

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 mu、kappa 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 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

张卫国,吴清明,童强,鄖阳医学院附属十堰市太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000
于皆平,武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
张卫国,男,1971-10-1生,湖南衡阳人,汉族. 1995年原同济医科大学毕业,现为武汉大学人民医院消化内科硕士研究生,主治医师.
项目负责人:吴清明,442000,湖北省十堰市太和医院消化内科. zwg789@sina.com
电话:0719-8801431
收稿日期:2002-10-17 接受日期:2002-11-16

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

Wei-Guo Zhang, Qing-Ming Wu, Qiang Tong, Jie-Ping Yu

Wei-Guo Zhang, Qing-Ming Wu, Qiang Tong, Department of Gastroenterology, the Affiliated Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China
Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Qing-Ming Wu, Department of Gastroenterology, Taihe Hospital, Shiyan 442000, Hubei Province, China. zwg789@sina.com
Received: 2002-10-17 Accepted: 2002-11-16

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of p27kip1 mediated by adenovirus vector on esophageal carcinoma *in vivo*.

METHODS: Eca109 cells were injected into the subcutaneous tissue of nude mice to establish tumors. The transplanted tumors were reproduced among the nude mice continually after original grafts grew well. The model of esophageal carcinoma in nude mice was established by transplanting the tumor tissue mass into the subcutaneous tissue of nude mice. The successful constructed recombinant adenoviral vector carrying p27kip1 gene and LacZ recombinant adenovirus were directly injected into the esophageal tumors in nude mice respectively. Compared with control group, the growth curves of tumor were drawn and the growth inhibition rates of tumor were calculated.

RESULTS: The growth of tumors in gene therapy group with p27kip1 was obviously suppressed, which had a significant difference compared with control group ($P < 0.001$). The growth inhibition rate of tumor reached 64.1 %.

CONCLUSION: p27kip1 gene therapy mediated by adenovirus vector has significant inhibitory effect on esophageal carcinoma *in vivo*.

Zhang WG, Wu QM, Tong Q, Yu JP. Inhibitory effect of p27kip1 mediated by adenovirus on model of esophageal carcinoma in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):512-516

摘要

目的: 用腺病毒为载体, 来研究 p27kip1 基因对食管癌的

体内抑制作用.

方法: 用人食管癌细胞 Eca109 接种于裸鼠皮下, 原代生长后在鼠间传代, 再用组织块移植法构建食管癌裸鼠模型, 应用直接注射法, 将成功构建的携带人 p27kip1 基因的重组腺病毒及 LacZ 重组腺病毒导入裸鼠食管癌瘤体中, 与对照组比较, 绘制肿瘤生长曲线, 并计算肿瘤生长抑制率.

结果: p27kip1 基因治疗组肿瘤生长明显受到抑制, 与对照组比较, 有显著性差异 ($P < 0.001$), 肿瘤生长抑制率达 64.1 %.

结论: 腺病毒介导的 p27kip1 基因对食管癌具有较显著的体内抑制作用.

张卫国, 吴清明, 童强, 于皆平. 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):512-516

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/512.htm>

0 引言

食管癌常见, 其发生、发展涉及多个基因及分子水平的变化^[1-12], 目前无论是传统的手术、化疗及放疗, 还是所进行实验研究的基因治疗, 都未能取得满意的疗效, 而针对细胞周期调控, 这一分子基因水平上癌变过程共同通道的治疗可能是食管癌防治的有效途径. p27kip1 蛋白是新近发现^[13]的一种重要的具有细胞周期负调控的因子, 使细胞停滞于 G1 期, 不能完成 G1/S 期转换, 增生受抑制. 我们以腺病毒为载体, 将 p27kip1 基因导入人食管癌裸鼠模型瘤体中, 来研究以 p27kip1 为目的基因, 恢复细胞正常的负性周期调控来治疗食管癌, 以探求一种有效的基因治疗新途径.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级 Balb/C 裸小鼠、人食管癌细胞株 Eca109 均由中国医学科学院肿瘤医院所提供, 裸小鼠雌雄兼用, 4 周龄. 293 细胞购自中国科学院上海细胞库. pCMV5p27kip1 由北京大学第一医院泌尿外科研究所王刚博士惠赠. pACCMVPLPA 和 PJM17 由军事医学科学院二所吴祖泽院士惠赠. 大肠杆菌 DH5a 由北京大学第一医院内科彭旭博士惠赠. Ad-LacZ 由我院生命科学研究所提供. p27kip1 cDNA 及腺病毒 PCR 引物由赛百胜生物公司设计、合成. 内切酶 Kpn⁺, BamH⁺ 及 T4 DNA ligase 购自华美生物工程公司, Lipofectamine, DMEM 购自 Gibco 公司. CsCl 购自 Sigma 公司. 特级新生

小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒载体的构建及扩增 将 pCMV5p27kip1, pACCMVPLPA 分别用 Kpn⁺, BamH⁺ 双酶切, 获得 p27kip1cDNA 及腺病毒片段, 以定向克隆方式用 T4 DNA ligase 连接, 连接产物为穿梭质粒 pAd-p27kip1, Lipofectamine 介导 pAd-p27kip1 与 PJM17 共转染 293 细胞, 制备出携带 p27kip1 基因的重组腺病毒载体 Ad-p27kip1^[14]。将 Ad-p27kip1 直接感染 293 细胞, 293 细胞为腺病毒 E1 区转化的人胚肾细胞, 培养条件为 100 mL/L 新生小牛血清的 DMEM 培养基, 在 37⁺, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 用倒置相差显微镜观察细胞病变, 当 90-100 % 细胞出现病变, 10-20 % 细胞脱落时, 收集细胞及病毒上清, 将病毒上清反复感染 293 细胞, 收集细胞。取病毒上清 200 μ L, 加入等体积裂解液, 混匀, 煮沸 20 min, 加入 10 g/L 蛋白酶 K 10 μ L, 37⁺ 水浴 3 h, 加等体积酚/氯仿, 彻底混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 加 1/10 体积 NH₄AC, 2.5 体积无水乙醇, 等体积异丙醇温放置沉淀 DNA, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 保留沉淀, 加 1 mL 750 mL/L 乙醇洗涤, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 自然干燥, 加入三蒸水 20 μ L, 以此为 DNA 模板进行扩增鉴定。p27kip1 引物上游: 5' - CCTAGAGGGCAAG TACGAGTG - 3', 下游: 5' - GAAGAATCGTCGGT GCAGGTCGCT - 3'。腺病毒引物上游: 5' - TCGTTT CTCAGCAGCTGTTG - 3', 下游: 5' - CATCTGAAC TCAAAGCGTGG - 3'。PCR 反应体系: 病毒 DNA 10 μ L, 引物各 5 μ L, 2 mmol/L dNTP 5 μ L, Taq 酶 1 μ L, MgCl₂ 2 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 加水至反应终体积为 50 μ L, 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 8 g/L 琼脂糖凝胶中将扩增产物进行电泳, 对病毒进行鉴定。将细胞在 -80⁺ 与 37⁺ 之间反复冻融 3 次以释放出病毒, 用 CsCl 超速密度梯度离心 2 次提取病毒, 装入透析袋, 置入透析液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L MgCl₂, 100 mL/L 甘油), 应用磁力搅拌器 4⁺ 透析 2 次进行纯化。对纯化后的重组腺病毒用有限稀释法, 紫外分光光度计测定其滴度。Ad-LacZ 为带有 LacZ 报告基因的重组腺病毒, 其扩增、纯化及滴度测定同上。将含 LacZ 重组腺病毒的上清感染 293 细胞, 48 h 后固定细胞, X-gal 染色, 显微镜下蓝染的细胞, 即 LacZ 基因表达阳性的细胞。

1.2.2 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制作用 人食管癌裸鼠模型的构建: 取对数生长期的食管癌细胞 Eca109, PBS 清洗后制成每升含 1×10^{10} 细胞悬液, 每只按 0.1 mL 接种于 4 周龄 Balb/C 裸小鼠皮下, 原代生长后在鼠间传代, 再取出瘤体, 将肿瘤制成 0.3 \times 0.3 cm 的小块, 采用组织块移植法置入 4 周龄 Balb/C 裸小鼠右背侧皮下, 共 36 只, 动物饲养于中国医学科学院

实验动物研究所, 清洁级动物室内, 裸鼠所用饲料、水及用具均经灭菌处理。待肿瘤长至 0.7 cm 左右时, 取其中 21 只肿瘤体积较为均一的裸鼠, 随机分为 3 组, 每组 7 只, 采用肿瘤局部直接注射法, 对照组中每只裸鼠瘤体内注射 PBS 0.1 mL, 实验组 1 中每只注射 Ad-LacZ (病毒含量 10^{10} pfu) 0.1 mL, 实验组 2 中每只注射 Ad-p27kip1 (病毒含量 10^{10} pfu) 0.1 mL, 隔日注射 1 次, 共 4 次, 连续观察 4 wk。每 3 d 测量各组肿瘤体积 1 次, 绘制肿瘤生长曲线, 肿瘤近似体积按公式 $V = \frac{1}{6} [(A+B)/2]^3$ 计算(A, B 分别为肿瘤的最长径、最短径)。4 wk 后处死动物, 剥离肿瘤, 称质量, 按公式肿瘤生长抑制率(%) = (对照组肿瘤质量 - 实验组肿瘤质量) / 对照组肿瘤质量 $\times 100\%$, 求出肿瘤生长抑制率。

统计学处理 采用 t 检验

2 结果

2.1 Ad-p27kip1 及 Ad-LacZ 的扩增 两种重组腺病毒感染 293 细胞后, 显微镜下均可见细胞变圆、聚集成团、呈葡萄串样病变改变(图 1、2), Ad-p27kip1 PCR 鉴定结果见图 3, 以 pCMV5p27kip1 为模板, 扩增出 275 bp 的 p27kip1cDNA 片段, 以 pACCMVPLPA 为模板, 扩增出 860 bp 的腺病毒基因片段, 以提取的病毒 DNA 为模板, 则同时扩增出 275 bp 的 p27kip1cDNA 片段和 860 bp 的腺病毒基因片段, 阴性对照组无 PCR 产物。Ad-p27kip1 纯化后经测定, 其滴度为 1.60×10^{15} pfu/L, $A_{260}/A_{280} > 1.3$ 。Ad-LacZ 感染 293 细胞后, 经固定, X-gal 染色, 显微镜下可见较多蓝染的细胞, Ad-LacZ 纯化后经测定, 其滴度为 1.48×10^{15} pfu/L, $A_{260}/A_{280} > 1.3$, 表明两种腺病毒均为实验所需重组腺病毒, 且滴度、纯度较高, 能满足基因治疗的需要。

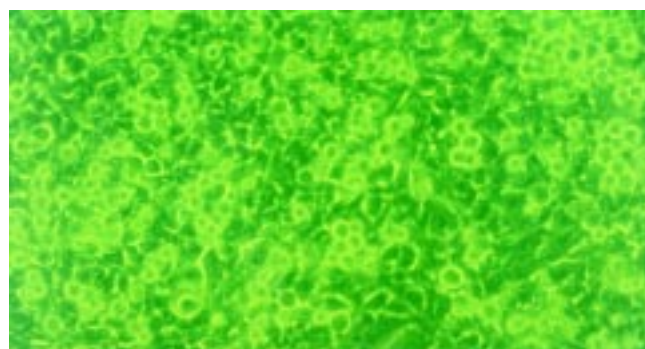


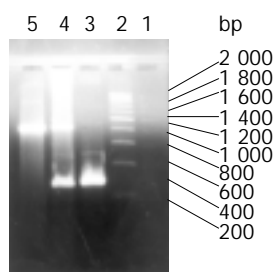
图 1 Ad-p27kip1 感染 293 细胞后细胞病变。

2.2 食管癌裸鼠模型的治疗 采用组织块移植法接种 12 d 后, 裸小鼠右背侧皮下均可见 0.7 cm 左右的肿瘤, 成瘤率达 100 %, 且动物生长状态良好。治疗实验裸鼠连续观测 4 wk, 动物生长状态较好, 无死亡。Ad-p27kip1 组肿瘤生长显著慢于对照组, Ad-LacZ 组则与对照组差异不明显(图 4)。4 wk 后处死动物, 剥离肿瘤, 称质量, Ad-p27kip1 组瘤体质量显著低于对照组(0.42 ± 0.08 g vs

1.17±0.30 g, $P < 0.001$), 而 Ad-LacZ 组瘤体质量与对照组无明显差异(1.00±0.23 g vs 1.17±0.30 g, $P > 0.05$), 肿瘤生长抑制率达 64.1 % (图 5)。



图2 Ad-LacZ 感染 293 细胞后细胞病变。



1:阴性对照组; 2:200 bp ladder marker; 3:pCMV5p27kip1 为模板, 扩增出 275 bp 基因片段; 4:Ad-p27kip1 为模板, 同时扩增出 275 bp 和 860 bp 两个基因片段; 5:pACCMVPLPA 为模板, 扩增出 860 bp 基因片段。
图3 琼脂糖凝胶电泳鉴定 Ad-p27kip1 的 PCR 扩增结果。

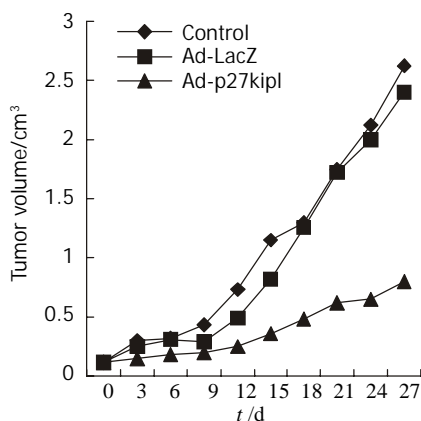


图4 各组裸鼠肿瘤生长曲线。

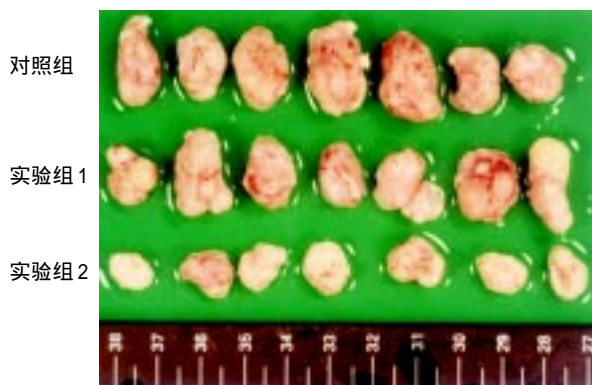


图5 基因治疗后各组裸鼠肿瘤比较。

3 讨论

近年来, 基因治疗为肿瘤的防治带来了新的契机. p53 基因治疗已从离体细胞实验过度到动物模型基因治疗, 并已步入临床实验阶段, 国内外学者对食管癌的体外、体内基因治疗的实验研究中, 将 p53, p21, p16, Egr-1, FHIT, Cox-2, IL-2, VEGF, E2F-1, N116Y 作为目的基因, 取得了一定的疗效^[15-25], Shimada et al^[26]报道以腺病毒为载体的 p53 治疗 4 例食管癌患者, 尚未发现不良反应. 但总体疗效尚不令人满意, 目前正积极寻求一种或几种能打断细胞癌变共同通道的组织特异性基因作为食管癌基因治疗的突破. p27kip1 是一种抑癌基因, 其编码的蛋白属细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(cyclin dependent kinase inhibitors, CDKI)Cip/Kip 类, 主要作用于 G1 期, 抑制 cyclin E-CDK2 和 cyclin D-CDK4 等 G1 期激酶复合物, 使细胞不能通过 G1 期. 研究表明在食管癌中 p27kip1 表达下降, 与肿瘤细胞的分化程度正相关, 是食管癌的一个独立预后指标, 并认为 p27 表达下降是食管癌发生的早期事件^[27-31]. 由于 p27kip1 的研究起步较晚, 以其作为目的基因的体外、体内治疗的研究不多见, 用于治疗食管癌几近未见报道, 实验表明以腺病毒为载体将 p27kip1 转染肺癌、肾癌、前列腺癌细胞后, p27kip1 在肿瘤细胞内高表达, 细胞停滞于 G1 期, 凋亡增加, 细胞增生受阻, 导入裸鼠移植瘤内, 瘤体生长明显减慢^[32-36], 其中 Park et al^[34]研究发现经治疗后有 20 % 的肺癌裸鼠移植瘤完全消失, 国内学者将外源性 p27kip1 导入肝癌细胞中, 也发现细胞停滞于 G1 期, 生长明显受阻^[37,38], 我们曾研究以腺病毒介导的 p27kip1 转染胃癌细胞株 SGC-7901, 同样表明 p27kip1 能显著抑制细胞增生^[39]. 以上表明 P27kip1 可以作为目的基因用于肿瘤的基因治疗。

我们以 p27kip1 为目的基因, 以腺病毒为载体, 采用直接注射, 体内治疗食管癌. 我们所选用的腺病毒载体缺少基因 E1 区, 而在他们的位置上加入了治疗基因, 由于病毒其他早期基因的表达需要 E1 区基因产物的协助, 所以病毒载体是不能自我复制的, 其装配细胞 293 细胞基因组内嵌有 E1 区基因片段, 并可持续表达 E1 蛋白, 为 E1 区置换的载体提供反式补偿, 这类载体能定位于细胞核 DNA, 高水平表达外源性基因, 且病毒复制缺陷, 不整合入宿主基因组而极少致突变危险, 无野生型病毒污染, 较为安全. 我们的研究表明, 该治疗能有效抑制食管癌肿瘤的生长, 单基因治疗的抑瘤率达 64.1 %, 从肿瘤生长曲线上提示, 瘤体的生长后期较前期加快, 可能与 p27kip1 蛋白的本身的生物学特性有关, p27kip1 蛋白被称为“短寿命蛋白”, 其半衰期较短, 而肿瘤细胞中泛素-蛋白酶体活性的增强, 更加速了 p27kip1 蛋白的降解^[40], 另外蛋白激酶 B 在 p27kip1 胞核定位基序 T157 位置使其磷酸化, 使 p27kip1 滞留于胞质, 不能进入胞核而发挥其作用^[41,42], 这些因素加上治疗后基因表达的快速衰退, 使得该治

疗的肿瘤抑制效应受到一定的限制。

本研究表明, 腺病毒介导的 p27kip1 基因对食管癌具有较显著的体内抑制作用, 提示 p27kip1 可能是一种治疗食管癌较特异性的目的基因, 为基因治疗食管癌提供了一个新的方法, 相信随着对 p27kip1 研究的不断深入, p27kip1 的基因治疗特别是联合多项基因治疗有望步入临床, 在食管癌的治疗上成为新的突破口。

致谢 感谢中国医学科学院陈志高、代金文、孙淑华、王艳荣、华克非、方金玉; 军事医学科学院吴祖泽; 北京大学王刚、彭旭的帮助。

4 参考文献

- Wang LD, Zhou Q, Wei JP, Yang WC, Zhao X, Wang LX, Zou JX, Gao SS, Li YX, Yang C. Apoptosis and its relationship with cell proliferation, p53, Waf1p21, bcl-2 and c-myc in esophageal carcinogenesis studied with a high-risk population in northern China. *World J Gastroenterol* 1998;4:287-293
- Zhang LJ, Chen KN, Xu GW, Xing HP, Shi XT. Congenital expression of mdr-1 gene in tissues of carcinoma and its relation with pathomorphology and prognosis. *World J Gastroenterol* 1999; 5:53-56
- Lin J, Deng CS, Sun J, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. Study on the genetic susceptibility of HLA-DQB1 alleles in esophageal cancer of Hubei Chinese Hans. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:965-968
- Liu J, Chen SL, Zhang W, Su Q. P21^{WAF1} gene expression with P53 mutation in esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1350-1353
- Gu HP, Shang PZ, Su H, Li ZG. Association of CD15 antigen expression with cathepsin D in esophageal carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:259-261
- Qin HY, Shu Q, Wang D, Ma QF. Study on genetic polymorphisms of DCC gene VNTR in esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:782-785
- Wu QM, Li SB, Wang Q, Wang DH, Li XB, Liu CZ. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9: 11-14
- Tan LJ, Jiang W, Zhang N, Zhang XR, Qiu DH. Fas/FasL expression of esophageal squamous cell carcinoma, dysplasia tissues and normal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:15-19
- 周海波, 颜云, 李国庆, 丰义宽, 辛桂霞. 食管癌组织中 DPC₄ 基因的失活. *世界华人消化杂志* 2002;10:102-103
- Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cells lines. *World J Gastroenterol* 2002; 8:203-207
- Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, Liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- Wang AH, Sun CS, Li LS, Huang JY, Chen QS. Relationship of tobacco smoking CYP1A1 GSTM1 gene polymorphism and esophageal cancer in Xi'an. *World J Gastroenterol* 2002;8:49-53
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8:9-22
- Tong Q, Wu QM, Huang YZ, Wang JN, Wang WM, Yu JP. Construction and assessment of replication deficient adenoviral vector containing the cDNA for human p27kip1. *Med J Wuhan Univer* 2002;23:9-12
- Schrump DS, Chen GA, Consuli U, Jin X, Roth JA. Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirally mediated delivery of p16INK4. *Cancer Gene Ther* 1996;3:357-364
- Matsubara H, Koide Y, Sugaya M, Gunji Y, Asano T, Ochiai T, Takegana K, Sakiyama S, Tagawa M. Antitumor response of genetically engineered IL-2 expression to human esophageal carcinoma cells in mature T cell-defective condition. *Int J Oncol* 1998; 13:1217-1222
- Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8:44-48
- Wu MY, Chen MH, Liang YR, Meng GZ, Yang HX, Zhuang CX. Experimental and clinicopathologic study on the relationship between transcription factor Egr-1 and esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:490-495
- Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Trapasso F, Mimori K, Alder H, Mori M, Sozzi G, Baffa R, Huebner K, Croce CM. Effect of adenoviral transduction of the fragile histidine triad gene into esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:1578-1584
- Matsubara H, Maeda T, Gunji Y, Koide Y, Asano T, Ochiai T, Sakiyama S, Tagawa M. Combinatory anti-tumor effects of electroporation-mediated chemotherapy and wild-type p53 gene transfer to human esophageal cancer cells. *Int J Oncol* 2001;18:825-829
- Yang HL, Dong YB, Elliott MJ, Liu TJ, McMasters KM. Caspase activation and changes in Bcl-2 family member protein expression associated with E2F-1-mediated apoptosis in human esophageal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:1579-1589
- Senmaru N, Shichinohe T, Takeuchi M, Miyamoto M, Sazawa A, Ogiso Y, Takahashi T, Okushiba S, Takimoto M, Kato H, Kuzumaki N. Suppression of Erk activation and in vivo growth in esophageal cancer cells by the dominant negative Ras mutant, N116Y. *Int J Cancer* 1998;78:366-371
- Fujii T, Tanaka Y, Tanaka T, Matono S, Sueyoshi S, Fujita H, Shirouzu K, Kato S, Yamana H. Experimental gene therapy using p21/WAF1 gene in esophageal squamous cell carcinoma—adenovirus infection and gene gun technology. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:1651-1654
- Shimada H, Shimizu T, Ochiai T, Liu TL, Sashiyama H, Nakamura A, Matsubara H, Gunji Y, Kobayashi S, Tagawa M, Sakiyama S, Hiwasa T. Preclinical study of adenoviral p53 gene therapy for esophageal cancer. *Surg Today* 2001;31:597-604
- Guo WZ, Ran YL, Liu J, Yu L, Sun LX, Yang ZH. Enhancement by hypoxia of antisense VEGF(165) gene expression in esophageal cancer cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2002; 34:625-629
- Shimada H, Matsubara H, Ochiai T. Gene therapy for esophageal cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2002;103:371-375
- Singh SP, Lipman J, Goldman H, Ellis FH Jr, Aizenman L, Cangi MG, Signoretti S, Chiaur DS, Pagano M, Loda M. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998;58:1730-1735
- Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K, Iida S, Ichimaru N, Nagamoto N, Sakaguchi T. Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1634-1640
- Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M. Loss of p27(KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2000;58:152-158
- Shibata H, Matsubara O, Wakiyama H, Tanaka S. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 2001;197:157-164
- Taniere P, Martel-Planche G, Saurin JC, Lombard-Bohas C, Berger F, Scoazec JY, Hainaut P. TP53 mutations, amplification of P63 and expression of cell cycle proteins in squamous cell carcinoma of the oesophagus from a low incidence area in western Europe. *Br J Cancer* 2001;85:721-726
- Craig C, Wersto R, Kim M, Ohri E, Li Z, Katayose D, Lee SJ, Trepel J, Cowan K, Seth P. A recombinant adenovirus expressing p27Kip1 induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 1997;14:2283-2289
- Naruse I, Hoshino H, Dobashi K, Minato K, Saito R, Mori M. Over-expression of p27kip1 induces growth arrest and apoptosis mediated by changes of pRb expression in lung cancer cell lines. *Int J Cancer* 2000;88:377-383
- Park KH, Seol JY, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Lee EH, Kim CM, Shim YS, Lee CT. Adenovirus expressing p27(Kip1) induces

- growth arrest of lung cancer cell lines and suppresses the growth of established lung cancer xenografts. *Lung Cancer* 2001;31:149-155
- 35 Katner AL, Gootam P, Hoang QB, Gnarr JR, Rayford W. A recombinant adenovirus expressing p27(Kip1) induces cell cycle arrest and apoptosis in human 786-0 renal carcinoma cells. *J Urol* 2002;168:766-773
- 36 Katner AL, Hoang QB, Gootam P, Jaruga E, Ma Q, Gnarr J, Rayford W. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells by a recombinant adenovirus expressing p27(Kip1). *Prostate* 2002;53:77-78
- 37 Li J, Yang XK, Yu XX, Ge ML, Wang WL, Zhang J, Hou YD. Overexpression of p27 (KIP1) induced cell cycle arrest in G1 phase and subsequent apoptosis in HCC-9204 cell line. *World J Gastroenterol* 2000;6:513-521
- 38 Li J, Wang W, Yu X, Yang X, Hou Y. Overexpression of p27(KIP1) induced by Bak gene leads to the arrest in G(1) phase of HCC-9204 cell line. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9(Suppl):27-29
- 39 Tong Q, Wu QM, Liu CZ, Yu JP. Effect of adenovirus mediated human p27kip1 antioncogene on the proliferation in gastric cancer cell lines SGC-7901. *Zhongliu Fangzhi Yanjiu* 2002;29:96-98
- 40 Lim MS, Adamson A, Lin Z, Perez-Ordenez B, Jordan RC, Tripp S, Perkins SL, Elenitoba-Johnson KS. Expression of Skp2, a p27 (Kip1) ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: correlation with p27(Kip1) and proliferation index. *Blood* 2002;100:2950-2956
- 41 Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002;8:1153-1160
- 42 Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tschlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002;8:1136-1144

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

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊讯 美国科学信息研究所 (ISI) 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为世界胃肠病学杂志英文版(WJG)影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108. Science Citation Index- Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 44 种, 其中包括 WJG. Current Contents/Clinical Medicine®(即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 36 种, 其中包括 WJG. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病杂志 43 种, 其中包括 WJG. WJG 由 122 位胃肠病学学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区. WJG 被美国《医学索引 (Index Medicus / MEDLINE)》, 美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA), 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘 (EMBASE/ Excerpta Medica, EM)》, 俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录. 国内被中国科技论文统计与分析, 世界消化学网数据库收录, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. WJG, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种. WJG 在众多消化类期刊中惟一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268. WJG® 2003 年月刊, 大 16 开, 256 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261. E-mail: wjg@wjgnet.com <http://www.wjgnet.com> (世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)



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

