

• 实验研究 Experimental research •

多烯紫杉醇对人胆管癌细胞和胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响

尚鸣昇, 张 岩, 高晓龙, 唐俊军, 席 芊, 黄宗良, 胡美玉, 王培军

【摘要】 目的 评价多烯紫杉醇对人胆管癌细胞 HCCC-9810 和胰腺癌细胞 BXP-3 的增殖和凋亡影响,为药物涂层支架治疗恶性梗阻性黄疸的应用提供实验基础。方法 应用四硝基偶氮唑蓝法测定紫杉醇对人胆管癌细胞 HCCC-9810 和胰腺癌细胞 BXP-3 增殖的抑制作用, Hoechst 染色法检测诱导细胞凋亡。结果 多烯紫杉醇可明显抑制 2 种肿瘤细胞株的增殖,且该抑制效应随药物剂量的增加和作用时间的延长而增强(HCCC: $\chi^2 = 24.42$, $P < 0.01$; BXP-3: $\chi^2 = 24.68$, $P < 0.01$),根据增殖曲线和统计学分析,选取 0.4 mg/L 为多烯紫杉醇最适实验浓度。凋亡分析实验显示多烯紫杉醇可诱导 2 种肿瘤细胞株的凋亡(HCCC: $\chi^2 = 30.05$, $P < 0.01$; BXP-3: $\chi^2 = 25.22$, $P < 0.01$)。结论 多烯紫杉醇有抑制 BXP-3 和 HCCC-9810 的增殖并诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

【关键词】 胰腺癌;胆管细胞癌;多烯紫杉醇;增殖;凋亡

中图分类号:R735.8;R735.9 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2010)-01-0046-03

The effect of docetaxel on the proliferation and apoptosis of human cholangiocarcinoma cell line and pancreatic cancer cell line SHANG Ming-yi, ZHANG Yan, GAO Xiao-long, TANG Jun-jun, XI Qian, HUANG Zong-liang, HU Mei-yu, WANG Pei-jun. Department of Radiology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

Corresponding author: SHANG Ming-yi

【Abstract】 Objective To assess the effect of docetaxel on the proliferation and apoptosis of human cholangiocarcinoma cell line HCCC-9810 and pancreatic cancer cell line BXP-3, in order to provide the experimental basis for the clinical treatment of malignant obstructed jaundice with covered stents. Methods MTT assay and Hoechst staining were used to examine the growth inhibition and apoptosis effect on the two cell lines induced by docetaxel. Results Docetaxel could markedly inhibit the proliferation of the two cell lines and the inhibition effect was strengthened with time and dosage (HCCC: $\chi^2 = 24.42$, $P < 0.01$, BXP-3: $\chi^2 = 24.68$, $P < 0.01$). Apoptosis assay showed that docetaxel could induce the cell apoptosis for both HCCC-9810 and BXP-3 (HCCC: $\chi^2 = 30.05$, $P < 0.01$; BXP-3: $\chi^2 = 25.22$, $P < 0.01$). Conclusion Docetaxel can inhibit cell proliferation and induce apoptosis in human cholangiocarcinoma cell line HCCC-9810 and pancreatic cancer cell line BXP-3. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 046-048)

【Key words】 pancreatic cancer; cholangiocarcinoma; docetaxel; proliferation; apoptosis

胆管癌和胰腺癌是临床上引起恶性梗阻性黄疸最常见的病因。目前,胆管内支架是治疗恶性梗阻的重要方法之一,其具有恢复胆汁引流,无需携带引流管,创伤小等优点。但支架术后再狭窄的发生率仍然很高,降低术后再狭窄率对于改善恶性梗阻的预后有着非常重要的意义。药物涂层支架是目

前最受关注的改进方法,研究者期望能通过化疗药物在支架局部的持续释放抑制肿瘤细胞增殖,减少或延缓再狭窄的发生。本研究通过体外实验观察多烯紫杉醇对人胆管癌细胞系 HCCC-9810 和胰腺癌 BXP-3 增殖和凋亡的影响,为多烯紫杉醇涂层支架的开发及其在恶性梗阻性黄疸治疗中的应用提供理论基础和实验依据。

作者单位:200065 上海 同济大学附属同济医院放射科
(尚鸣昇、张 岩、高晓龙、唐俊军、席 芊、黄宗良);复旦大学
附属中山医院中心实验室(胡美玉)

通信作者:尚鸣昇

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基(GIBICO 公司,美国),新生牛血清(PAA 公司,澳大利亚),Hoechst 染色试剂盒(碧云天公司,中国),多烯紫杉醇(20 mg,齐鲁制药有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胆管癌细胞系 HCCC-9810 和胰腺癌 BXP-3 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。培养条件均为:DMEM + 10%新生牛血清,37℃,5%CO₂ 及饱和湿度培养。

1.2.2 四硝基偶氮唑蓝法(MTT 法)测定细胞增殖 分别将 2 株细胞接种于 96 孔板,接种数量均为 1×10^4 /孔。细胞贴壁后加入多烯紫杉醇,共设 7 个药物浓度,分别为 0、0.0004、0.004、0.04、0.4、4 和 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。且每个浓度梯度于 1、3、5、7 d 共 4 个时间点进行 MTT 反应,每检测点设 3 个复孔。检测前 4 h 吸干培养液。每孔加入 200 μl 新鲜培养液,再加入 20 μl MTT 储存液,摇匀后继续培养 4 h。吸干反应液,加入 DMSO 150 μl /孔。将平板置于微孔板振荡器上振荡 10 min。540 nm 测吸光度(A)值,DMSO 作为阴性对照。根据 A 值绘制曲线,比较不同浓度药物在不同时间点对 2 个细胞株的增殖影响。并选取最适药物浓度进行后续凋亡检测。

1.2.3 多烯紫杉醇对细胞凋亡影响的检测 部分实验选用 Hoechst 染色试剂盒进行检测。将盖玻片置于 6 孔板内,种入细胞培养过夜,使为 50%~80%。以适当浓度多烯紫杉醇刺激细胞,分别于加药后第 1、5 天进行检测。加入 0.5 ml 固定液,固定 10 min,加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液,染色 5 min。荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。激发波长在 350 nm 左右,发射波长在 460 nm 左右。

1.3 统计学处理

所有数据应用 Excel 2003 及 SPSS10.0 软件进行数据处理与分析,多烯紫杉醇对 2 种肿瘤细胞株的增殖及凋亡影响均采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多烯紫杉醇对人胆管癌细胞系 HCCC-9810 和胰腺癌细胞系 BXP-3 增殖的影响

根据不同药物浓度对应的不同时间点所测得的 A 值,绘制增殖曲线(图 1、2)。可以发现在同一时间点,药物对细胞的增殖抑制作用与药物浓度呈正相关,而当药物浓度一致时,增殖抑制效应亦随着作用时间的延长而增强(HCCC: $\chi^2 = 24.42, P < 0.01$;

BXP-3: $\chi^2 = 24.68, P < 0.01$)。在药物浓度为 0.4 mg/L 时,这种效应最为明显,为本实验的最适药物浓度,我们选取该浓度进行后续的凋亡检测试验。

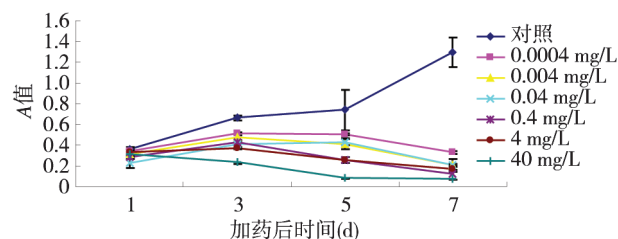


图 1 不同浓度紫杉醇对胰腺癌细胞系 BXP-3 的增殖影响

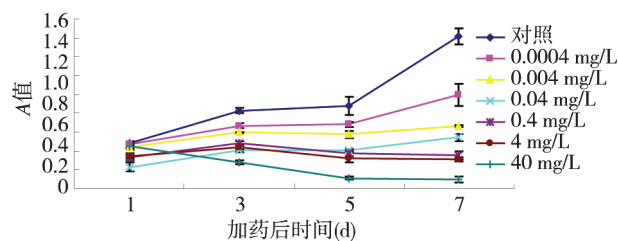


图 2 不同浓度紫杉醇对胆管细胞癌细胞系 BXP-3 的增殖影响

2.2 多烯紫杉醇对人胆管癌细胞系 HCCC-9810 和胰腺癌细胞系 BXP-3 凋亡的影响

荧光显微镜下可见从加药后第 1 天开始细胞即出现核固缩、浓聚的凋亡特征性改变,该现象随药物作用的时间增长而更加明显。至加药后第 5 天,2 种细胞株的凋亡比率均在 20% 以上。每个检测点随机计数 100 个细胞中凋亡细胞的比率,每株细胞重复 5 次,取平均值作为该检测点的细胞凋亡率,见表 1。数据分析显示多烯紫杉醇对 2 种细胞株均有明显的促凋亡作用(HCCC: $\chi^2 = 30.05, P < 0.01$; BXP-3: $\chi^2 = 25.22, P < 0.01$)。

表 1 加药前后 2 种细胞株的凋亡率比较

组别	凋亡发生率	
	BXP-3(%)	HCCC-9810(%)
对照组	2.00 ± 1.48	2.00 ± 1.14
试验组		
加药后第 1 天	10.00 ± 2.07	14.00 ± 4.39
加药后第 5 天	25.00 ± 3.21	30.00 ± 4.69
统计分析结果	$\chi^2 = 25.22, P < 0.01$	$\chi^2 = 30.42, P < 0.01$

3 讨论

由胆管癌、胰腺癌、原发性肝癌和肝门部淋巴结转移癌等各种肿瘤引起的胆道系统恶性梗阻性黄疸,特别是肝门部胆道狭窄是临床较难处理的问题,发现时多为晚期,仅 5%~20% 患者可以接受外科切除和分流术,患者生存期不足 3 个月^[1]。近年来随着治疗技术的发展,特别是胆道内支架的应用,在治疗恶性梗阻性黄疸上取得了较为肯定的疗

效。尽管胆道内支架有很多优点,但仍有 35%~50% 的病例在生存期内发生再梗阻。再梗阻的发生主要因为肿瘤的生长和胆泥的沉积,肿瘤生长主要包括:①是肿瘤组织向支架腔内生长;②肿瘤组织侵犯支架两端胆总管。因此,控制肿瘤的生长是提高疗效的关键。但是放射治疗时,由于瘤体周围有肝脏、胰腺、胃肠道、肾脏等对射线敏感的器官,限制了外照射剂量,影响了疗效的提高;而引起胆管恶性梗阻的多为胆管癌或胰腺癌等乏血供肿瘤,动脉灌注化疗栓塞的治疗效果也有限^[2]。有学者报道利用 PTCD 途径进行腔内照射,并取得良好的临床效果,阐述局部直接治疗可能会较好地控制肿瘤生长,防止再狭窄^[3]。近年来,药物涂层支架在血管狭窄性疾病的临床研究方面取得了许多突破性进展,提示药物涂层支架既可提供对胆管的机械支撑作用,又可通过局部药物的缓释作用抑制局部肿瘤细胞的生长,预防再狭窄。有鉴于此,我们选择紫杉醇作为治疗药物进行相关的研究。

紫杉醇具有聚合和稳定微管的作用,使分裂的细胞固定在有丝分裂阶段,使细胞复制受阻,细胞周期停滞,从而抑制细胞增生。有文献报道紫杉醇支架可以预防支架内再狭窄^[4]。本研究应用不同浓度多烯紫杉醇作用于人胆管癌细胞系 HCCC-9810 和胰腺癌细胞系 BXP-3,通过 MTT 法及凋亡检测分析该药对 2 株肿瘤细胞增殖和凋亡的影响。实验结果显示,多烯紫杉醇对 2 种细胞株的增殖均有明显抑制作用。且该效应与药物浓度和作用时间呈正相关。在药物浓度为 0.4 mg/L 时,这种效应最为明显,为最适药物浓度。凋亡检测发现从加药后第 1 天开始,细胞即出现核固缩、浓聚的凋亡特征性改变,该现象随药物作用时间增长而更加明显。至加药后第 5 天,2 种细胞株的凋亡率均在 20% 以上。可

见多烯紫杉醇对 2 种肿瘤细胞株均有明显的抑制增殖效应,且这种效应很大一部分是通过诱导肿瘤细胞凋亡实现的。紫杉醇的诱导凋亡效应在其他肿瘤也有报道^[5-6]。

本研究结果为多烯紫杉醇药物涂层支架的开发和应用提供了一定的实验基础,也为恶性梗阻的治疗提供新的思路,对于改变患者的预后有着重要的意义。本研究提示多烯紫杉醇支架应用于恶性梗阻性黄疸的治疗有很广阔的前景,但其能否真正的用于临床尚需体内实验进行更为深入细致的探讨与分析。

[参考文献]

- [1] De Palma GD, Galloro G, Siciliano S. Unilateral versus bilateral endoscopic hepatic duct drainage in patients with malignant hilar biliary obstruction: results of a prospective, randomized, and controlled study[J]. *Gastrointest Endosc*, 2001, 53: 547 - 553.
- [2] 陈 颀, 王小林, 王建华. 胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗恶性梗阻性黄疸[J]. *复旦学报(医学科学版)*, 2001, 28: 516.
- [3] 张福君, 吴沛宏, 顾仰葵, 等. 恶性梗阻性黄疸患者内支架植入术后近距离治疗的临床价值[J]. *癌症*, 2004, 23: 1567.
- [4] Tanabe K, Serruys PW, Grube E. et al. TAXUS III Trial: in-stent restenosis treated with stent-based delivery of paclitaxel incorporated in a slow-release polymer formulation[J]. *Circulation*, 2003, 107: 559 - 564.
- [5] Nakahara C, Nakamura K, Yamanaka N, et al. Cyclosporin-A enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of nuclear factor- κ B activation in human gastric carcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 5409 - 5416.
- [6] Kindwall-Keller T, Otterson GA, Young D, et al. Phase II evaluation of docetaxel-modulated capecitabine in previously treated patients with non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 1870 - 1876.

(收稿日期:2009-09-25)

多烯紫杉醇对人胆管癌细胞和胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响

作者: 尚鸣异, 张岩, 高晓龙, 唐俊军, 席芊, 黄宗良, 胡美玉, 王培军
作者单位: 尚鸣异, 张岩, 高晓龙, 唐俊军, 席芊, 黄宗良, 王培军 (同济大学附属同济医院放射科, 上海, 200065), 胡美玉 (复旦大学附属中山医院中心实验室)
刊名: 介入放射学杂志 **ISTIC** **PKU**
英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY
年, 卷(期): 2010, 19(1)
被引用次数: 0次

参考文献(6条)

1. De Palma GD, Gailoro G, Siciliano S. Unilateral versus bilateral endoscopic hepatic duct drainage in patients with malignant hilar biliary obstruction: results of a prospective, randomized, and controlled study[J]. *Gastrointest Endosc*, 2001, 53: 547-553.
2. 陈颐, 王小林, 王建华. 胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗恶性梗阻性黄疸[J]. *复旦学报(医学科学版)*, 2001, 28: 516.
3. 张福君, 吴沛宏, 顾仰葵, 等. 恶性梗阻性黄疸患者内支架植入术后近距离治疗的临床价值[J]. *癌症*, 2004, 23: 1567.
4. Tanabe K, Serruys PW, Grube E, et al. TAXUS III Trial: in-stent restenosis treated with stent-based delivery of paclitaxel incorporated in a slow-release polymer formulation[J]. *Circulation*, 2003, 107: 559-564.
5. Nakahara C, Nakamura K, Yamanaka N, et al. Cyclosporin-A enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of nuclear factor- κ B activation in human gastric carcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 5409-5416.
6. Kindwall-Keller T, Otterson GA, Young D, et al. Phase II evaluation of docetaxel-modulated capecitabine in previously treated patients with non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 1870-1876.

相似文献(9条)

1. 学位论文 马焕先 抗人FXYP3单克隆抗体的制备应用及蓖麻毒素细胞毒作用的实验研究 2008

研究目的:

1. 研制抗人FXYP3单克隆抗体并对其进行生物学鉴定;
2. 探讨FXYP3在肝胆系统肿瘤中的组织学分布及与肿瘤组织的生物学行为关系, 揭示FXYP3蛋白在肿瘤演变过程中与其可能存在的内在联系;
3. 从蓖麻籽中提取蓖麻毒素并对其进行生化鉴定;
4. 比较肝胆肿瘤细胞系对蓖麻毒素毒性作用的敏感性及各毒素对FXYP3表达水平的影响, 为本系列后期研究蓖麻毒素与抗人FXYP3单克隆抗体相连的免疫毒素及其在体内作用的实验研究提供依据。

研究方法:

1. 采用BioSunV1.0分析软件分析FXYP3抗原抗体结合特性的优势抗原表位, 采用固相合成法合成多肽并与载体蛋白KLH偶联后免疫BALB/c小鼠, 利用Kohler与Milstein于1975年创建的杂交瘤技术制备抗人FXYP3单克隆抗体, 并对其进行特性分析; 间接ELISA方法测定抗体的相对亲和常数, Western-Blot法检测抗体的特异性, 通过免疫细胞化学检测FXYP3在胰腺癌BxPc-3细胞系中的表达, 并观察FXYP3蛋白在细胞中的定位;
2. 用制备好的FXYP3单克隆抗体检测肿瘤细胞系原发性肝癌HepG2、胆管细胞癌Hccc-9810、胰腺癌BxPc-3及肿瘤组织中的表达。免疫组化和免疫细胞化学及Western-Blot法定性判断FXYP3蛋白是否表达, Real-time PCR法定量判断FXYP3蛋白的表达程度;
3. 将传统的由Nicolson与Blaustein创建的提取方法稍加改进, 从蓖麻种子中提取天然蓖麻毒素并利用Sephacrose 4B亲和层析法进行纯化, SDS-PAGE电泳进行鉴定;
4. 以肿瘤细胞系原发性肝癌HepG2、胆管细胞癌Hccc-9810、胰腺癌BxPc-3为研究对象, MTT比色法分析蓖麻毒素对不同肿瘤细胞的抑制作用, 流式细胞分析法分析其对Hccc-9810细胞周期的影响及蓖麻毒素与肿瘤细胞系共培养研究该毒素对FXYP3在不同细胞中表达的影响。

研究结果:

1. 获得了4株稳定分泌抗人FXYP3的杂交瘤细胞株, 其中76-02F1E8特异性最显著, 效价可达 $1:105$, 亲和常数为 $3.11 \times 10^8 \text{L/mol}$ 。所有分泌的抗体亚型均为IgG1型, 轻链为 κ 链;
2. 原发性肝癌、胆管癌、胃癌、乳腺癌均有FXYP3蛋白的表达, 且前两者与相应的癌旁组织相比, 表达有统计学差异($P < 0.05$); 胆管癌组织FXYP3的表达与肿瘤细胞的分化程度相关。胰腺癌BxPc-3、胆管细胞癌Hccc-9810与原发性肝癌HepG2均阳性表达FXYP3, 且表达程度依次降低。
3. 从500g蓖麻籽中提取到10.25mg蓖麻毒素, 浓度为 1.3mg/ml ;
4. 蓖麻毒素对肝癌细胞、胰腺癌细胞和胆管癌细胞的抑制作用在不同浓度下($1 \times 10^{-11} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 和 $1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$)无差异性, IC50分别为 $0.637 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $0.366 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 和 $0.535 \times 10^{-9} \text{mol/L}$; 该毒素可使Hccc-9810细胞周期停滞在G0/G1期从而促进细胞凋亡; 不同浓度蓖麻毒素的作用下, BxPc-3和Hccc-9810细胞表达FXYP3的水平均有不同程度的降低。

研究结论:

1. FXYP3蛋白可能与原发性肝癌、胆管癌、胃癌、乳腺癌及胰腺癌等肿瘤的发生发展有一定关系;
2. FXYP3的表达有可能成为胆管癌预后的一个重要辅助指标;
3. FXYP3分别与AFP、CA19-9联合检测有可能提高原发性肝癌和胆管癌的检出率;
4. HepG2、BxPc-3和Hccc-9810对蓖麻毒素抑制作用均较为敏感且无选择性;
5. 蓖麻毒素可导致FXYP3在肿瘤细胞中表达减少。

2. 期刊论文 卢幻真. 张钟群. 林秋雨. 唐阳. 胡艳宁. 钟美容. 龙秀红. 王秀葵. 关莹 赛博刀治疗肿瘤患者196例的护理配合 - 中国误诊学杂志

2008, 8(29)

我院2007-12/2008-03使用赛博刀(又译为射波刀)治疗肿瘤患者196例, 收到了满意疗效, 护理配合报道如下。

1 临床资料

- 1.1 一般资料 本组男124例, 女72例, 年龄2~89(平均48)岁。原发性肝癌40例, 肺癌30例, 肝转移瘤25例, 肺转移瘤8例, 胰腺癌3例, 肝占位2例, 肺占位4例, 纵隔肿瘤3例, 肝内胆管细胞癌2例, 左肾癌2例, 右腹股沟软组织肉瘤1例, 肾上腺转移瘤1例, 腹腔淋巴结转移3例, 颅脑疾病52例, 脊柱脊髓疾病12例, 头颈肿瘤7例。

3. 学位论文 史丽静 CT、MR多种成像技术在肝脏疾病的比较和综合应用 2006

第一部分MR扩散加权成像使用不同b值组合测量腹部脏器ADC值的比较

目的: 探讨不同b值进行扩散加权成像(DWI), 腹部器官和肝脏病灶表现弥散系数(ADC)值的差异。方法: 共29例行磁共振扩散加权成像。其中, 正常对照组17例, 恶性病变组12例, 包括: 肝细胞癌6例, 胆管细胞癌2例, 转移瘤4例。使用b=0、500、1000s/mm²和b=0、200、400s/mm²两种组合, 对各例分别行两次DWI扫描。测量并分别比较两次DWI扫描各器官及病灶ADC值。结果: b值差为1000s/mm²的组合, 17例正常肝脏的ADC值平均为 $(1.50 \pm 0.11) \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$, 其波动范围在 $(1.14 \sim 1.67) \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ 之间, 而b值差为400s/mm²的组合, 肝脏的ADC值平均为 $(1.13 \pm 0.19) \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$, 其波动范围在 $(0.59 \sim 1.42) \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$ 之间, 大b值差的测量结果明显高于小b值差的结果($t=6.058$, $P=0.0001$), 且数值波动小。脾脏、胰腺以及12个肝脏恶性占位的两次ADC值之间也均有显著性差异, 大b值差的测量结果也明显高于小b值差的结果($P < 0.05$)。结论: DWI成像, b值的不同会影响ADC值的测量, 大b值差时测量结果较小b值差的测量结果准确且稳定。

第二部分CT和MR灌注评价在肝脏应用的对比研究

目的：对比CT、MR灌注测定肝脏等器官和病灶峰值时间及最大斜率，并探讨CT和MR结果的相关性。 方法：50例进行CT和MR灌注成像。包括：正常对照组11例；肝硬化组16例；恶性病变组13例，其中，肝细胞癌5例，胆管细胞癌4例，转移癌4例；良性疾病组10例，其中血管瘤4例，腺瘤1例，炎性结节2例，脓肿3例。各例分别完成CT、MR灌注扫描，在肝脏、主动脉、脾脏以及占位病变各划定一个ROI，分别完成各部位ROI的时间-密度曲线(TDC)和时间-信号曲线(TIC)，计算各ROI的峰值时间、曲线的最大斜率等指标，并将CT、MR结果进行比较和Pearson法相关分析。 结果：测定肝脏、脾脏及23个病灶的峰值时间，CT灌注测量结果分别为(53.51±10.83)s，(31.02±3.86)s，(62.44±11.20)s；MR灌注结果分别为(53.49±11.41)s，(30.65±5.44)s，(58.08±10.21)s，虽然MR结果都略小于CT结果，但经t检验，CT、MR结果之间均无明显差异(所有P>0.05)。CT、MR灌注测定各脏器和病灶TDC、TIC最大斜率，CT、MR评估结果之间有良好的相关性(所有P<0.05)。结论：CT和MR灌注对大部分组织的峰值时间、最大斜率的估计是一致的，具有良好相关性。

第三部分CT灌注、MR灌注及DWI对良恶性病变、肝硬化与正常肝脏鉴别能力的比较

目的：比较CT灌注、MR灌注及DWI对良恶性病变、肝硬化与正常肝脏的鉴别能力。 方法：共110例行磁共振扩散加权成像。正常对照组17例，肝硬化组16例，恶性病变组37例，包括肝细胞癌21例，胆管细胞癌7例，转移癌9例(来源于结肠癌3例，胃癌3例，胰腺癌2例，输尿管癌1例)。良性疾病组40例，包括血管瘤12例，囊肿11例，FNH3例，腺瘤1例，炎性坏死结节或肉芽肿5例，脓肿8例。110例中，50例同时进行了CT和MR灌注成像，病例分组和例数同第二部分。DWI扫描方法同第一部分，使用b=0、500、1000s/mm²的组合。CT、MR灌注成像，对于肝脏和占位病灶，以脾脏的峰值时间为界，分别计算脾脏峰值前后肝脏和病灶的曲线最大斜率，以脾峰值前后两个斜率的比值作为评估指标进行组间对比。记为(SSr(ct)=SS前/SS后)和(SSr(mr)=SS前/SS后)，以此代表门脉的灌注比率。 结果：37例肝肝恶性肿瘤平均ADC值为(1.02±0.15)×10⁻³mm²/s，40例良性疾病平均ADC值为(2.21±0.74)×10⁻³mm²/s，16例肝硬化(肝脏)平均ADC值(1.33±0.12)×10⁻³mm²/s，17例正常肝脏平均ADC值为(1.50±0.11)×10⁻³mm²/s，除肝硬化和正常肝脏之间ADC值无统计学差异外，其余各组两两比较均有统计学差异(所有P<0.05)。恶性病变ADC值明显低于其他组，良性疾病ADC值明显高于其他组。正常肝脏，代表其动门脉灌注比率的SSr(ct)和SSr(mr)测量结果分别为：0.72±0.26和0.66±0.24，；肝硬化SSr(ct)和SSr(mr)测量结果分别为：1.38±0.39和1.83±0.59，恶性病变组SSr(ct)和SSr(mr)测量结果分别为：1.52±0.60和1.79±0.35，良性疾病组分别为1.26±0.41和1.19±0.36。良恶性病变之间、良恶性病变分别与肝硬化之间以及良性病灶和正常肝脏之间，组间比较SSr(ct)和SSr(mr)都无明显统计学差异(P>0.05)。肝硬化组，其测定的SSr(ct)和SSr(mr)结果与正常肝脏组均有显著差异(P<0.05)。 结论：良恶性病变之间、良恶性病变分别与肝硬化之间以及良性病灶和正常肝脏之间，以ADC值互相鉴别较CT和MR灌注测量更有优势。在肝硬化的诊断方面CT、MR灌注较DWI更具优势。

第四部分CT灌注、MR灌注及DWI在不同程度肝硬化的应用价值比较

目的：比较CT灌注、MR灌注及DWI对不同程度肝硬化的鉴别能力。

方法：共27例行磁共振扩散加权成像、CT和MR灌注成像。正常对照组11例，肝硬化组16例，属肝功能Child-Pugh分级A级的7例，定为肝硬化1组，肝功能Child-Pugh分级为B级的6例，C级的3例，一并归入肝硬化2组。各种方法的扫描和指标计算同第三部分。 结果：肝硬化1组的肝脏平均ADC值(1.35±0.12)×10⁻³mm²/s，肝硬化2组的肝脏平均ADC值(1.32±0.16)×10⁻³mm²/s，11例正常肝脏平均ADC值为(1.52±0.31)×10⁻³mm²/s。CT灌注结果：肝硬化1组的SSr(ct)为(0.95±0.28)，肝硬化2组的肝脏SSr(ct)为(2.01±0.66)，11例正常肝脏平均SSr(ct)为(0.72±0.26)。MR灌注结果：肝硬化1组的SSr(mr)为(1.17±0.49)，肝硬化2组的肝脏SSr(mr)为(2.31±0.76)，11例正常肝脏平均SSr(mr)为(0.66±0.24)。肝硬化1组和肝硬化2组的平均ADC值虽都低于正常肝脏，但并无统计学差异(P>0.05)，且两组肝硬化的ADC值之间也无统计学差异。肝硬化患者动门脉灌注比例较正常组加大，但肝硬化1组与正常组尚无明统计学差异，而肝硬化2组与正常组间差异具有统计学意义(P<0.05)，且和肝硬化1组相比，肝硬化2组动门脉灌注比例的改变更加显著，已经出现比例倒置，两组间差异明显(P<0.05)。 结论：CT、MR灌注成像能够反映肝硬化的血流灌注的情况，也能反映和肝硬化的程度有相关性，较之DWI成像和ADC值对肝硬化的评价，CT和MR灌注成像更有优势。

第五部分CT灌注、MR灌注及DWI成像对肝脏恶性病变之间及与部分炎性病变的鉴别诊断价值

目的：比较DWI成像、CT和MR灌注成像对肝脏恶性病变之间及与部分炎性病变的鉴别诊断价值。方法：4组患者共18例进行了DWI成像、CT和MR灌注成像。肝细胞癌5例，胆管细胞癌4例，转移癌4例(来源于结肠癌2例，胃癌1例，胰腺癌1例)；炎性疾病组5例(包括炎性结节2例，脓肿3例)。各种方法的扫描和指标计算同第三部分。结论：CT、MR灌注提供的信息较DWI成像的ADC值的比较，在肝细胞癌和转移癌的评价和鉴别上更有优势；DWI、CT、MR灌注三种功能成像对肝脓肿等炎性病变与胆管细胞癌的鉴别诊断仍然没有明显的优势，诊断和鉴别诊断仍然需要谨慎。

第六部分CT灌注、MR灌注及DWI成像综合应用在肝脏疾病的诊断价值

目的：常规图像和功能成像相结合，探讨功能成像(包括CT灌注、MR灌注及DWI成像)在肝脏疾病的诊断价值。方法：15例常规CT和/或MR诊断信心不足的患者，补充进行了DWI成像、CT和MR灌注成像中的1~3种功能成像以辅助诊断。其中，9例为肝癌术后或TACE、PRFA、PEI等方法治疗后，对肝脏复发或原病灶治疗后活性情况的判断；4例为对肝内多发病灶的诊断；1例不典型囊肿和1例不典型血管瘤。各种方法的扫描和指标计算同第三部分。结果：15例患者在结合了功能成像后做出的综合影像诊断，较单纯常规CT和/或MR扫描，诊断准确率和病灶检出率均有提高。结论：功能成像作为常规扫描的有益补充，其诊断价值不容忽视，可以提高病灶检出率和诊断准确率。

4. 期刊论文 [史丽静. 郭勇. 林伟. 张燕群. 郑奎洪. 黄敏华. 钱明珠. 王建和. SHI Li-jing. GUO Yong. LIN Wei. ZHANG Yan-qun. ZHENG Kui-hong. HUANG Min-hua. QIAN Ming-zhu. WANG Jian-he](#) CT灌注、MR灌注成像与MR扩散加权成像对肝脏恶性病变之间的鉴别诊断价值比较 -中国临床

[医学影像杂志2010, 21 \(3\)](#)

目的:探讨并比较CT灌注、MR灌注及MR扩散加权成像(DWI)3种功能成像对肝脏恶性病变之间的鉴别诊断价值.方法:3组患者共39例进行了DWI成像、CT灌注和MR灌注成像.肝细胞癌15例,胆管细胞癌11例,转移癌13例(来源于结肠癌6例,胃癌3例,胰腺癌4例).DWI扫描,计算各例肝脏或病灶的ADC值并进行组间比较.CT灌注、MR灌注成像,以脾脏的峰值时间为界,分别计算脾脏峰值前后肝脏和病灶的曲线最大斜率,以脾脏峰值前后两个斜率的比值作为评估指标进行组间对比.记为[SSr(ct)=SS前/SS后]和[SSr(mr)=SS前/SS后].结果:肝细胞癌和转移癌的ADC值[分别为(1.04±0.13)×10⁻³mm²/s和(1.11±0.19)×10⁻³mm²/s]都明显低于胆管细胞癌[(1.33±0.27)×10⁻³mm²/s],差异有统计学意义(P<0.05),但肝细胞癌和转移癌之间无统计学差异(P=0.424).肝细胞癌组SSr(ct)和SSr(mr)测量结果分别为2.46±0.34和3.09±0.77,胆管细胞癌SSr(ct)和SSr(mr)平均值分别为1.03±0.21和1.12±0.21,转移癌组SSr(ct)和SSr(mr)平均值分别为0.94±0.19和0.94±0.37,胆管细胞癌组、转移癌组分别与肝细胞癌组之间,SSr(ct)和SSr(mr)都有显著统计学差异(P<0.05),前两组数值明显小于肝细胞癌组;胆管细胞癌与转移癌两组之间,SSr(ct)和SSr(mr)均无明显统计学差异(P>0.05).结论:对肝细胞癌和转移癌分别与胆管细胞癌的鉴别,DWI成像比灌注成像更有优势;而在肝细胞癌和转移癌的鉴别上,CT灌注、MR灌注提供的信息较DWI成像的ADC值比较更有优势.

5. 期刊论文 [张孔志. 余文昌. 陈示光. 罗福珍. 郑建雄. 陈建彬](#) 53例AFP阴性肝占位病变行CT引导下活体活检的临床意义探讨 -福建医药

[杂志2008, 30 \(6\)](#)

目的 探讨应用CT引导下对AFP(甲胎蛋白)阴性肝占位病变穿刺活检的临床诊断意义.方法 53例AFP阴性肝占位性病变患者在CT引导下应用巴德活检枪快速进针到肿块内切取组织活检.结果 53例患者取材组织完整,符合病理检查要求,均获得明确病理学诊断.无腹腔出血、胆汁漏、气胸等并发症,未发生针道种植转移.病理学结果:原发性肝细胞癌30例,占56.6%;转移性肝癌10例,其中肝转移源于肺癌5例,乳腺癌2例,结肠癌2例,胰腺癌、小肠间质瘤各1例,占18.9%;肝内胆管细胞癌8例,占15.1%;恶性淋巴瘤2例,占3.8%;原发性肝细胞癌合并肝脓肿2例,占3.8%;肝良性肿瘤局灶性结节增生(FNH)1例,占1.8%.结论 CT引导下应用活体活检对肝占位病变穿刺活检,创伤性小,取材率高,病理组织学检查诊断率高,对血AFP阴性、临床诊断有疑问的患者有确诊意义.

6. 学位论文 [苏宁](#) GPC3蛋白在肝细胞癌中的表达及其与预后的相关性研究 2009

研究背景和目的:

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma,HCC)简称肝癌,是全球最常见的恶性肿瘤之一.我国是世界上肝癌高发区之一,发病率为20.37/10万,位于常见肿瘤的第3位.2002年全球最新统计,肝癌发病率在常见癌症中排行第6,而病死率则排第3位,每年发病人数为62.6万例,新增5.7%,共有59.8万例死亡,其中82%的病例在发展中国家,中国占55%.虽然目前临床上可用于治疗肝癌的手段比较多,包括手术切除、肝移植、血管介入、消融技术、放化疗等,且在肝癌的药物治疗上取得重大突破,手术切除仍被公认为肝癌获得根治的最好手段.但即使是根治性切除,5年内仍有60~70%的病人出现转移复发,而局部治疗的转移复发率更高.抗肝癌转移复发的治疗已成为提高肝癌生存率的关键.因此,寻找预测肝癌转移复发倾向、判断肝癌患者预后的肿瘤标志物是目前肝癌研究的重点及热点内容,也是肝癌防治研究中的一个重点和难点.

GPC3(Glypican-3, 磷酰肌醇蛋白聚糖3, 又称MXR7、OCI-5、GTXR2-2)蛋白是硫酸乙酰肝素糖蛋白(Heparan sulfate proteoglycan,HSPG)家族中的一员.GPC3的突变导致细胞增殖和细胞凋亡失去平衡,可能是肿瘤发生的重要原因.GPC3还可结合肝素结合型蛋白如细胞粘附分子、基质成分、生长因子、酶和酶抑制物,参与调节细胞增殖、分化、粘附和迁移等过程,还可能参与抑制或调节大部分中层组织和器官生长的过程.目前研究发现GPC3参与Wnt、Hedgehog(Hh)、FGF、IGF、BMP、SMAD、TGF-β等多个与肿瘤发生发展密切相关的信号通路的调节.研究发现GPC3在肝细胞癌、大肠癌、恶性黑色素瘤、Wilms瘤、成神经细胞瘤和肝胚细胞瘤高表达,而在肺腺癌、卵巢癌、乳腺癌、间皮瘤中表达显著下调,提示GPC3是一个值得期待的多种肿瘤特异性标志物.

本研究拟应用组织芯片技术及免疫组化方法检测GPC3蛋白在人体常见肿瘤组织及癌旁组织中的分布及表达,并分析GPC3蛋白在肝细胞癌及其癌旁组织中表达的差异,对肝细胞癌组织中GPC3蛋白表达与各临床病理参数之间的关系进行多因素相关分析,同时结合临床随访资料回顾性分析GPC3蛋白表达与肝细胞癌患者生存期的关系,寻找监测肝细胞癌转移复发及评价预后的方法;利用酶联免疫吸附试验技术检测初治肝细胞癌患者、肝细胞癌术后患者及其他肝脏疾病患者血清中GPC3蛋白的表达情况,分析肝细胞癌与其他肝脏疾病以及肝细胞癌手术前后GPC3蛋白表达水平的差异,探讨GPC3蛋白作为肝细胞癌疗效评价生物标志的可行性;为GPC3作为肝细胞癌的诊断、疗效评价、术后监测、预后判断及治疗靶点的选择提供初步的理论依据.

方法:

1. GPC3蛋白在人体常见恶性肿瘤组织及癌旁组织中的分布及表达.

应用组织芯片技术及免疫组织化学方法检测GPC3蛋白在人体常见肿瘤组织及癌旁组织中的分布及表达;应用组织芯片,结合免疫组织化学方法检测GPC3蛋白在肝细胞癌组织及其癌旁组织中的表达;分析肝细胞癌组织及其癌旁组织中GPC3蛋白表达水平有无差异.

2. GPC3蛋白在肝细胞癌组织中的表达及其临床意义.

应用免疫组织化学方法检测GPC3蛋白在61例肝细胞癌组织中的表达情况;分析GPC3蛋白表达水平与各临床病理参数之间的关系;分析GPC3蛋白表达与肝细胞癌患者生存期的关系;建立COX回归模型,对各项指标与生存期的关系进行单因素或多因素统计分析.

3. GPC3蛋白在肝细胞癌患者血清中的表达.

为探讨GPC3在肝细胞癌患者治疗转归中的意义,应用酶联免疫吸附方法检测GPC3蛋白在肝细胞癌患者初治及术后、肝炎及肝硬化等对照患者血清中的表达情况;比较各组间血清

GPC3蛋白的表达水平；分析对肝细胞癌患者血清GPC3蛋白表达与血清AFP表达之间的相关性；对肝细胞癌患者手术前后血清GPC3蛋白表达水平的变化及其与血清AFP表达水平的变化进行分析。

4. 统计学方法。

应用SPSS 13.0软件进行统计学处理，肝细胞癌组织及其癌旁组织间GPC3蛋白的表达率及表达强度的比较分别进行X2检验及Wilcoxon秩和检验；以X2检验和Fisher's精确概率法对GPC3蛋白高表达率与肝细胞癌患者各临床病理参数之间的关系进行统计学分析；对GPC3蛋白表达与肝细胞癌患者生存期的关系进行Kaplan-Meier法生存分析；各项临床病理参数与生存期的关系进行单因素或多因素COX回归分析；各组间血清GPC3蛋白表达水平的差异以及手术前后血清GPC3蛋白和血清AFP的比较分别采用Wilcoxon秩和检验及Wilcoxon符号秩和检验；以P<0.05为具有显著性差异。

结果：

1. GPC3蛋白在人体常见肿瘤组织及其癌旁组织中分布和表达情况。

GPC3蛋白在胃癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、宫颈癌、肝胆管细胞癌组织中无表达。GPC3蛋白在食管鳞癌及肺鳞癌组织中弱表达。GPC3蛋白在肝细胞癌组织中高表达，表达率为66.7%，其中55.6%为高表达。另外，在2例癌旁慢性浅表性胃炎及1例癌旁慢性肝炎发现GPC3蛋白表达，而在其他癌旁组织中未发现GPC3蛋白表达。肝细胞癌组织GPC3蛋白表达率及表达强度显著高于癌旁组织（P<0.05）。

2. GPC3蛋白在肝细胞组织中的表达及其临床意义。

GPC3蛋白在肝细胞癌组织浆及腹膜中表达，表达率为63.9%，其中52.5%为高表达，各级表达所占比例分别为：“-”占36.1%（22/61），“+”占11.5%（7/61），“++”占13.1%（8/61），“+++”占39.3%（24/61）。GPC3蛋白表达与肝细胞癌患者的性别、年龄、血清HBsAg、血清AFP、肿瘤大小无相关性（P>0.05），而与肝硬化、病理分级、TNM分期及转移复发存在相关性（P<0.05）。GPC3蛋白高表达肝细胞癌患者较低表达患者术后发生转移复发的优势比为3.214。随访发现GPC3蛋白高表达肝细胞癌患者的中位生存时间为17.0个月，GPC3蛋白低表达肝细胞癌中位生存时间为41.0个月。GPC3高表达肝细胞癌患者中位生存时间显著低于GPC3低表达患者（P=0.003<0.05）。将GPC3蛋白表达水平及各临床病理参数与肝细胞癌患者的生存时间分别进行因素分析，结果显示GPC3蛋白表达、血清AFP、肿瘤大小、转移复发和TNM分期是影响肝细胞癌患者生存时间的因素（P值分别为：0.004、0.015、0.047、0.000、0.023）。多因素分析发现GPC3蛋白表达、血清AFP、肿瘤大小和转移复发是影响肝细胞癌患者生存时间的独立因素（P值分别为：0.030、0.004、0.022、0.000）。

3. GPC3蛋白在肝细胞癌血清中的表达。

GPC3蛋白在肝细胞癌初治组表达水平显著高于肝细胞癌术后组及对照组；进一步分析发现肝细胞癌患者血清GPC3蛋白表达水平与血清AFP之间不存在相关性；肝细胞癌术后血清GPC3蛋白表达水平较术前下降的患者占阳性表达者的66.7%，且在4例血清AFP阳性患者中，3例肝细胞癌患者术后血清AFP及GPC3蛋白均出现明显下降，另有1例肝细胞癌患者术后血清AFP下降不明显，而术后血清GPC3蛋白表达水平升高。

结论：

1. GPC3蛋白在肝细胞癌中高表达，在多种肿瘤组织中低表达或无表达，提示GPC3在肝细胞癌发生发展中的特殊意义，值得进一步探讨；

2. GPC3蛋白在肝细胞癌患者组织及血清中高表达，而在肝炎、肝硬化、肝胆管细胞癌、转移性腺癌等患者组织及血清中低表达，提示GPC3有可能作为对肝细胞癌诊断及鉴别诊断有参考价值的生物标志；

3. GPC3蛋白表达与肝硬化、病理分级、TNM分期及转移复发相关，且GPC3蛋白与肝细胞癌患者预后密切相关，GPC3蛋白高表达肝细胞癌患者发生转移复发的风险显著升高，提示GPC3与肝细胞癌发生发展关系密切，GPC3有可能作为肝细胞癌转移复发监测及预后判断的重要参考指标；

4. GPC3蛋白在肝细胞癌患者血清中表达水平术后出现降低，且其与血清AFP手术前后的变化基本一致，提示GPC3可能成为独立的评价肝细胞癌患者术后疗效评价的血清学标志物。

7. 学位论文 [王葵 人功能基因表达谱筛选肝癌高表达基因及asph功能初步研究 2006](#)

原发性肝癌(简称肝癌, Hepatocellularcarcinoma, HCC)是我国最常见的高发肿瘤之一, 近年来肝癌的病死率又有上升趋势, 已成为我国第2位恶性肿瘤致死原因, 可见我国肝癌高发的形势十分严峻。尽管肝癌治疗的新技术和新方法层出不穷, 肝癌研究已取得了很大的进步, 疗效也已得到明显改观, 但就肝癌整体而言, 其疗效仍很不理想。影响疗效的主要因素是转移复发。目前对肝癌转移复发的机制了解不甚明确, 可能涉及血管生成、细胞黏附、细胞凋亡、基因突变等多方面因素。近年来发展的cDNA芯片(cDNAchip或microarray)、组织微阵列(tissuemicroarray, TMA)等技术, 具有多样品并行处理能力, 分析速度快, 所需样品少, 近年来成为分子生物学、肿瘤学研究领域常用方法。本研究在对肝癌进行功能基因筛选同时, 建立肝细胞癌芯片技术并加以应用, 进一步对肝癌组织及肝癌细胞系中明显高表达基因ASPH进行RNA干扰研究, 初步研究ASPH基因在肝癌中的作用。

第一部分: 原发性肝癌(HCC)功能基因表达研究。利用含有5075个功能基因cDNA的人表达谱芯片, 将6例原发性肝癌患者分成癌和癌旁两组, 分别提取标本的癌、门静脉癌栓和癌旁组织, 抽提总mRNA, 反转录为cDNA与芯片进行杂交, 对比mRNA表达的差异, 癌和癌旁的基因表达差异, 得到癌组织中明显高表达的ASPH、FACL4、MPK4K4、HSF-1、DAP3等基因210个, 低表达基因MT-1X等424个基因。41例肝癌及四株肝癌细胞(HepG2、SMC-7721、MHCC-H、MHCC-L)进行RT-PCR检测, 发现ASPH表达在肝癌及肝癌细胞株中仍明显高表达。41例肝细胞癌以及相对应的癌旁肝组织的mRNA检测显示ASPH基因在癌组织中36例(87.8%)明显高表达(光密度比值>2), 癌旁组织ASPH基因mRNA表达为中等程度或低度表达。41例肝癌组织中ASPH基因mRNA表达量的光密度比值为2.5±1.1, 癌旁肝组织中ASPH基因mRNA表达量的光密度比值为1.0±0.7, t检验分析显示有非常显著意义(P<0.01)。

第二部分: 构建肝癌组织芯片及应用。共取标本350例, 其中肝细胞癌315例, 胆管细胞癌7例, 混合型肝癌6例, 肝良性肝占位或肝脏病变17例, 转移性肝脏恶性肿瘤5例, 均为本院2004年外科手术标本, 包括肿瘤组织和相应的癌旁组织、癌栓组织; 另外10例正常肝组织均为尸检取材标本。对每例组织标本, 先在HE切片上确定典型的肿瘤和相应的正常组织, 并在相应的蜡块上作好标记, 根据要求选择不同大小孔径的穿刺针, 将组织按一定规则转移至长宽高度约45mm×28mm×15mm的蜡块中, 得到TMA蜡块共14块, 其中为9×7、9×7、16×8、16×9、16×8、16×10、17×9阵列各两块, 制备肝癌组织芯片700余张。其中两张9×7点阵中包含有癌、癌旁、正常肝、癌栓组织, 其余均为癌和癌旁组成的点阵。取组织芯片库中三张芯片, 免疫组化化学方法检测ASPH产物的表达, 并与临床和预后相联系。ASPH免疫组化染色阳性颗粒位于肝细胞癌组织细胞膜和胞浆内, 细胞核周亦可见染色。癌旁组织ASPH免疫组化染色为弱阳性或阴性。302例肝细胞癌中280例ASPH抗体免疫组化反应为阳性(93%), 肝细胞癌中ASPH蛋白高表达与肝内转移(包括门静脉癌栓形成)有关(P=0.035)、与分化程度有关(高分化与中分化: P=0.019; 高分化与低分化: P=0.007)。然而ASPH蛋白表达在其它的临床及病理特征, 如年龄、肿瘤AFP水平、肝硬化、肿瘤包膜等等上并无区别。

第三部分: 以ASPH为靶基因在HepG2、Hep3B中研究RNA干扰效果。ASPH全名天门冬氨酸β羟化酶(aspartateβ-hydroxylase, aspartylβ-hydroxylase)基因, 也简称为BAH、HAAH。其编码产生五种同源蛋白质(a, b, c, d, e), 其中同源蛋白a含758个氨基酸, 具有酶活性, 而b、c、d、e为膜蛋白, 与钙离子结合、释放有关。在小鼠、大鼠和人类中发现其具有高度保守性。研究发现, 在小鼠中, ASPH基因编码产生三个独立的蛋白: iunctin、humbug、BAH。ASPH是一种依赖α酮基双氧化酶, 对含有EGF(表皮生长因子)样区域中的天门冬氨酸或天门冬酰胺残基起羟化作用(转录后水平), 而这种含有天门冬氨酸/天门冬酰胺残基羟化的区域高度保守。广泛存在于一些蛋白质中: 凝集因子VII、IX、X、Notch受体和配体、受体酪氨酸激酶tyro-3/Axl家族的配体、细胞外基质结构蛋白等等。有报道ASPH敲除的裸鼠多种组织蛋白表达缺失, 尤其在肝组织检测不到其产物酶活性存在、凝集因子X无法活化, 雌性裸鼠生育能力下降, 而且裸鼠出现并指、面部畸形、腭裂等等。这些发育缺陷与Notch配体Jagged-2基因敲除或减效基因表达效果相似, 另有报道人的Notch配体Jagged-1的EGF样区域也是靠ASPH羟化的。Notch基因家族成员的EGF样区域转后修饰对Notch信号途径发挥作用有明显影响。在一些人类肿瘤组织中发现ASPH表达水平增高, 见诸于报道的有肝胆管细胞癌、胰腺癌、大肠癌肝转移等, 在肝癌中的研究亦有报道10例肝细胞癌中4例高表达ASPH, 其与肝细胞癌的发生发展、转移复发竟关系如何尚无进一步研究。因此运用反义遗传方法(RNAinterference, RNAi)对ASPH功能作进一步研究, 以增加对其在肝癌中功能的认识。RNAi是通过双链RNA(dsRNA)介导的特异性地降解相应序列的mRNA, 从而阻断相应基因表达的转录后基因沉默机制。相对基因打靶而言, RNAi是一种非常有效而又简单易行的基因敲除方法, 在特异性高效性抑制基因功能方面显示了广阔的前景。目前RNAi技术被应用在癌基因等功能的

研究中, 并已取得对某些基因的RNAi, 这为基因功能的研究提供了一种崭新的方法, 而且为肿瘤的预防和治疗提供了新的方法和思路。在293T细胞中, 转染过表达目的基因后, 采用检测RFP融合蛋白荧光水平的实验方法, 在蛋白水平检测目的基因在不同的RNAi靶点干扰情况下的敲减效率。针对外源转染表达的蛋白质, 我们采用Invitrogen的Lipofectamine2000Kit进行质粒和不同靶点化学合成siRNA的共转染导入, 检测不同靶点RNAi的敲减效率。每次实验针对每个RNAi靶点设计一对重复, 并平行设定转染组和阴性对照RNA干扰的两组对照实验。2号靶点对外源表达的目的基因, 在RFP融合蛋白水平均有明显knockdown作用。我们把这个特异性2# siRNA转染高表达ASPH肝癌细胞系HepG2、SMC、Hep3B对其进行比较分析。不同的转染终浓度进行比较, Real-timePCR验证mRNA的水平, 发现终浓度为150nM时基因消减率达50%~70%左右。联合Westernblot结果, 显示瞬时siRNA转染干扰基因的表达是可行的。Asph基因RNAi后, MTT试验显示肝细胞均呈增值力减弱, 提示细胞生长存在阻滞或/和凋亡现象。细胞划痕实验证实细胞爬行能力减弱。ASPH消减后Westernblot结果检测ASPH蛋白表达水平相应下降, p53、PCNA、EGFR、Her-2等蛋白表达, 发现PCNA表达下降。这些结果互相验证, 说明RNAi可以在体外抑制肝癌细胞的群体增值能力。

我们对ASPH在肝癌中的作用进行了初步探讨, 认为该基因与肝癌细胞的增殖、迁移、粘附等性能相关, 可能通过这些机制促进肝癌的维持、生长、转移, 具体的机制尚有待于进一步研究。

综上所述, 基因芯片、组织芯片为高通量、快速筛选疾病相关基因提供了技术支持, RNAi是近几年才发现的一种反向遗传研究方法, 为后基因组时代的基因功能研究及其基因治疗提供了一种崭新的、强大而又有效的平台。我们在研究筛选得到的一个特异性高表达基因ASPH时建立了肝细胞组织芯片库, 筛选出有效的siRNA并加以初步验证, 对ASPH基因在人肝细胞中的作用得到初步的结果, 为后续工作奠定了基础。

8. 期刊论文 [秦叔逵. 刘秀峰. 王琳. 陈映霞. 钱军. 华海清. 龚新雷. 杨柳青. 何泽明. QIN Shu-kui. LIU Xiu-feng. WANG Lin. CHEN Ying-xia.](#)

[QIAN Jun. HUA Hai-qing. GONG Xin-lei. YANG Liu-qing. HE Ze-ming 重组人血管内皮抑素与化疗联合治疗肺外晚期恶性肿瘤的临床研究 - 临床床肿瘤学杂志2007, 12 \(10\)](#)

目的:前瞻性系统地观察抗癌新药重组人血管内皮抑素注射液(YH-16, 恩度)联合常规化疗方案, 治疗多种除肺癌外晚期恶性肿瘤的有效性和安全性. 方法:经病理组织学或细胞学检查确诊的IV期肺外恶性肿瘤患者46例, 包括大肠癌10例, 头颈部肿瘤6例, 恶性黑色素瘤和卵巢癌各3例, 食管癌、胃癌、胰腺癌、原发性肝癌、肾癌、乳腺癌、腹膜转移性腺癌和胆管细胞癌各2例, 肾盂癌、纵隔卵黄囊瘤、阑尾粘液腺癌、十二指肠神经内分泌瘤、输尿管移行细胞癌、盆腔平滑肌肉瘤、前列腺癌和恶性血管内皮细胞瘤各1例, 接受恩度联合化疗方案治疗. 其中, 恩度15mg, 加入生理盐水500ml中匀速缓慢静滴, 第1~14天连续给药, 间歇7天重复; 同时联合既往未使用或与既往治疗无交叉耐药的化疗药物, 后者采用常规或偏低的剂量强度. 每21天为1个周期. 按照RECIST标准严格观察和评价近期客观疗效, 参考Karnofsky体力状况评分(KPS)变化评价患者的生活质量(QoL); 根据NCI CTC 3.0版标准评价药物毒性反应. 用药1周期即评价毒性, 2周期后方可评价疗效. 结果: 全组46例患者中, 有36例患者可以评价客观疗效, 而46例均可进行安全性评价. 共完成治疗周期数为120个, 平均每周2.6个周期. 在36例可评价病例中, 获得 PR 6例, SD 16例, PD 14例, 即客观有效率(RR)为16.7%(6/36), 而疾病控制率(DCR)为61.1% (22/36). QoL改善者有9例(25.0%), 稳定者20例(55.6%), 仅例下降(19.4%), 即QoL改善稳定率达到80.6%. G3/4级毒性主要与化疗药物相关, 包括5例白细胞下降(10.9%)、3例血小板下降(6.5%)以及2例恶心/呕吐(4.4%). 5例(10.9%)发生暂时性心电图变化, 其中4例表现为T波和ST-T段改变; 1例发生房扑. 1例患者发生轻度血压升高, 还有1例用药期间出现黑便现象, 均经对症处理后控制和恢复正常. 结论:恩度与化疗药物联合使用治疗肺癌以外的多种晚期恶性肿瘤具有良好

的疗效,并且可以改善或稳定患者的QoL,其毒性低,安全性和耐受性比较好;关键是要早期使用、联合使用和持续使用.因此,值得临床上进一步试用观察,以积累更多的经验和寻求符合循证医学原则的高级证据.

9. 学位论文 胡静 参麦注射液、羟基喜树碱与环磷酰胺抗血管生成热化疗的实验及临床研究 2005

【背景】肿瘤生长依赖血管生成,肿瘤通过分泌某些因子促进了内皮细胞的增殖和毛细血管的形成,而新生血管通过营养控制影响着肿瘤的生长.不仅如此,肿瘤血管生成在肿瘤从良性向恶性的转变、癌细胞进入血液循环、转移灶的发展和破裂中都起着重要作用,涉及肿瘤从形成到转移的全过程.因此,抗血管生成已成为抗肿瘤治疗新的研究热点.某些化疗药物,在小剂量、高频率的给药方式下可以选择性地显著抑制肿瘤组织内新生血管内皮细胞的生长,使肿瘤细胞因为血供不足而生长受阻.这称为小剂量化疗(metronomic chemotherapy)或抗血管生成化疗(antiangiogenic chemotherapy) [1,2].

热疗(thermotherapy)是通过加热使肿瘤组织的温度达到40~44℃,引起肿瘤细胞生长受阻与死亡的一种治疗方式.联合应用热疗与化疗是一种合理的综合治疗方案,热疗能促进药物进入细胞;促进药物诱发的细胞凋亡.热疗能抑制肿瘤血管生成.中医治疗恶性肿瘤有扶正培本、活血化痰、清热解毒、软坚散结、以毒攻毒的治则,其中以活血化痰和扶正培本与西医的结合最为恰当.近年来发现,某些中药制剂及中药来源的药物有抗血管新生作用,如参麦注射液、羟基喜树碱等.

【目的】本实验旨在探讨①参麦注射液、羟基喜树碱和环磷酰胺联合应用热疗体外抗血管生成作用;②参麦注射液、羟基喜树碱和环磷酰胺对体内实验鸡胚尿囊膜血管网生长的抑制作用;③用人肝癌细胞作为对照,摸索参麦注射液、羟基喜树碱和环磷酰胺的抗血管生成作用浓度;④中药参麦注射液与化疗药物羟基喜树碱和环磷酰胺抗血管生成协同作用.⑤中药参麦注射液与化疗药物羟基喜树碱、环磷酰胺同热疗的抗血管生成协同作用.

【方法】采用体外人微血管内皮细胞(Human Microvascular Endothelial Cell, HMVEC)、三维血管模型和体内鸡胚尿囊膜血管模型(Chick EmbryoChoriallantoic Membrane, CAM),用MTT法和计数法观察参麦注射液、羟基喜树碱和环磷酰胺对HMVEC的增殖和迁移抑制作用及其作用浓度对CAM血管网形成的影响.并同时观察参麦注射液、羟基喜树碱和环磷酰胺对人肝癌HepG II细胞增殖发挥抑制作用的浓度.热疗方法采用电热恒温水浴法加热至43℃,持续30min.

【结果】1. 参麦注射液在<40 μl/ml浓度时对内皮细胞存活率无明显影响,在40~160 μl/ml浓度范围内,内皮细胞存活率在82.0%~36.8%间,明显下降并与浓度呈负相关(相关系数为-0.949, P值<0.0001).在选定浓度(10~160 μl/ml)下,参麦注射液对人肝癌HepG II细胞株的细胞无细胞毒作用(细胞存活率在100%~76.2%间)在≥160 μl/ml浓度时,参麦注射液对人肝癌HepG II细胞株的细胞有细胞毒作用. 2. 羟基喜树碱在<20ng/ml浓度时对内皮细胞存活率无明显影响,在20~80ng/ml浓度范围内,内皮细胞存活率在68.2%~37.6%间,明显下降并与浓度呈负相关(相关系数为-0.906, P值<0.0001).在选定浓度(5~80ng/ml)下,羟基喜树碱对人肝癌HepG II细胞株的细胞无细胞毒作用(细胞存活率在100%~89%间);在80ng/ml~10 μg/ml浓度范围内, HepG II细胞存活率下降,并与浓度呈负相关(相关系数为-0.890, P值<0.0001),在≥5 μg/ml浓度时,羟基喜树碱对HepG II细胞有细胞毒作用. 3. 环磷酰胺在<0.4mg/ml浓度时对内皮细胞存活率无明显影响,在0.4~1.6 mg/ml浓度范围内,内皮细胞存活率在88.8%~67.4%间,明显下降并与浓度呈负相关(相关系数为-0.876, P值=0.0021).在选定浓度(0.1~1.6mg/ml)下,环磷酰胺对人肝癌HepG II细胞株的细胞无细胞毒作用(细胞存活率在98.4%~83.8%间);在1.6~5mg/ml浓度范围内, HepG II细胞存活率下降,并与浓度呈负相关(相关系数为-0.985, P值<0.0001),在≥4mg/ml浓度时,环磷酰胺对HepG II细胞有细胞毒作用. 4. 40 μl/ml的参麦注射液与20ng/ml的羟基喜树碱、0.4mg/ml的环磷酰胺以及热疗联合应用,同单用两种化疗药物相比较,对内皮细胞增殖的抑制作用具有显著的协同效应. 5. 10~160 μl/ml的参麦注射液、5~80ng/ml的羟基喜树碱和0.1~1.6mg/ml的环磷酰胺均可抑制内皮细胞毛细血管样“出芽”,并与作用时间呈正相关(相关系数分别为0.944、0.957、0.977, P值均<0.0001),与浓度呈负相关(相关系数分别为-0.535、0.469、0.876, P值分别为0.0043、0.0051、0.0012);并在40 μl/ml的参麦注射液联合0.4mg/ml的环磷酰胺使用时发挥协同效应. 6. 40~160 μl/ml的参麦注射液、20ng/ml的羟基喜树碱和0.8mg/ml的环磷酰胺与热疗联合应用可增强抑制内皮细胞增殖及出芽作用,在体外均具有抗血管生成的协同效应; 40~80ng/ml的羟基喜树碱和0.4mg/ml、1.6mg/ml的环磷酰胺与热疗联合应用在体外具有抗血管生成的次加效应. 7. 参麦注射液在40~160 μl/ml浓度范围内对鸡胚尿囊膜体内血管形成均具有显著的抑制作用(P值<0.0001),并与作用浓度呈正相关(相关系数为0.997, P值=0.004);羟基喜树碱在20~80ng/ml浓度范围内对鸡胚尿囊膜体内血管形成均具有显著的抑制作用(P值<0.0001),并与浓度呈正相关(相关系数为0.916, P值=0.029);环磷酰胺在0.4~1.6mg/ml浓度范围内对鸡胚尿囊膜体内血管形成均具有显著的抑制作用(P值<0.0001),并与浓度呈正相关(相关系数为0.899, P值=0.038).

【结论】中药参麦注射液(40~160 μl/ml)和化疗药物羟基喜树碱(20~80ng/ml)、环磷酰胺(0.4~1.6mg/ml)在对肿瘤细胞无细胞毒性的低浓度下可明显抑制人微血管内皮细胞的增殖、出芽以及鸡胚尿囊膜血管网的形成,内皮细胞存活率和平均出芽长度均与作用时间呈正相关,与浓度呈负相关;鸡胚尿囊膜血管网形成的抑制率与作用浓度呈正相关.提示中药参麦注射液(40~160 μl/ml)和化疗药物羟基喜树碱(20~80ng/ml)、环磷酰胺(0.4~1.6mg/ml)在体内外均具有抑制血管增殖和迁移作用.中药参麦注射液(40~160 μl/ml)及化疗药物羟基喜树碱(20ng/ml)、环磷酰胺(0.8mg/ml)与热疗联合应用在体外均具有抗血管生成的协同效应;羟基喜树碱(40~80ng/ml)和环磷酰胺(0.4mg/ml、1.6mg/ml)与热疗联合应用在体外具有抗血管生成的次加效应;小剂量的中药参麦注射液(40 μl/ml)与化疗药物羟基喜树碱(20ng/ml)、环磷酰胺(0.4mg/ml)以及热疗联合应用在体外均具有抗血管生成的协同效应.

第二部分:抗血管生成热化化疗治疗肝/胆/胰肿瘤、难治性肿瘤的临床研究

【目的】通过临床运用抗血管生成热化化疗治疗肝/胆/胰肿瘤、难治性肿瘤,评价抗血管生成热化化疗在临床应用的前景.

【方法】给予肝、胆、胰肿瘤9例(其中肝癌3例、胆囊胆管癌3例、胰腺癌3例)、难治性肿瘤7例(其中胃癌4例、肠癌2例、肺癌1例)患者1至3周期的抗血管生成化疗方案.病理类型包括鳞癌1例,腺癌12例,肝、胆管细胞癌3例.单用抗血管生成化疗5例,应用抗血管生成热化化疗11例.方案如下:CTX50mgp.o.d1~13, HCPT5mg VD d1、5、9、13;联合热疗d1、5、9、13.观察对患者临床受益(clinical benefit)、肿瘤进展时间(TTP)、中位生存期(MST)及1年生存率的影响.

【结果】16例患者共接受抗血管生成化疗或抗血管生成热化化疗26周期,中位周期数为2周期(1~3周期).16例均可评价疗效,中位疾病进展时间为3.5月,中位生存时间为10.5月,一年生存率达43.75%,有56.3%的患者获得临床受益,VEGF值下降者达70%.单用抗血管生成化疗组5例,中位疾病进展时间为3月,中位生存时间为7月,一年生存率达20%,临床受益率为40%,VEGF值下降者达50%;抗血管生成热化化疗组11例,中位疾病进展时间为6月,中位生存时间为12月,一年生存率达54.55%,临床受益率为63.64%,VEGF值下降者达83.33%.抗血管生成化疗联合热疗能延缓患者的疾病进展时间(P值=0.045),提高一年生存率(P值=0.05).单用抗血管生成化疗组能有效缓解患者的疼痛(P值=0.035),但对改善患者KPS评分无统计学意义(P值=0.621);抗血管生成热化化疗组能有效缓解患者的疼痛(P值=0.007)及提高患者KPS评分(P值=0.024).单用抗血管生成化疗组和抗血管生成热化化疗组对患者VEGF值的改变无统计学意义(P值分别为0.524、0.139).

【结论】抗血管生成化疗初步显示能改善患者的生存质量,延长肿瘤患者(肝、胆、胰肿瘤,难治性肿瘤)生存时间,抗血管生成化疗与热疗相结合具有协同作用,有望成为治疗肿瘤的有效方法之一.

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfxszz201001015.aspx

授权使用: qknfy(qknfy), 授权号: e2b661d6-8cad-49be-a96a-9de900c03d25

下载时间: 2010年9月6日