国内外尚少有关于 ELC 与移植免疫排斥关系的报道，我们目前和后续的工作将对此研究领域进行积极的探索，期望可得到特异性强的免疫抑制剂应用于抗移植排斥反应，延长移植物存活时间。

参考文献：

[1] David J, Mortari F. Chemokine receptors - A brief overview[J]. Clin Appl Immunol Rev, 2000, 1(2): 105 - 125.
[2] Horuk R. Chemokine receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12(7): 313 - 335.
[3] Ngo V N, Tang H L, Cyster J G. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive t cells and activated b cells[J]. J Exp Med, 1998, 188(1): 181 - 191.
[4] Luther S A, Tang H L, Hyman P L, *et al*. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(23): 12694 - 12699.
[5] J·萨姆布鲁克，DW·拉萨尔 著，黄培堂 译. 分子克隆[M]. 第 3 版. 北京：科学出版社，2002. 68 - 113.
[6] Braun S E, Chen K, Foster R G, *et al*. The CC chemokine CK β-11/MIP-3 β/ELC/Exodus 3 mediates tumor rejection of murine breast cancer cells through NK cells[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4025 - 4031.
[7] Hromas R, Cripe L, Hangoc G, *et al*. The exodus subfamily of CC chemokines inhibits the proliferation of chronic myelogenous leukemia progenitors[J]. Blood, 2000, 95(4): 1506 - 1508.
[8] Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, *et al*. Macrophage-derived chemokine and EBI1-ligand chemokine attract human thymocytes in different stage of development and are produced by distinct subsets of medullary epithelial cells: possible implications for negative selection[J]. J Immunol, 2000, 165(1): 238 - 246.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2005)12-1207-01

个案与短篇

慢性乙型肝炎肝硬变与肝癌患者血清可溶性 Fas ligand 水平检测

Detection of the serum soluble Fas ligand in patients with chronic hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocarcinoma

曾晓波，陈　军，苏先狮，蒋永芳，何　艳　（中南大学湘雅二医院传染科，长沙 410011）

Fas/Fas 配体(Fas ligand, FasL)是目前研究较为广泛的诱导细胞凋亡分子，研究发现，可溶性 FasL 分子也有诱导靶细胞凋亡的作用[1]。为研究可溶性 FasL 分子在肝病患者中的作用，我们对慢性乙型肝炎、肝硬变、肝癌患者血清的可溶性 FasL 水平进行了检测，为探讨可溶性 FasL 分子对各种肝病肝细胞凋亡的调控作用提供帮助。

1　材料与方法

1.1　病例选择与试剂

选用 2003 年 1 - 2 月中南大学湘雅二医院传染科住院患者 22 例，其中慢性重度病毒性肝炎(乙型)12 例，肝炎肝硬变(活动期)6 例，男性 14 例，女性 4 例，平均年龄(38.5 ± 11.2)岁，诊断标准遵照 2000 年 9 月西安中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订《病毒性肝炎防治方案》。选用 2002 年 6 月至 2003 年 1 月中南大学湘雅二医院肝胆外科住院患者 16 例，经病检确诊为肝细胞癌，均为男性患者，平均年龄(49.5 ± 19.7)岁。另选 6 名健康者为正常对照。人 FasL 定量 EIA 试剂盒购自 MBL。

1.2　主要仪器

酶标仪：LABSYSTEMS, Wellscan K3 全自动酶标仪。

1.3　方法

参照操作说明书严格执行，每个样品检测两次。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行独立 t 检验。

2　结果

慢性肝炎、肝硬变、肝癌患者血清的可溶性 FasL 水平比较见表 1。统计学分析表明，肝癌患者血清的可溶性 FasL 水平与慢性肝炎、肝硬变患者比较，均存在显著性差异($P < 0.05$)。

表 1　慢性肝炎、肝硬变、肝癌患者血清的可溶性 FasL 水平比较

组别	n	血清可溶性 FasL 浓度(pg/ml)
肝癌	16	2 759.07 ± 365.65
慢性肝炎	12	3 186.30 ± 362.25*
肝硬变	6	3 782.00 ± 1 051.63*
正常对照	6	3 521.25 ± 1 562.25*

*：与肝癌组比较，$P < 0.05$

3　讨论

可溶性 FasL(soluble Fas ligand, sFasL)最先由 Tanaka 等[1]

（下转 1210 页）

作者简介：曾晓波(1960 -)，男，湖南省娄底市人，硕士，副教授，主要从事临床肝病方面的研究。电话：13308452846
通讯作者：陈　军，E-mail: drchenjun@yahoo.com.cn
收稿日期：2005-04-05；修回日期：2005-05-26

化系统中，峰面积应为 188.6 mAU × ml。

2.6 rhZP3 的纯化结果

50 ml rhZP3 培养上清经亲和层析、脱盐，最后纯化蛋白峰面积为 755 mAU × ml，推测其含量为 4 mg，Lowry 法测定结果为 4.2 mg，两者结果相似。

3 讨论

层析系统中，均采用紫外吸收法监测蛋白峰的位置和浓度，虽显示的是单点的吸收值(mAU)，但可进行峰面积的计算，其结果是 mAU × ml，直接反映了蛋白含量，减少了人为误差。国外已有根据目的峰的大小定量蛋白的探索[2]，国内也有研究者提出利用光纤式检测探头和计算机实时采集数据系统对蛋白质溶液浓度进行快速、灵敏、准确的在线检测[3]。根据反复的实验验证，我们发现利用方程式 X = Y/A 计算洗脱峰目的蛋白含量，其线性化结果、准确度和重复性均高于传统的方法，且瞬时可得结果，不浪费样本，无需额外操作，还能进行回顾性研究，对含量较低的样品测定更为有利。

该法的原理与紫外吸收法相同，因而也具有相同的缺陷：含核酸、色素洗脱峰不能用该法检测；不同蛋白其紫外吸收值会有所不同[4]，造成同等量的蛋白峰面积差异较大，层析系统的流动池体积也会影响蛋白的紫外实测值。因此，需用标准品(≥0.1 mg)测定参考峰面积。也可配成标准溶液，利用所用层析仪器的紫外测定池测定其紫外吸收值，粗略估计每 mg 蛋白的期望峰面积，根据峰面积粗略计算蛋白量。目前，随着蛋白质分析软件的应用，对已知序列的基因工程产物，已可计算其 A_{280} 吸收值，而通过参考蛋白的测定，可测知所用层析系统测量池测定值与 1 cm 测量杯测定值的比值。因此，只要知道目的蛋白的 A_{280} 吸收值，就可推知它在所用层析系统测量池的吸收值，从而通过计算得知每 mg 目的蛋白的理论峰面积，根据实测峰面积对洗脱峰中的目的蛋白进行初步定量。随着层析自动化系统的普及，该法将可作为层析过程中一种简便的常规蛋白定量方法。

参考文献：

[1] 唐 键，谢琪璇，潘善培，等. 重组人卵透明带 ZP3 蛋白在毕赤酵母中的表达[J]. 生物工程学报，2003，19(6)：758－762.

[2] Martins M B, Supico A, Simoes S I, *et al*. An analytical methodology to quantify the incorporation of enzymes in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles based on size exclusion chromatography[J]. J Pharm Biomed Anal, 1997, 15(6): 811－818.

[3] 高瑞秘，宋宝东，李凭力，等. 光纤技术在蛋白质浓度检测中的应用[J]. 天津大学学报，2000，33(4)：470－473.

[4] 汪家政，范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2000. 38－41.

(编辑 薛国文)

(上接 1207 页)

在转染了人 FasL cDNA 的 COS 细胞上清中检测出来，他们还进一步证实活化的人外周血淋巴细胞也可分泌 sFasL；随后发现 sFasL 存在多种肿瘤和自身免疫性疾病中，并有不同的作用机制，有研究者发现人 T 细胞系 Jurkat 细胞活化后，快速释放 sFasL，是诱导细胞凋亡的主要方式[2]。Xiao 等[3]最近研究认为，sFasL 在与靶细胞 Fas 结合时，需对其结合位点进行修饰，而只有在靶细胞膜 Fas 高度表达时，sFasL 才可能修饰；细胞膜表达的 FasL 同时具备结合和信号传导功能，不需修饰，能更有效的诱导细胞凋亡，sFasL 仅作为协同途径存在。

肝癌发生的一个重要方面是由于病毒感染肝细胞凋亡能力下降，使变异肝细胞得以生存和生长，导致肝癌[4,5]。研究表明，肝癌细胞 Fas 表达水平远高于肝炎及肝硬变肝细胞，而对 FasL 介导的凋亡不敏感。我们发现，肝癌患者血清中可溶性 Fas(sFas)明显升高，可溶性 Fas 和肝癌细胞膜 Fas 竞争性与 FasL 结合，从而抑制肝癌细胞凋亡[6]。本实验表明，肝癌患者血清 sFasL 明显低于慢性肝炎及肝炎肝硬变患者，由此推测，肝癌细胞凋亡受抑制还与血清 sFasL 水平下降有关，其机制可能为：①肝癌时活化 T 细胞分泌 sFasL 不足，不能产生足够的 sFasL 与肝癌细胞膜 Fas 结合；②sFasL 与 sFas 结合后消耗。而肝炎及肝硬变时，sFasL 无显著性差异，sFasL 的高表达，有助于诱导病毒感染细胞和变异细胞凋亡。

sFasL 在肝癌、肝炎及肝硬变患者血清中的差异，提示在肝癌的发生中，sFasL 有一定的作用，有进一步研究价值。

关键词：可溶性 Fas 配体；细胞凋亡；肝细胞癌；乙型病毒性肝炎

中图法分类号：R512.6 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Tanaka M, Suda T, Takahashi T, *et al*. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes[J]. EMBO J, 1995, 14(6): 1129－1135.

[2] Suda T, Tanaka M, Miwa K, *et al*. Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand[J]. J Immunol, 1996, 157(9): 3918－3924.

[3] Xiao S, Jodo S, Sung S S, *et al*. A novel signaling mechanism for soluble CD95 Ligand. synergy with anti-CD95 monoclonal antibodies for apoptosis and NF-kappaB nuclear translocation[J]. J Biol Chem, 2002, 277(52): 50907－50913.

[4] 罗俊卿，许其稳，王珍亮，等. 氧化砷诱导人肝癌细胞凋亡相关基因的实验研究[J]. 中国现代医学杂志，2003，13(6)：30－31.

[5] 席 睿，阮 翘，韩星敏. 原发性肝癌患者血清铁蛋白、酸性铁蛋白检测[J]. 郑州大学学报(医学版)，2002，37(1)：43－44.

[6] 陈 军，郑宣鹤，唐晓鹏. 慢性乙型肝炎患者与肝癌患者血清可溶性 Fas 水平研究[J]. 湖南医科大学学报，2001，26 (2)：173－174.

(编辑 周 芳)