

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 5 月 15 日 第 11 卷 第 5 期

(Volume 11 Number 5)



5/2003

ISSN 1009-3079

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生



World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2003 年 5 月 15 日 第 11 卷 第 5 期 (总第 109 期)

述 评	497 刮吸解剖法在肝门胆管癌手术切除中的应用 彭淑牖,刘颖斌 499 我国小肠疾病的研究现状 智发朝 502 2003 年度国家自然科学基金医学和生物学项目指南概述 崔慧斐,江学良,马连生
食 管 癌	508 食管上皮癌变过程中环氧化酶-2 表达上调 齐凤英,张林西,韩彩丽,左连富,林培中,郭建文 512 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用 张卫国,吴清明,童强,于皆平 517 腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响 李胜保,吴清明,王强,王小虎,谢国建
胃 癌	522 胃癌 SMAD4/DPC4 杂合性丢失的研究 朱亚青,尹浩然,朱正纲,刘炳亚,张奕,陈雪华,于颖彦,林言箴 526 胃癌增生凋亡与调节基因的表达 潘传敬,刘宽宇 531 慢性萎缩性胃炎胃泌素、生长抑素、表皮生长因子、血管活性肠肽的测定及临床意义 郭昱,郭霞,姚希贤
大 肠 癌	535 CD/5-FC 系统对结肠癌细胞的杀伤作用 黎成金,马庆久,赖大年,鲁建国,王小军,王青,潘伯荣,武永忠,李金茂 540 大肠腺癌组织 Survivin 蛋白的表达意义 肖军,邓长生,朱尤庆
幽门螺杆菌	544 胃癌细胞系幽门螺杆菌感染对金属蛋白酶表达的影响 李新华,张桂英,罗非君,徐美华,李乾 547 表达幽门螺杆菌热休克蛋白 60 克隆的构建 白杨,黄文,林焕健,王继德,陈烨,张兆山,周殿元,张亚历 551 幽门螺杆菌感染者胃黏膜中内质网分子伴侣 Grp94 的表达 王孟春,方文刚,顾金歌,李岩 554 幽门螺杆菌 CagA 蛋白与胃癌组织中 Bcl-2、p53 蛋白表达的关系 杜雅菊,赵晶,赵瑞波,李宝杰 558 根除 <i>H. pylori</i> 后应用灭 <i>Hp</i> 煎剂对慢性胃炎病变的影响 王娜,姚希贤,张琳,白文元,冯丽英 562 <i>Hp</i> 对慢性萎缩性胃炎内皮素及一氧化氮水平影响的实验与临床研究 郭昱,郭霞,姚希贤
基 础 研 究	565 大蒜素对大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响 徐细明,于皆平,何小飞,李军华,郑敏,於亮亮 569 泻剂结肠大鼠结肠中的 μ 、 κ 阿片受体变化 刘宝华,莫平,张胜本 571 香砂平胃散对小鼠胃排空的影响 王学清,王秀杰,李岩 575 术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响 李岩,王学清,张卫卫,王江玥 578 EGF 对小肠缺血再灌注后磷酸化 p44/42 MAPK 表达的影响 李平,邢峰,付小兵,杨银辉,郭宝琛
焦 点 论 坛	583 吻合方法对防止胰肠吻合口漏的重要性 彭淑牖,刘颖斌 584 胰十二指肠切除术的适应证 许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖 587 胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗 邓贵龙,李海军,刘颖斌,牟一平,彭淑牖 589 胰十二指肠切除术后胰漏的发生机制 王建伟,许斌,蔡秀军,李海军,刘颖斌,彭淑牖 591 胰肠吻合方法的演进 白明东,刘颖斌,李海军,彭淑牖 593 彭氏捆绑式胰肠吻合术的临床应用 陈晓鹏,刘颖斌,李海军,许斌,王建伟,李江涛,王新保,吴育连 595 彭氏型捆绑式胰肠吻合术 史留斌,方河清,刘颖斌,李海军,王建伟,许斌 596 捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制 刘颖斌,彭淑牖
文 献 综 述	598 人工肝生物反应器研究进展 向德栋,王英杰,王宇明 601 肝纤维化治疗的新热点-TIMPs 谢玉梅,聂青和 606 p63 基因研究进展 司少艳,张建中 610 老年期消化系疾病的诊疗特点 宋于刚

文献综述	613 胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治 陈仕珠 619 肠黏膜屏障研究进展 武金宝,王继德,张亚历 624 线粒体 DNA 与消化性肿瘤关系的研究进展 韩琤波,李凡,辛彦 628 热休克蛋白在胃溃疡中的表达及意义 向廷秀,王丕龙 632 内镜技术在消化系疾病诊疗中的应用 韩英 635 幽门螺杆菌的研究进展 徐智民,张万岱,周殿元 640 肠镜检查在早期大肠癌诊断中的重要作用 张亚历,周殿元 643 超声内镜检查在胃肠疾病中的临床应用 郭文 646 老年期消化道出血的鉴别诊断与治疗措施 宋卫生,杨希山 649 老年期消化性溃疡临床用药的合理选择 白岚 651 肥大细胞与功能性胃肠疾病 彭丽华,杨云生 654 肝门胆管癌的超声影像学诊断 王彬,陈路增,赵建勋,孙占祺 656 Budd-Chiari 综合征的分型及诊断 许伟华,朱菊人 658 部分脾栓塞术国内应用现状 朱晓玲
研究快报	663 FAK 在大肠癌中的表达及其临床意义 杨红军,丁彦青 665 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响 董卫东,张胜本,刘宝华,张连阳,黄显凯,高峰 668 胃癌患者血清 TNF- α 的水平及意义 陈剑群,许统俭,安侠,王营,陈玉林
临床经验	670 前列腺素 E ₁ 对急性胰腺炎二十碳烯酸异常代谢调节的临床研究 李庭赞,孙丹莉,孙士其 671 肝硬化腹水并发肝肾综合征及低渗性脑病与限钠治疗关系的研究 刘建军,智红,吴晓英,李楠 673 金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血 王孟春,李立,常桂艳,孙思予,孙素云 675 内镜诊疗实现无痛苦操作的临床评价 游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,王鹏,吴永伟,孔晓丽,许元印 677 经皮经肝胆囊引流治疗急性胆囊炎和重症胆管炎的价值 张国梁,朱春兰,任旭 679 进展期胰腺癌 299 例 王成锋,赵平,李文波,宋德余 681 食管、贲门癌染色体异常分析及意义 武珊珊,刘吉福,王明荣 684 空回肠出血 27 例 石力,田伏洲,李旭,周庆贤,赵碧,薛刚 686 食管鳞癌免疫组化彩色图像定量分析 韩永,徐燕杰,李宁,布和,宋晶莹,赵敏
病例报告	662 大肠 3 原癌 1 例 姚红兵,吴爱国,朱卉娟
封面故事	605 浙江大学医学院附属第二医院外科

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
 (月刊)
 创刊 1993-01-15
 改刊 1998-01-25
 出版 2003-05-15
 原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀	张金哲
黄象谦	张学庸
黄志强	赵东海
黎介寿	周殿元
刘耕陶	社长总编辑 马连生
裘法祖	中文编辑 潘伯荣
汤钊猷	王瑾晖
王宝恩	英文编辑 张建中
危北海	排版 李少华
吴孟超	校对 李天华
吴咸中	

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
 E-mail: wcjd@wjgnet.com
 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)85381892
 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 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)85381892
 传真: (010)85381893
 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
 检索系统收录
 美国《化学文摘(CA)》
 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
 俄罗斯《文摘杂志()》
 中国科技论文统计与分析
 中国学术期刊文摘
 中国中医药信息服务网
 中国生物医学文献光盘数据库
 《中文科技资料目录(医药卫生)》
 中国生物医学期刊目次数据库
 中国医学文摘外科学分册(英文版)
 中国医学文摘内科学分册(英文版)

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.

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 288.00 元

广告经营许可证
 1401004000050

COMMENTARY

Application of scraping and suctioning dissection in surgical remove of cholangiocarcinoma in porta hepatis

Peng SY, Liu YB 497

Current status of intestinal diseases in China

Zhi FC 499

Introduction to application directory of National Natural Science Foundation of China (Medicine and Biology, 2003)

Cui HW, Jiang XL, Ma LS 502

ESOPHAGEAL CANCER

Up-regulation of cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of esophageal epithelia

Qi FY, Zhang LX, Han CL, Zuo LF, Lin PZ, Guo JW 508

Inhibitory effect of p27kip1 mediated by adenovirus on model of esophageal carcinoma in nude mice

Zhang WG, Wu QM, Tong Q, Yu JP 512

Effects of adenovirus-mediated human cox-2 antisense RNA on synthesis of DNA and proteins in esophageal carcinoma cell line

Li SB, Wu QM, Wang Q, Wang XH, Xie GJ 517

GASTRIC CANCER

Loss of heterozygosity of SMAD4/DPC4 in gastric carcinoma

Zhu YQ, Yin HR, Zhu ZG, Liu BY, Zhang Y, Chen XH, Yu YY, Lin YZ 522

Proliferation/apoptosis and expression of P53 and Bcl-2 in gastric carcinoma

Pan CJ, Liu KY 526

Changes of gastrointestinal hormones in chronic atrophic gastritis and their clinical significance

Guo Y, Guo X, Yao XX 531

LARGE INTESTINAL CANCER

Killing effect of CD/5-FC system on human colon cancer cell lines SW 480 and LoVo

Li CJ, Ma QJ, Lai DN, Lu JG, Wang XJ, Wang Q, Pan BR, Wu YZ, Li JM 535

Expression of survivin protein in colorectal adenocarcinoma

Xiao J, Deng CS, Zhu YQ 540

H.pylori

Influence of expression of matrix metalloproteinase induced by *H. pylori* infection in gastric cancer cell line

Li XH, Zhang GY, Luo FJ, Xu MH, Li Q 544

Construction of clone expressing adhesin Hsp60 of *Helicobacter pylori*

Bai Y, Huang W, Lin HJ, Wang JD, Chen Y, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL 547

Expression of glucose-regulation protein 94 in gastric mucosa infected

with *Helicobacter pylori*

Wang MC, Fang WG, Gu JG, Li Y 551

Relationship between expression of Bcl-2 and p53 protein and CagA⁺ *Helicobacter pylori* in gastric cancer

Du YJ, Zhao J, Zhao RB, Li BJ 554

Histologic changes after *H.pylori* eradication with Killing *Hp* decoction for chronic gastritis

Wang N, Yao XX, Zhang L, Bai WY, Feng LY 558

Changes of nitricoxide and endothelin in *Helicobacter pylori* associated chronic atrophic gastritis before and after eradication: an experimental and clinical study

Guo Y, Guo X, Yao XX 562

BASIC RESEARCH

Effects of allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis

Xu XM, Yu JP, He XF, Li JH, Zheng M, Yu LL 565

Changes of mu and kappa opioid receptors in cathartic colon of rats

Liu BH, Mo P, Zhang SB 569

Effect of Xiangsha Pingweisan on gastric emptying motility in mice

Wang XQ, Wang XJ, Li Y 571

Effect of Zhuxiang powder on gastric and intestinal motility in mice

Li Y, Wang XQ, Zhang WW, Wang JY 575

Effects of EGF on expression of phosphorylated p44/42 MAPK in rat small intestine after ischemia-reperfusion injury

Li P, Xin F, Fu XB, Yang YH, Guo BC 578

FOCUSED FORUM

The significance of pancreaticojejunostomy method on prevention of pancreatic leakage

Peng SY, Liu YB 583

Diagnosis and treatment of principal complications of pancreaticojejunostomy

Deng GL, Li HJ, Liu YB, Mou YP, Peng SY 587

Mechanisms of pancreatic leakage after pancreaticoduodenectomy

Wang JW, Xu bin, Cai XJ, Li HJ, Liu YB, Peng SY 589

The development of pancreaticojejunostomy methods

Bai MD, Peng CH, Liu YB, Peng SY, Li HJ 591

The clinic application of Peng's binding pancreaticojejunostomy

Cheng XP, Wu YL, Liu YB, Peng SY, Li HJ 593

Type Peng's binding pancreaticojejunostomy

Shi LB, Fang HQ, Liu YB, Li HJ, Wang JW, Xu B 595

Mechanisms of binding pancreaticojejunostomy to prevent pancreatic leakage

Liu YB, Peng SY 596

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th May, 2003

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.** M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

腺病毒介导的cox-2反义RNA对食管癌细胞株DNA和蛋白质合成的影响

李胜保,吴清明,王 强,王小虎,谢国建

李胜保,吴清明,王强,王小虎,谢国建,郧阳医学院附属太和医院消化内科
湖北省十堰市 442000

李胜保,男,1970-09-21生,湖北省郧县人,汉族。1994年郧阳医学院本科毕业,
2001年武汉大学医学院硕士研究生毕业,主治医师。主要从事消化道肿瘤的
防治。

项目负责人:李胜保,442000,湖北省十堰市人民南路29号,太和医院消化内
科。libao2000@163.com

电话:0719-8801431

收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-23

Effects of adenovirus-mediated human cox-2 antisense RNA on synthesis of DNA and proteins in esophageal carcinoma cell line

Sheng-Bao Li, Qing-Ming Wu, Qiang Wang, Xiao-Hu Wang,
Guo-Jian Xie

Sheng-Bao Li, Qing-Ming Wu, Qiang Wang, Xiao-Hu Wang, Guo-Jian Xie,
Department of Gastroenterology, Taihe affiliated Hospital, Yunyang
Medical college, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Sheng-Bao Li, Department of Gastroenterology,
Taihe Affiliated Hospital, Yunyang Medical College, 29 Renmin south
Road, Shiyan 442000, Hubei Province, China. libao2000@163.com

Received: 2002-08-10 Accepted: 2002-08-23

Abstract

AIM: To construct the recombinant adenovirus encoding human cox-2 antisense RNA, and to investigate its effect on synthesis of DNA and proteins in esophageal carcinoma cell line EC9706.

METHODS: The shuttle plasmid encoding antisense cox-2 was constructed by cloning cox-2 cDNA fragment in the reverse direction into the pHCMVSP1A. Then the plasmid pJM17 and the shuttle plasmid were cotransferred into 293 cells with lipofectamine for homologous recombination to acquire recombinant adenovirus confirmed by PCR. The expressions of cox-2 in esophageal carcinoma cell line EC9706 cells were evaluated, and its effects on cell proliferation were determined by cell growth rate, ^3H -TdR and ^3H -Leucine incorporation.

RESULTS: The recombinant adenovirus encoding antisense cox-2 fragment ad-ASHcox-2 was obtained with the titer of 0.86 ± 10^{12} PFU/ml. Ad-ASHcox-2 can reduce the expression of cox-2, and inhibit cell growth rate and cause cellular death. Meanwhile, The efficiency of ^3H -TdR and ^3H -Leucine incorporation was significant lower than that in the control group at 48, 72, 96 hours ($q_{48\text{h}} = 16.36$ vs 16.36 , $q_{72\text{h}} = 39.07$ vs 19.90 , $q_{96\text{h}} = 54.80$ vs 30.33 ; $P < 0.001$).

CONCLUSION: Reducing the expression of cox-2 may inhibit the proliferation of esophageal cancer cells through inhibiting

the synthesis of DNA and protein.

Li SB, Wu QM, Wang Q, Wang XH, Xie GJ. Effects of adenovirus-mediated human cox-2 antisense RNA on synthesis of DNA and proteins in esophageal carcinoma cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(5):517-521

摘要

目的: 构建表达人 cox-2 反义 RNA 的腺病毒载体, 研究其对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响。

方法: 把人 cox-2 的 cDNA 片段反向克隆于穿梭质粒 pHCMVSP1A 的 CMV 启动子之下, 获得 pAd-ASHcox-2, 通过脂质体与 pJM17 共转染 293 细胞, 经同源重组产生编码 cox-2 反义 RNA 的重组腺病毒 -- Ad-ASHcox-2. 经 PCR 的方法鉴定为阳性克隆并大量扩增、纯化, 转染食管癌细胞 EC9706, 采用生长细胞计数, 免疫细胞化学、 ^3H -TdR、 ^3H -Leucine 掺入法, 研究对食管癌细胞生长、DNA 及蛋白质合成的影响。

结果: 成功构建并扩增、纯化得到编码 cox-2 反义 RNA 的重组腺病毒 Ad-ASHcox-2, 滴度达 0.86×10^{12} PFU/ml; Ad-ASHcox-2 感染肿瘤细胞后, cox-2 表达水平明显降低, ^3H -TdR、 ^3H -Leucine 掺入量明显减少, 与对照组在 48h、72h、96h 比较有显著性差异 ($q_{48\text{h}} = 16.36$ 及 16.36 , $q_{72\text{h}} = 39.07$ 及 19.90 , $q_{96\text{h}} = 54.80$ 及 30.33 ; $P < 0.001$); 同时发现食管癌细胞的生长明显受抑制。

结论: 表达 cox-2 反义 RNA 重组腺病毒感染人食管癌细胞后可降低 cox-2 表达水平, 使 DNA 合成降低、蛋白质合成减少, 且抑制食管癌细胞生长、增生, 提示抑制 cox-2 的表达可能是治疗食管癌的一种新途径。

李胜保, 吴清明, 王强, 王小虎, 谢国建. 腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(5):517-521
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/517.htm>

0 引言 %

近年来, 流行病学资料研究表明长期坚持服用非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) 如阿司匹林等可使大肠癌的危险性降低 40-50%^[1,2], 使家族性腺瘤型息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP) 的癌变率和死亡率降低, 使息肉数量和体积减小^[3]. NSAID 类药物作用的中心环节是抑制环氧酶(cyclooxygenase,

cox)的活性,而cox是花生四烯酸转化为前列腺素(prostaglandins,PGs)的限速酶,他有两个同工异构体^[4]-cox-1和cox-2,其中cox-1为原生型,在机体大多数组织中都有不同水平的表达,经cox-1途径产生的PGs在机体中主要起生理性保护作用,因此cox-1又称“管家基因”(housekeeping gene);cox-2为诱生型,在机体大多数组织中无表达(平滑肌细胞血管内皮细胞、炎性细胞除外),多因各种生长因子、丝裂原、内毒素、前致癌物等刺激后迅速产生,在许多癌组织中高度表达,可能与癌症的发生、发展有关^[5].本课题利用基因重组技术构建cox-2的反义RNA重组腺病毒,转染人食管癌细胞株EC9706,研究其对食管癌细胞生长、DNA合成的影响,进一步探讨cox-2的促癌机制.

1 材料和方法

1.1 材料 酶及主要试剂 内切酶BamHI、XbaI、T₄DNA Ligase 购自华美生物工程公司;1640、Lipofectamine 购自GIBCO/BRL公司,低熔点琼脂糖,X-gal 购自Promega公司;CsCl 购自Sigma公司;³H-TDR、³H-Leucine 购自北京原子能研究所;cox-1、cox-2 抗体 购自Santa Cruz公司,SP试剂盒购自北京中山生物公司;cox-2cDNA及腺病毒PCR引物由赛百胜生物公司设计、合成.质粒和菌株Ad-LacZ由我分子生物学实验室王家宁博士惠赠,cox-2质粒PCRTM Vector由美国Vanderbilt University 管又飞博士惠赠,pHCMVSP1A和pJM17由军事科学院二所吴祖泽院士惠赠.DH_{5α}由北京医科大学第一医院内科彭旭博士惠赠.细胞系293细胞为腺病毒E1区基因转化的人胚肾细胞系,培养条件为10%新生小牛血清的高糖DMEM培养液,在37℃、5%CO₂孵箱中培养.食管癌细胞株EC9706由中国医学科学院王明荣教授惠赠,培养条件为3%1640,在37℃、5%CO₂孵箱中培养.仪器高速冷冻离心机(Jouan,意大利),二氧化碳培养箱(sanyD,日本),超高速冷冻离心机(Hitachi,日本),倒置相差显微镜(Olympus IX-70,日本),PCR扩增仪(美国),液体闪烁计数仪(美国Beckman),紫外分光光度计(752型,上海),空气浴、水浴摇床.

1.2 方法 (1)cox-2反义RNA重组腺病毒载体的构建、鉴定、扩增、纯化、滴度测定 质粒pCRTMIIcox-2经XbaI BamHI双酶切获得COX-2 cDNA片段,反向克隆于穿梭质粒pAdHCMV SP1A的XbaI、BamHI两位点上;连接产物为pAd-ASHcox-2,后者经转化大肠杆菌DH_{5α}进行质粒扩增,酶切鉴定为阳性质粒后进行大量扩增、纯化.Lipofectamin介导穿梭质粒pAd-ASHcox-2与pJM17共转染293细胞,待293细胞出现病变、脱落细胞约20%再收集上清.取病毒上清提取病毒DNA,经PCR鉴定.cox-2上游引物:5'-TTG GCT TCA AGA CTG AGA TA-3',下游引物:5'-

AGC CCA AAT TAT TGG TTC;腺病毒引物上游引物:5'-TCG TTT CTC AGC AGC TGT TG-3',下游引物:5'-CAT CTG AAC TCA AAG CGT GG-3'.PCR反应体系:取病毒DNA10 μl,20 μmol/L引物各10 μl(腺病毒引物为5 μl),10 × PCR buffer 5 μl,MgCl₂ 2 μl,2 mmol/L dNTP5 μl,Taq酶1 μl,加水至PCR反应终体积50 μl,用矿物油覆盖,94℃变性5 min,然后94℃30 s,56℃30 s,72℃60 s,循环30次,最后72℃延伸10 min,在1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳,能同时扩增cox-2的cDNA片段和腺病毒片段为阳性重组克隆,不加模板进行PCR扩增作为阴性对照.鉴定为阳性重组腺病毒后反复转染293细胞,收集293细胞,反复冻融碎裂293细胞,用CsCl超速梯度离心2次,收集病毒,经透洗袋纯化病毒,最后用有限稀释法进行病毒滴度测定.(2)病毒感染率测定 用带有LacZ报告基因的重组腺病毒Ad-LacZ按不同的感染倍数(multiplicity of infection, MOI)感染食管癌细胞,48 h后固定细胞,X-gal染色,显微镜下计数被染成蓝色的细胞,即为LacZ基因表达的阳性细胞,确定蓝染百分率.(3)细胞生长曲线 细胞按1 × 10⁴/孔分别接种在24孔培养板中,细胞长至40-50%融合时,按一定的MOI感染癌细胞,定期消化收集细胞,每个时间点设三个平行组,计数取平均值及标准差,连续计数4 d.对照组包括加病毒Ad-LacZ组和不加病毒组.(4)食管癌细胞cox-2的表达的测定 分别取第24、48、72、96小时培养的癌细胞进行消化、收集、离心,PBS漂洗1次,吹散食管癌细胞,作细胞涂片,电风吹干后,用4℃冷丙酮固定10 min.此后按SP免疫细胞化学实验方法进行.(5)³H-TdR及³H-Leucine掺入试验 按1 × 10⁴/孔分别接种在24孔培养板中,待细胞长到40-50%融合时,实验组和对照组3%Fcs1640培养3 h后改为无Fcs1640,培养12 h,各组加入1 μCi ³H-TdR或³H-Leucine,分别于24 h,48 h,72 h用PBS漂洗1次,甲醇固定10 min,无水乙醇10 min,最后加0.1 M的NaOH 200 μl,经吹打后各取200 μl入5 ml闪烁液中混匀、过夜,次日测定³H放射强度(CPM);每组设三孔,重复三次.

统计学处理 先F检验,后用q检验.

2 结果

2.1 表达cox-2反义RNA重组腺病毒的构建 将目的基因cox-2 cDNA片段反向克隆到pAdHCMVSP1A上,酶切鉴定挑选表达cox-2反义RNA的重组质粒pAd-ASHcox-2(见图1),使其和pJM17共转染293细胞,经同源重组,产生编码cox-2反义RNA的复制缺陷型重组腺病毒Ad-ASHcox-2,PCR鉴定结果(见图2),扩增产物为277 bp的cox-2 cDNA片段和860 bp的病毒基因骨架片段;Ad-ASHcox-2经扩增、提取、纯化,经测定Ad-ASHcox-2滴度达0.86 × 10¹²PFU/ml.

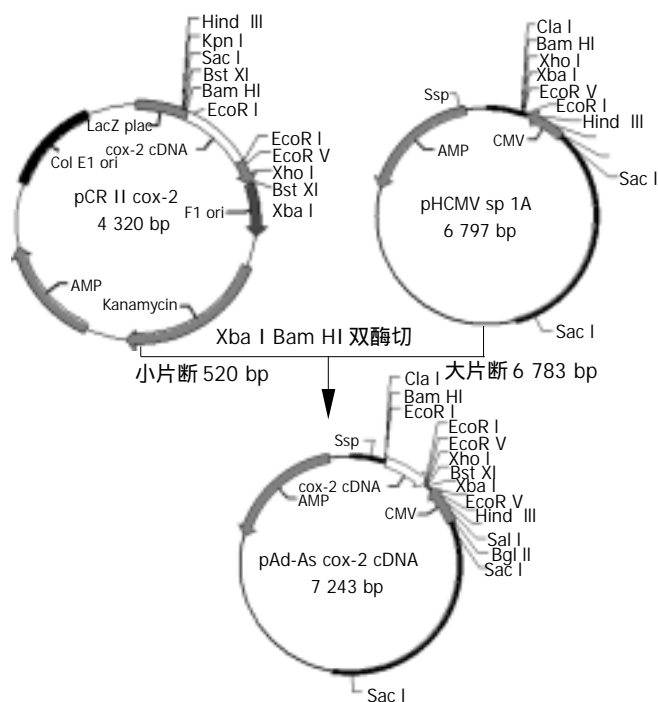


图1 基因重组图谱.

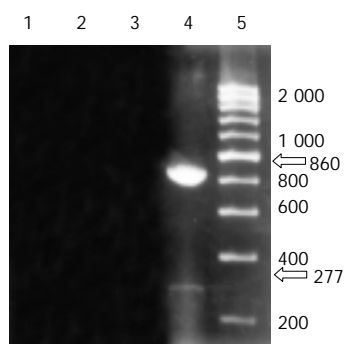


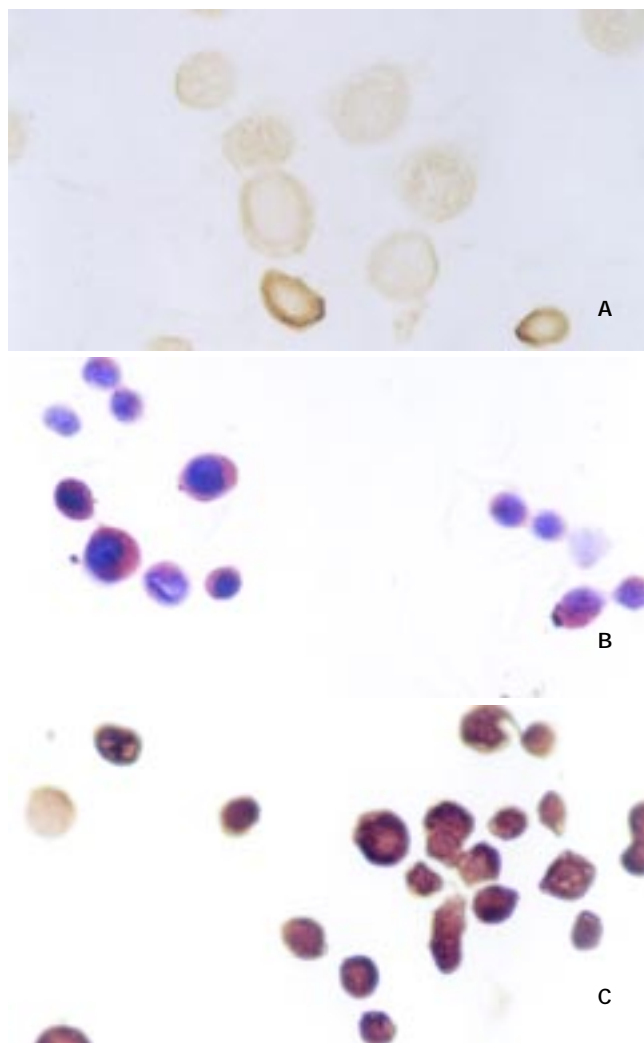
图2 琼脂糖凝胶电泳鉴定 Ad-ASHcox-2 的 PCR 扩增结果. 1:对照组; 2:pHCMVSP1A 组;3:pAd-ASHcox-2 组; 4:Ad-ASHcox-2 组;5: 200 bp Ladder.

2.2 重组腺病毒的转染效率 Ad-LacZ 按 MOI 为 25、50、100、200 的强度分别感染食管癌细胞, 48 h 后进行 X-gal 染色, 显示转染效率分别为 90 %、100 %、100 %、100 %, 表明 MOI >25 时, 90 % 以上的 EC9706 细胞被 Ad-LacZ 感染.

2.3 免疫细胞化学染色 结果显示:实验组 Ad-ASHcox-2 cox-2 表达与对照组 Ad-LacZ 组和空白对照组比较明显减少, 病毒转染第 3 天表达水平最低(见图 3).

2.4 细胞生长曲线 细胞生长曲线显示 Ad-ASHcox-2 组癌细胞计数随时间推移有明显降低的趋势, 第 96 小时细胞计数最少; 而 Ad-LacZ 组和空白对照组癌细胞计数随时间的推移有明显增多的趋势(见图 4).

2.5 Ad-ASHcox-2 对食管癌细胞 ^3H -TdR 及 ^3H -Leucine 掺入量的影响 Ad-ASHcox-2 组 ^3H -TdR 及 ^3H -Leucine 掺入量明显低于对照组($P < 0.001$), 并随着时间的推移有下降的趋势, 以第 4 天最明显; 而 Ad-LacZ 组和空白对照组 ^3H -TdR 及 ^3H -Leucine 掺入量均在增加, 二者比较无统计学差异($P > 0.05$)(见表 1, 表 2).



A Ad-ASHcox-2 组大部分 EC9706 细胞 Cox-2 表达明显减少.

B Ad-LacZ 组 EC9706 细胞 Cox-2 高表达.

C 空白对照组 EC9706 细胞 Cox-2 高表达.

图3 实验组 Ad-ASHcox-2、对照组 Ad-LacZ 组和空白对照组 cox-2 表达情况.

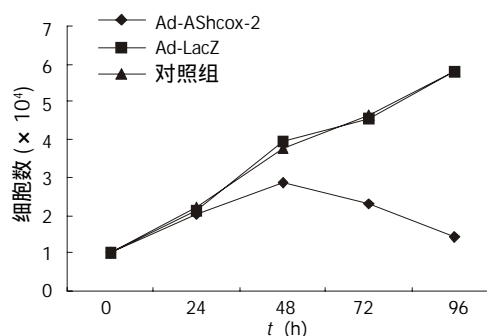


图4 Ad-ASHcox-2 及 Ad-LacZ 对食管癌细胞株 EC9706 生长的影响.

表1 ^3H -TdR 掺入量($\bar{x} \pm s$ CPM/Well)

组别	48 h	72 h	96 h
Ad-ASHcox-2	2 504.67 \pm 340.74 ^a	2 372.22 \pm 115.18 ^b	279.22 \pm 45.36 ^b
Ad-LacZ	3 481.78 \pm 114.57	3 656.44 \pm 82.75	4 424.67 \pm 82.75
Control group	3679 \pm 99.51	3 750.67 \pm 71.77	4 400.44 \pm 381.56

三组之间的比较: $F_{48\text{h}}=76.75, F_{72\text{h}}=548.77, F_{96\text{h}}=995.80$ ($P < 0.001$); 反义基因组与空白对照组间的比较: $q_{48\text{h}}=16.36, q_{72\text{h}}=39.07, q_{96\text{h}}=54.80$ ($^bP < 0.001$); LacZ 基因组与空白对照组间的比较: $q_{48\text{h}}=2.75, q_{72\text{h}}=2.87, q_{96\text{h}}=0.32$ ($P > 0.05$)

表2 ^3H -Leucine 掺入量($\bar{x} \pm s$ CPM/Well)

	48 h	72 h	96 h
Ad-ASHcox-2	546.22 \pm 53.54 ^b	499.22 \pm 24.76 ^b	232.44 \pm 67.74 ^b
Ad-LacZ	989.33 \pm 102.44	1 038.11 \pm 83.07	1 024.56 \pm 90.45
空白组	959.33 \pm 62.11	1 081.567 \pm 110.78	1 009.56 \pm 70.37

三组之间的比较: $F_{48\text{h}}=8.02, F_{72\text{h}}=143.59, F_{96\text{h}}=312.75(P<0.05)$;反义基因组与空白对照组间的比较: $q_{48\text{h}}=16.36, q_{72\text{h}}=19.90, q_{96\text{h}}=30.33$ ($^bP<0.001$); LacZ基因组与空白对照组间的比较: $q_{48\text{h}}=1.18, q_{72\text{h}}=1.61, q_{96\text{h}}=0.58(P>0.05)$ 。

3 讨论

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,死亡率很高,近年来发病率呈上升趋势。对食管癌的治疗传统方法有手术、放疗、化疗和生物治疗^[6-9],但这些方法对中晚期食管癌效果差、并发症多,使临床应用受限;因此,寻求一种新的方法极为迫切。近几十年来,大量研究发现食管癌癌变过程是一个多因素、多阶段、多基因变异的综合过程,尤其基因结构的改变和表达异常是食管癌发生的分子基础。反基因技术就是针对这种机制设计治疗癌症的一种新方法^[10-16]。

我们构建表达cox-2反义RNA重组腺病毒就是利用反义核酸技术的原理,能持续表达cox-2的反义RNA,封闭cox-2基因,使之表达减少。本研究结果显示Ad-ASHcox-2感染食管癌细胞株EC9706后,cox-2表达明显减少,这是因为Ad-ASHcox-2能抑制cox-2的转录、翻译,与mRNA结合使mRNA稳定性降低;另外与腺病毒的高效转导有关^[17]。

大量的研究报道cox-2在胃癌、肝癌、大肠癌等^[18-21]消化道肿瘤中高度表达,而正常组织不表达或弱表达;我们前期的研究^[22]也证实cox-2在食管癌组织中高度表达,与淋巴转移有关;Tsujii et al^[23]将cox-2基因转染到小鼠肠上皮细胞时发现,cox-2高表达可使上皮细胞异型性增生,出现恶性表型,使抗凋亡基因表达下调;使用cox-2的抑制剂可对抗这种作用^[24-26],说明cox-2在癌症的发生、发展中可能扮演重要角色。本研究结果显示Ad-AScox-2转染食管癌细胞株后,细胞生长曲线呈下降趋势,而对照组呈上升趋势,表明Ad-AScox-2能抑制食管癌细胞的生长增生。吴汉平 et al^[27]也发现cox-2反义核酸转染胃癌细胞时癌细胞生长受限,提示cox-2可能成为癌症基因治疗的一个靶位。Ad-LacZ组与空白对照组食管癌细胞生长曲线几乎重叠,表明腺病毒对食管癌细胞无毒害作用。

细胞 ^3H -TdR掺入量的多少是细胞DNA合成快慢的标志^[28], ^3H -Leucine掺入量可以反映蛋白质合成的快慢^[29],本研究发现Ad-ASHcox-2组与对照组比较, ^3H -TdR及 ^3H -Leucine掺入量均明显减少($P<0.001$),说明Ad-ASHcox-2使cox-2表达降低后,可抑制肿瘤细胞DNA和蛋白质的合成,使EC9706细胞有丝分裂所需原料合成减少,从而发挥抑癌作用。

另外,我们实验中还发现Ad-ASHcox-2转染癌细胞后,有大量癌细胞脱落、坏死、呈葡萄状改变,说明Ad-ASHcox-2对癌细胞有直接杀死作用,可能与诱导细胞凋亡作用有关^[30]。

本研究结果显示表达cox-2反义RNA重组腺病毒感染人食管癌细胞后可降低cox-2表达水平,使DNA和蛋白质合成降低,且抑制食管癌细胞生长、增生,进一步说明cox-2与食管癌的发生发展有关;抑制cox-2的表达可能是治疗食管癌的一种新途径。

4 参考文献

- Williams CS, Smalley W, DuBois RN. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest* 1997; 100:1325-1329
- Wang Q, Fan LY, He J, Wang YH. Inhibitory effect of sulindac against chemically-induced primary colonic tumors by N-methyl-N-nitrosourea in mice. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:16-18
- Giardiello FM, Spannhake EW, DuBois RN, Hyland LM, Robinson CR, Hubbard WC, Hamilton SR, Yang VW. Prostaglandin levels in human colorectal mucosa: effects of sulindac in patients with familial adenomatous polyposis. *Dig Dis Sci* 1998;43:311-316
- Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996;270(3 Pt 1):G393-400
- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1511-1513
- 李方儒. 食管癌的放射治疗和化学治疗. 世界华人消化杂志 2000;8: 1024-1026
- 王苑本, 余国行, 高友芝. 食管癌的治疗方法和实施原则. 世界华人消化杂志 2000;8:1021-1023
- 刘心娟, 王帮茂. 食管癌的生物治疗. 世界华人消化杂志 2000;8: 1027-1029
- 陈克能, 徐光炜. 食管癌的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2000;8: 196-202
- Tang YC, Li Y, Qian GX. Reduction of tumorigenicity of SMMC-7721 hepatoma cells by vascular endothelial growth factor antisense gene therapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:22-27
- 范应方, 黄宗海. 结直肠癌基因治疗研究进展. 世界华人消化杂志 2001;9:427-430
- 冷建军, 陈玉强, 冷希圣. 胰腺癌的基因治疗. 世界华人消化杂志 2000; 8:916-918
- Chen JP, Lin C, Xu CP, Zhang XY, Wu M. The therapeutic effects of recombinant adenovirus RA538 on human gastric carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2000;6:855-860
- 何兴祥, 王家马龙. 肝癌基因治疗的现状与展望. 华人消化杂志 1998; 6:158-159
- Cao GW, Qi ZT, Pan X, Zhang XQ, Miao XH, Feng Y, Lu XH, Kuriyama S, Du P. Gene therapy for human colorectal carcinoma using human CEA promoter controlled bacterial ADP-ribosylating toxin genes human CEA: PEA & DTA gene transfer. *World J Gastroenterol* 1998;4:388-391
- Zhang XY. Some recent works on diagnosis and treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1999;5:1-3
- Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene Expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 2000;275:11750-11757
- Ristimäki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1276-1280
- Shiota G, Okubo M, Nomi T, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Yashima K, Kishimoto Y, Kawasaki H. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999;46:407-412
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-1188
- 郜恒骏, 于连珍, 孙亮, 缪琨, 白剑峰, 张小勇, 吕秀珍, 赵志泉. 胃癌及癌旁

- 组织中cox-2基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:578-579
- 22 吴清明,李胜保,王强,王德华,李晓斌,刘重贞. 食管癌cox-2高表达与临床病理特征的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:11-14
- 23 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501
- 24 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of sulindac on human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 25 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 26 Meyer-Siegler K. COX-2 specific inhibitor, NS-398, increases macrophage migration inhibitory factor expression and induces neuroendocrine differentiation in C4-2b prostate cancer cells. *Mol Med* 2001;7:850-860
- 27 吴汉平,吴开春,李玲,么立萍,兰梅,王新,樊代明. 人环氧合酶-2(hcox-2)编码基因的克隆及其反义核酸转染胃癌细胞的初步研究. 世界华人消化病杂志 2000;8:1211-1217
- 28 Lavezzi AM, Biondo B, Repetti ML, Varesi C, Masini B, Matturri L. Prognostic implications of the proliferation index (3H-TdR-labeling index) and ploidy in neuroectodermal tumors (astrocytomas and glioblastomas). *Minerva Med* 1992;83:115-119
- 29 Rabinovitz YM, Pinus HA, Kotelnikova AV. A study of dependence of protein synthesis in mitochondria on the transmembrane potential. *Mol Cell Biochem* 1977;14:109-113
- 30 Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-366

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

• 消息 •

世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次

2003 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm> 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm>

2003 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

以上电子版如您需要请 E-mail 回复, 免费提供您使用. E-mail 地址: wjg@wjgnet.com. 以后将新出版的世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版用 E-mail 发给您收. 希望您推荐 10 位消化专业工作者的 E-mail 地址, 让您的朋友也能获得电子版.
(世界胃肠病学杂志社 2003-01-15)



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

