IκB 激酶表达水平、NF-κB 结合活性、TNF-α 表达水平、血浆中 ALT 含量升高; HIR+PDTC 组与 HIR 组相比较, IκB 激酶表达水平、NF-κB 活性、TNF-α 表达水平、血浆 ALT 水平降低.

结论: HIR 后肝内 IκB 激酶可促进 NF-κB 的高水平激活引起肝内 TNF-α 等炎症相关细胞因子表达增强, 从而导致肝脏损伤. 干预 IKK-NF-κB 通路可能是防止 HIR 后急性肝脏损伤发生、发展的一个有效途径.

0 引言

肝脏缺血再灌注(hepatic ischemia reperfusion, HIR)是肝脏疾病和创伤中常见的病理过程. IκB 激酶(IKK)-β 是活化核因子(NF)-κB 关键的上游分子, 是 NF-κB 发挥基因转录调节功能的前提. NF-κB 是一种广泛存在的快反应转录因子, 可上调炎症因子的基因转录而引发炎症瀑布反应, 诱导肝脏损伤^[1-3]. 本实验通过制备动物 HIR 模型, 观察肝脏组织中 IKK-β 的表达、NF-κB 的活化情况以及肝脏组织中 NF-κB 的下游因子肿瘤坏死因子(TNF)-α 表达, 探讨 IKK-β 在 HIR 继发急性肝损伤(ALD)的病理机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物: ♂ Wistar 大鼠 54 只, 体质量 250-300 g, 由第四军医大学实验动物中心提供. 主要试剂: IκB 激酶原位杂交试剂盒(武汉博士德); NF-κB 的寡核苷酸结合序列(Promega): 5' -AGTTGAGGGGACTTTCCCA GGC-3'; 3' -T CAACTCCGCTGAAAGGCTCCG-5'.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 选择试验 Wistar 大鼠, 随机分为对照组、HIR 组和 HIR+PDTC 组. 每组 18 只. HIR 组经阴茎背静脉注射无菌生理盐水 1 mL 后用无损伤动脉夹阻断肝左叶及肝中叶入肝血流, 缺血时间为 1 h; HIR+PDTC 组

经阴茎背静脉注射吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC) 120 mg/kg⁻¹后立即依HIR组方法致伤;对照组仅显露肝中叶及肝左叶肝蒂,不阻断,阴茎背静脉注射无菌生理盐水 1 mL。分别于再灌注后 1, 6, 12 h 3 个时间点处死动物,取材(每时间点 6 只)。

1.2.2 肝脏组织中 IKK- β 及 TNF- α 的表达 原位杂交及免疫组化法行 IKK- β 、TNF- α 检测。

1.2.3 肝脏组织中 NF- κ B 的蛋白结合活性测定 提取核蛋白并用凝胶迁移电泳(EMSA)法测定 NF- κ B 活性^[4]。

1.2.4 血浆中 ALT 含量的测定 各时相动物活杀并于下腔静脉穿刺抽取血标本 2 mL,采用赖氏法行血浆 ALT 检测。

用 Leica Q 500Mc 图像分析仪进行半定量分析,以吸光度(A)来表示 IKK- β 、TNF- α 表达水平和 NF- κ B 相对活性高低。采用 SPSS 统计分析软件进行统计学分析。半定量资料比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为显著性标准。

2 结果

2.1 肝脏组织中 IKK- β 表达 HIR 损伤后 IKK- β mRNA 表达较对照组明显增加,可于再灌注后 6 h 达到高峰,应用 PDTC 预处理组 IKK- β mRNA 表达水平降低(表 1)。

表 1 各组动物肝组织 IKK- β mRNA 表达的变化(A, mean \pm SD)

组别	n	1 h	6 h	12 h
对照组	6	0.023 \pm 0.003	0.026 \pm 0.003	0.029 \pm 0.005
HIR 组	6	0.152 \pm 0.016 ^b	0.200 \pm 0.019 ^b	0.077 \pm 0.010 ^b
HIR+PDTC 组	6	0.118 \pm 0.010 ^{bd}	0.145 \pm 0.011 ^{bd}	0.050 \pm 0.008 ^{cd}

^b $P < 0.01$, ^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs HIR 组。

2.2 肝脏组织细胞中 NF- κ B 的活性 HIR 损伤后 NF- κ B 活性较对照组明显增加,可于再灌注后 6 h 达到高峰,应用 PDTC 预处理组 NF- κ B 活性明显减弱(表 2)。

表 2 HIR 后肝组织 NF- κ B 活性改变(A, mean \pm SD)

组别	n	1 h	6 h	12 h
对照组	6	0.08 \pm 0.03	0.04 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02
HIR 组	6	10.60 \pm 2.59 ^b	11.52 \pm 2.01 ^b	6.83 \pm 1.96 ^b
HIR+PDTC 组	6	3.49 \pm 0.96 ^a	7.15 \pm 3.37 ^a	2.52 \pm 0.64 ^a

^b $P < 0.001$ vs 对照组; ^a $P < 0.05$ vs HIR 组。

2.3 肝脏组织中 TNF- α 的表达 HIR 损伤后 TNF- α 基因表达明显高于对照组,于再灌注后 6 h 达到高峰,应用 PDTC 预处理能明显降低(表 3)。

2.4 血浆中 ALT 含量的变化 损伤后血浆中 ALT 含量较对照组明显增加,并于再灌注后 1 h 达到高峰,PDTC 预处理组血浆中 ALT 含量较 HIR 损伤组降低(表 4)。

表 3 HIR 后肝脏 TNF- α 的表达(A, mean \pm SD)

组别	n	1 h	6 h	12 h
对照组	6	2.13 \pm 1.24	2.42 \pm 0.84	1.73 \pm 1.41
HIR 组	6	17.8 \pm 1.77 ^b	20.87 \pm 3.4 ^b	16.10 \pm 2.58 ^b
HIR+PDTC 组	6	13.02 \pm 3.24 ^a	15.44 \pm 1.91 ^a	14.63 \pm 1.32

^b $P < 0.001$ vs 对照组; ^a $P < 0.05$ vs HIR 组。

表 4 肝脏缺血再灌注 HIR 后血浆中 ALT 含量变化(IU/L, mean \pm SD)

组别	n	1 h	6 h	12 h
对照组	6	47.00 \pm 7.60	52.02 \pm 4.96	48.56 \pm 13.07
HIR 组	6	256.13 \pm 26.66 ^b	244.25 \pm 30.14 ^b	205.98 \pm 69.96 ^b
HIR+PDTC 组	6	241.53 \pm 20.72	163.45 \pm 10.18 ^a	129.45 \pm 13.87 ^a

^b $P < 0.001$ vs 对照组; ^a $P < 0.05$ vs HIR 组。

2.5 组织形态学变化 光镜下与对照组比较,HIR 组肝脏缺血明显,肝细胞不同程度肿胀变性和空泡样变性,部分可见点状坏死及局灶性片状坏死,PDTC 处理组组织变性坏死减轻。

3 讨论

HIR 损伤仍然是肝脏部分切除及肝移植的严重制约之一,进一步探讨 HIR 损伤机制对肝移植及肝部分切除术后肝脏功能的保护具有特别重要意义。Omoya *et al*^[5]进行的肝细胞在经历氧化环境下 NF- κ B 活性研究表明氧自由基可使 I κ B 减少,核内 NF- κ B 活性增强。Yoshidome *et al*^[6]对大鼠部分肝缺血再灌注后肝内 NF- κ B 的活性变化进行研究,损伤后 NF- κ B 核转移并激活,于 4 h 达到高峰,IL-10 可抑制 NF- κ B 激活,从而减轻肝损伤。

我们制备大鼠 HIR 模型,检测 HIR 后肝脏组织中 IKK- β mRNA 的表达及细胞核中 NF- κ B 的蛋白结合活性。结果显示 HIR 组动物肝脏组织中 IKK- β mRNA 的表达、NF- κ B 的活性以及中 TNF- α 的表达均明显增加,并与肝脏组织损害程度、ALT 增高程度相关;IKK- β mRNA 的表达和 NF- κ B 的活化在 HIR 后 1 h 即达较高水平,6 h 达到峰值, TNF- α 的释放高峰在 6 h,并同时伴有严重的肝脏组织炎症反应。提示机体受到 HIR 刺激后,可增加 IKK 的表达,促进 NF- κ B 的活化和核移位,与 DNA 特异部位结合,调控基因转录活化,诱导细胞合成各种生物大分子^[7-8],从而上调 TNF- α 的基因转录。TNF- α 作为细胞因子网络的启动因子,进一步诱发 ALI。说明 IKK- β 是 HIR 继发性肝脏损伤的关键环节;TNF- α 在炎症瀑布反应的启动中发挥重要作用。

PDTC 可明显缓解治疗组动物肝脏的炎症反应,同时明显降低肝脏组织 IKK- β mRNA 的表达、NF- κ B 的活化以及肝脏组织中 TNF- α 表达水平。说明 PDTC 的抗炎作用机制可能是通过减少 IKK- β 的表达,下调 IKK-NF- κ B 通路,在基因转录水平降低细胞因子的合成和

释放, 遏制炎症瀑布反应, 从而减轻组织损伤. 提示干预IKK-NF- κ B通路可能是防止HIR后急性肝脏损伤发生、发展的一个有效途径, PDTC对预防和治疗HIR后急性肝脏损伤有重要意义.

4 参考文献

- 1 Kellum JA, Song M, Venkataraman R. Hemoabsorption removes tumor necrosis factor, interleukin-6, and interleukin-10, reduces nuclear factor-kappaB DNA binding, and improves short-term survival in lethal endotoxemia. *Crit Care Med* 2004;32:801-805
- 2 Gu XP, Jiang Y, Xu FT, Qiu YD, Ding YT. Effect of cold-ischemia time on nuclear factor-kappaB activation and inflammatory response in graft after orthotopic liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:1000-1004
- 3 於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚. 核因子- κ B与细胞凋亡关系的

- 研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1628-1631
- 4 徐明清, 薛兰, 龚建平. 缺血再灌注肝脏 Kupffer 细胞 NF- κ B 激活及其意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1250-1253
 - 5 Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, Itonaga M, Honda H, Nomura M, Ito S. Effects of idoxifene and estradiol on NF- κ B activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver* 2001;21:183-191
 - 6 Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: Implications of a central role for nuclear factor- κ B. *Hepatology* 1999; 30:203-211
 - 7 Prosch S, Wuttke R, Kruger DH, Volk HD. NF-kappaB-a potential therapeutic target for inhibition of human cytomegalovirus (re)activation. *Biol Chem* 2002;383:1601-1609
 - 8 Hentze H, Latta M, Kunstle G, Dhakshinamoorthy S, Ng PY, Porter AG, Wendel A. Topoisomerase inhibitor camptothecin sensitizes mouse hepatocytes in vitro and in vivo to TNF-mediated apoptosis. *Hepatology* 2004;39:1311-1320

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

IL-2 联合 IL-12 激活 A-NK 细胞治疗人肝癌 HepG-2

赵东陆, 王志华, 张春艳, 杨悦

赵东陆, 王志华, 张春艳, 杨悦, 哈尔滨医科大学肿瘤研究所 黑龙江省哈尔滨市 150040

项目负责人: 王志华, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号, 哈尔滨医科大学肿瘤研究所. hjiwzh000@163.com

电话: 0451-82620314 传真: 0451-86665003
收稿日期: 2004-04-10 接受日期: 2004-04-29

摘要

目的: 研究 A-NK 细胞体外抗肿瘤作用及小鼠体内抗肿瘤作用.

方法: 用淋巴细胞分离液分离健康人外周血中的血单个核细胞, PME(5 mmol/L) 室温处理 40 min, PME 处理后的人外周血单个核细胞重悬于 AIMV 中. 分为四组分别为: IL-2 (6 MU/L) 组, IL-2(1MU/L) 组, IL-12(5 ug/L) 组, IL-2 (1 MU/L)+IL-12(5 ug/L) 组; 每瓶细胞浓度为 $5 \times 10^6/L$, 于 $37^\circ C$, 50 mL/L CO_2 饱和湿化空气的培养箱中水平培养 4-5 h, 移去含未黏附于塑料表面的细胞悬液, 收集黏附于塑料表面的细胞(即 A-NK 细胞), MTT 比色法检测 A-NK 细胞体外细胞毒作用; 然后建立肝癌细胞株裸鼠皮下移植瘤模型, 以肿瘤体积、抑瘤率、生存期等指标观察 A-NK 对移植瘤的抑制作用.

结果: A-NK+IL-2+IL-12 组细胞毒活性明显高于其他三组 ($^*P < 0.05$), 体内实验表明 A-NK+IL-2+EL-4/IL-12 治疗组的移植瘤生长速度缓慢, 体积明显小于生理盐水对照组 ($^bP < 0.05$), 生存期显著延长 ($^cP < 0.05$).

结论: IL-12 辅助 IL-2 激活的 A-NK 细胞的体外杀伤活性较单独用 IL-2 或 IL-12 强, 体内实验显示具有明显的抗肿瘤作用.

赵东陆, 王志华, 张春艳, 杨悦. IL-2 联合 IL-12 激活 A-NK 细胞治疗人肝癌 HepG-2. 世界华人消化杂志 2004; 12(8):1959-1961

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1959.asp>

0 引言

黏附性淋巴因子激活的杀伤细胞(A-LAK). 其多数为 $CD3^- CD56^+$ 的 NK, 约占 A-LAK 的 76%, 而 LAK 主要为 $CD3^+ CD56^-$ 的 T 细胞. 1990 年以后, 研究者们多以 A-NK(IL-2 activated natural killer cells 或 adherent natural killer cells) 代替 A-LAK 这个名称. A-NK 具有体外增生力强, 抗肿瘤能力强等特点, 成为更具发展潜力, 更有前途的一类免疫细胞.

1 材料和方法

1.1 材料 6-8 周龄 BALB/C 裸鼠 25 只; 雌雄兼用, 购自中国医科大学实验动物部(许可证号: SCXK(辽)2003-0009); 人肝癌细胞株 HepG-2, 为本所常规液氮冻存. EL-4/IL-12 为本所构建并常规液氮冻存, 其表达量为 30.75 fg/24 h. RPMI1640 培养基、DMEM 培养基、无血清培养基(AIMV)(Gibco); 标准胎牛血清(天津血研所); MTT(四甲基偶氮唑蓝)购自华美生物制品有限公司; DMSO