

- Tahara E. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clinical Cancer Res* 1995;1:1245-1251
- 4 Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clinical Cancer Res* 2000;6:2696-2701
- 5 Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:2533-2536
- 6 Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature (Lond)* 1990;346:866-868
- 7 Hiyama E, Gollahan L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:116-122
- 8 Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995;155:3711-3715
- 9 Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:895-902
- 10 Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2900-2904
- 11 Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *J Neture Med* 1995;1:249-255
- 12 Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *J Clinical Cancer Res* 1997;3:1931-1941
- 13 Ohta K, Kanamaru T, Yamamoto M, Saitoh Y. Clinical significance of telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *Kobe J Med Sci* 1996;42:207
- 14 Rogalla P, Rohen C, Bonk U, Bullerdiek J. Telomeric repeat fragment lengths are not correlated to histological grading in 85 breast cancers. *Cancer Lett* 1996;106:155-161
- 15 骆成玉, 李世拥, 李鸿义, 赵丹宁, 曲军, 祝学光. 大肠癌患者粪便标本的端粒酶活性研究. *中华外科杂志* 2001;39:580-582

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 •

多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达

尹朝晖, 刘浚阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平

尹朝晖, 刘浚阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平, 中南大学湘雅三医院普外科湖南省长沙市 410013

项目负责人: 刘浚阳, 410013, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅三医院普外科. yzh0451@yahoo.com.cn

电话: 0731-8618451

收稿日期: 2003-04-03 接受日期: 2003-05-19

摘要

目的: 探讨多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达及其意义。

方法: 实验组大鼠行门静脉两步结扎加左肾上腺静脉结扎; 应用免疫组化SP染色法检测iNOS、ecNOS、ET-1、及TNF- α 在大鼠结肠黏膜中的表达情况。

结果: 实验组 iNOS、ET-1、及 TNF- α 表达较对照组增强(2.97 ± 0.51 vs 2.33 ± 0.76 ; 2.01 ± 0.32 vs 1.38 ± 0.74 ; 2.57 ± 0.64 vs 1.67 ± 0.36 , $P < 0.05$), ecNOS 无明显变化(2.01 ± 0.69 vs 1.87 ± 0.56 , $P > 0.05$)。

结论: iNOS、ET-1、TNF- α 参与门脉高压大鼠结肠黏膜局部病变。

尹朝晖, 刘浚阳, 黄飞舟, 黄穰浪, 任树平. 多种因子在门脉高压大鼠结肠黏膜中的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(10):1640-1642

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1640.asp>

0 引言

随着门脉高压性结肠病变(portal hypertensive colopathy,

PHC)^[1]概念的提出, 局部体液因子的改变在 PHC 病因学中的作用渐受关注, 但有关此方面的报道甚少^[2]. 本文选取具有不同作用的一氧化氮合酶(NOS)、内皮素 1(ET-1)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 应用免疫组化技术检测他们在门脉高压大鼠结肠黏膜局部的表达情况, 以期探讨门脉高压大鼠结肠黏膜病变中体液因子的变化及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 (1)动物与分组: 20 只 δ SD 大鼠 (225-275 g, 购自中南大学湘雅医学院实验动物中心) 随机分成两组, 实验组行门静脉两步法结扎加左肾上腺静脉结扎手术; 对照组为假手术组. (2)试剂: 兔抗大鼠 ecNOS 多克隆抗体、兔抗大鼠 iNOS 多克隆抗体、兔抗大鼠 ET-1 多克隆抗体、山羊抗大鼠 TNF- α 多克隆抗体、通用型 S-P 染色试剂盒、生物素标记兔抗山羊 IgG 染色试剂盒及 DAB 购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法 (1)动物模型制备: 对 Tanoue et al^[3]方法加以改进, 应用门静脉两步法结扎加左肾上腺静脉结扎制备门脉高压大鼠模型. (2)门静脉完全结扎后 2 wk, 将两组大鼠麻醉后开腹, 找到肠系膜上静脉, 剪一小口, 将一根充满生理盐水的硬膜外导管置入静脉近端, 以鼠右心房水平为“0”点, 测定门静脉压力. 其后小心切除

小段乙状结肠, 常规固定、脱水、透明、石蜡包埋。(3) 免疫组化 SP 染色法 抗原修复(NOS、ET-1应用 EDTA 煮沸 20 min; TNF- α 应用柠檬酸缓冲液煮沸 20 min), 余同说明; DAB 显色; PBS 代替一抗作阴性对照。(4) 判断标准: 反应产物的染色强度以光密度值(optical density, OD 值)表示。选取结肠不同部位(黏膜、黏膜下层、肌层), 每一部位随机选 5 处, 应用计算机辅助 HPIAS-1000 图像分析系统测定反应产物的 A 值(若无记为 0), 每一标本取平均 A 值。

统计学处理 应用 SPSS10.0 for window 统计软件分析, 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况及静脉压力 实验组大鼠腹壁血管、肠系膜血管扩张较对照组明显; 实验组大鼠有两只可见腹腔内有少量腹水生成, 余大鼠及对照组未见明显腹水生成; 实验组大鼠门静脉压力较对照组明显升高(20.90 ± 3.27 cm H₂O vs 11.43 ± 1.55 cm H₂O, $P < 0.01$)。

2.2 NOS 表达情况 NOS 表达阳性细胞为胞质内棕黄色颗粒, 可见于黏膜上皮、肠腺腺腔、黏膜下层血管内皮, 同时在黏膜表面及肌层也可见黄染产物。实验组中 iNOS 的表达强度明显高于对照组(2.97 ± 0.51 vs 2.33 ± 0.76 , $P < 0.05$), 但 ecNOS 的表达强度两组间无明显差异(2.01 ± 0.69 vs 1.87 ± 0.56 , $P > 0.05$)。

2.3 ET-1 表达情况 阳性表达为棕黄色颗粒, 主要见于黏膜下层、黏膜上皮, 黏膜表面及肌层亦可见少量黄染。实验组表达强度高于对照组(2.01 ± 0.32 vs 1.38 ± 0.74 , $P < 0.05$)。

2.4 TNF- α 表达情况 阳性表达于黏膜层可见黄染产物, 阳性细胞为胞质内可见棕黄色颗粒; 实验组 TNF- α 表达强度较对照组明显增高(2.57 ± 0.64 vs 1.67 ± 0.36 , $P < 0.01$)。

3 讨论

门脉高压症肠黏膜病变发病机制至今尚不清楚。既然分流手术可使 PHC 好转, 提示门静脉压力与 PHC 间有一定相关关系^[4-6], 然而也有研究发现 PHC 与 HVPG 无明显相关^[7], 故在 PHC 形成中门静脉压力升高可能并非惟一因素。随着对门静脉高压症胃黏膜病变认识的加深, 血管活性因子等体液因子在 PHC 中的作用受到关注, 初步研究提示局部体液因子参与 PHC 的发展进程^[2]。有学者研究认为门静脉结扎制作的大鼠门脉高压模型可用于 PHC 的研究^[2], 本研究中门静脉完全结扎后 2 wk, 实验组大鼠门静脉压力较对照组明显升高, 认为门脉高压大鼠模型制作成功。

内源性 NO 是一种强烈的血管舒张因子, 也是新型的细胞内信使和神经递质, 在机体的病理生理过程中有重要作用^[8]。由于 NO 稳定性差, 半衰期甚短, 直接

测定十分困难, 作为合成 NO 的惟一限速酶 NOS 成为研究 NO 的重要手段。本研究中, 实验组结肠中 iNOS 的表达强度明显高于对照组($P < 0.05$), 但 ecNOS 在结肠中的表达强度两组间无明显差异($P > 0.05$)。其升高可能是由于升高的门脉压力使肠道回流受阻, 肠道淤血、水肿, 肠黏膜屏障受损, 毒素物质移位、入血, 同时由于回流受阻, 高毒素血液在肠局部较长时间的刺激血管内皮等, 使 iNOS 生成增加, 这必然使 NO 生成增加, 致血管扩张, 加重淤血。尚有学者认为 NO 使平滑肌舒张, 调节胃肠动力^[9], NO 升高使结肠运动功能减弱, 延长了黏膜与损伤因素接触时间, 而加剧结肠黏膜损伤。本研究中结肠处 ecNOS 无明显变化, 可能在 PHC 不起重要作用。

ET-1 可通过其受体起多效性的生物作用^[10], 对于门脉高压症肠道黏膜中 ET-1 表达情况尚未见报道。本研究中, ET-1 在实验组表达强度高于对照组。一方面, 在通常情况下, 扩血管物质与缩血管物质的释放和激活处于一动态平衡, 以此提供一相对稳定的微环境, ET-1 升高可保持局部微环境相对稳定; 另一方面, 由于 ET-1 尚可诱导黏膜损伤^[11], 过量表达的 ET-1 必使肠道黏膜进一步受损。

TNF- α 是一种细胞毒性蛋白, 研究表明 TNF- α 不仅可激活 NOS 基因^[12, 13], 也可激活 ET-1 基因^[14]。本研究中 TNF- α 在实验组表达强度高于对照组, 升高可能为回流受阻, 水肿、淤血使肠黏膜屏障受损, 毒素物质移位, 诱使肠道黏膜局部 TNF- α 生成增加。TNF- α 升高既可激活 ET-1、NOS 基因, 而参与门脉高压症结肠黏膜病变过程; 同时 TNF- α 尚可增加血管通透性^[15], 其升高也加重肠壁水肿、损伤黏膜屏障而加重局部病变。

由此可见, 门脉高压结肠黏膜病变是多因素共同作用的结果, 其机制尚有待进一步阐明。

4 参考文献

- 1 Naveau S, Bedossa P, Poynard T, Mory B, Chaput JC. Portal hypertensive colopathy. A new entity. *Dig Dis Sci* 1991;36:1774-1781
- 2 Ohta M, Kaviani A, Tarnawski AS, Itani R, Sugimachi K, Sarfeh II. Portal hypertension triggers local activation of inducible nitric oxide synthase gene in colonic mucosa. *J Gastrointest Surg* 1997;1:229-235
- 3 Tanoue K, Kitano S, Hashizume M, Wada H, Sugimachi K. A rat model of esophageal varices. *Hepatology* 1991;13:353-358
- 4 Kozarek RA, Botoman VA, Bredfeldt JE, Roach JM, Patterson DJ, Ball TJ. Portal colopathy: prospective study of colonoscopy in patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1991;101:1192-1197
- 5 Ganger DR, Preston A, Sankary H. Colonic lesions in portal hypertension. *Gastrointest Endosc* 1993;39:212-213
- 6 Ponce Gonzalez JF, Dominguez Adame Lanuza E, Martin Zurita I, Morales Mendez S. Portal hypertensive colopathy: histologic appearance of the colonic mucosa. *Hepatogastroenterology* 1998;45:40-43
- 7 Chen LS, Lin HC, Lee FY, Hou MC, Lee SD. Portal hypertensive colopathy in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:490-494
- 8 Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-918

- 9 Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992;262:G379-392
- 10 Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356-363
- 11 Lazaratos S, Kashimura H, Nakahara A, Fukutomi H, Osuga T, Urushidani T, Miyauchi T, Goto K. Gastric ulcer induced by submucosal injection of ET-1: role of potent vasoconstriction and intraluminal acid. *Am J Physiol* 1993;265(3Pt 1):G491-G498
- 12 Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996;23:1616-1621
- 13 Ohta M, Tarnawski AS, Itani R, Pai R, Tomikawa M, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Tumor necrosis factor alpha regulates nitric oxide synthase expression in portal hypertensive gastric mucosa of rats. *Hepatology* 1998;27:906-913
- 14 Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol* 1992;262(4 Pt 1):C854-C861
- 15 Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1364-1370

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 •

黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 Ca^{2+} 的抑制作用

台卫平, 罗和生

台卫平, 罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市武昌区解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. luotang@public.wh,hb.cn
电话: 027-88041919-2134
收稿日期: 2003-01-10 接受日期: 2003-02-19

摘要

目的: 探讨黄连素对人结肠癌细胞系 HT-29 的作用及与 Ca^{2+} 有关的机制, 为黄连素作为一种新的结肠癌化学治疗药物进行理论上的准备和提供相关实验结果.

方法: 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.3 $\mu\text{mol/L}$, 3.0 $\mu\text{mol/L}$, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的黄连素加入到 HT-29 结肠癌细胞系培养液中. 分别在第 1 d, 第 2 d, 第 3 d 测量各有关值. 以 bapta-AM (33 $\mu\text{mol/L}$) 为细胞内 Ca^{2+} 螯合剂, verapamil (50 mmol/L) 为细胞膜 Ca^{2+} 通道拮抗剂, 分别抑制细胞内 Ca^{2+} 和细胞膜 Ca^{2+} 通道, 对比观察黄连素对细胞内 Ca^{2+} 的影响及结肠癌细胞在不同 Ca^{2+} 浓度条件下各有关值. 细胞记数检测细胞的生长和增生, 用免疫荧光分光光度法检测细胞内 Ca^{2+} 浓度.

结果: 黄连素在浓度大于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时则有明显的量效关系抑制结肠癌细胞的生长. 黄连素在浓度大于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞内 Ca^{2+} 的释放有抑制作用.

结论: 黄连素能够抑制 Ca^{2+} 的释放可能为黄连素抑制 HT-29 细胞生长和增生的一个机制.

台卫平, 罗和生. 黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 Ca^{2+} 的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1642-1644

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1642.asp>

0 引言

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 他严重地危害着人们的身体健康. 目前临床上结肠癌常用的化疗药物毒副作用

用大, 寻找新的化疗效果好、毒副作用小的药物, 可以提高结肠癌患者的治疗效果, 提高患者的生存期及生存质量. 已有研究证实黄连素(berberine, ber)对平滑肌细胞内 Ca^{2+} 有作用^[1]. Ca^{2+} 作为第二信使可能以某种形式参与肿瘤生长和繁殖的调节^[2]. 本题采用细胞培养的方法, 将黄连素加入到结肠癌细胞培养环境中, 观察培养上清中细胞内 Ca^{2+} 的改变, 同时观察 ber 对结肠癌细胞生长、增生的影响, 为 ber 作为一种新的结肠癌化疗药物进行理论上的研究.

1 材料和方法

1.1 材料 细胞系: HT-29 细胞系购自中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 该细胞系由该所引自 ATCC. 主要试剂和仪器: berberine (Sigma), Fura-2/AM (Sigma), bapta-AM (Sigma), verapamil (Sigma), 日本产岛津 RF-5000 荧光分光光度计.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HT-29 以 RPMI-1640 为培养液, 加入 100 mL/L 热灭活的 FBS 及青霉素和链霉素, HT-29 细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 培养箱中培养, 以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞接种 24 h 后, 分组加药: 终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.3 $\mu\text{mol/L}$, 3.0 $\mu\text{mol/L}$, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 ber 加入到 HT-29 结肠癌细胞系培养液中. 以 bapta-AM (33 $\mu\text{mol/L}$) 为细胞内 Ca^{2+} 螯合剂, verapamil (30 mmol/L) 为细胞膜 Ca^{2+} 通道拮抗剂, 分别抑制胞内 Ca^{2+} 及胞膜钙通道, 对比观察黄连素对细胞内 Ca^{2+} 的影响. 24 h 后测量钙离子浓度.

1.2.2 生长曲线的绘制 采用氮兰四唑盐实验(MTT)法, 取对数生长期的 HT-29 细胞按传代方式制成单细胞悬液, 以每孔 4×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h 后, 弃去原细胞培养液, 实验组每孔加入 ber