文章编号:1000-5404(2003)12-1065-04

论著

阿拉瑞林对 GnRH 受体阳性肝癌细胞 Fas/FasL 基因表达的影响

袁 彪[1],张金山[1],张远强[1],李 韧[2],黄鲁豫[3],孙 岚[1],朴永安[1] (第四军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室;[2]西京医院肝胆外科;[3]全军创伤骨科研究所,西安 710032)

提 要:目的 探讨 Fas/Fasl 系统在 LHRH 类似物抑制肝癌细胞增殖过程中的作用。方法 用免疫组织化学方法检测 SMMC7721 肝癌细胞中 GnRH 受体的表达;用半定量 RT-PCR 方法(QRT-PCR)观察 LHRH 类似物对 SMMC7721 肝癌细胞中 Fas/FasL 系统 mRNA 表达的变化。结果 SMMC7721 肝癌细胞呈 GnRH 及其受体免疫反应阳性。PCR 反应产物均与预期长度相符合。Fas/FasL-mRNA 水平随 LHRH 类似物浓度增加而增大,经方差分析各组间有显著性差异(Fas,$F=16.518$ FasL,$F=111.583$,$P<0.01$)。结论 SMMC7721 肝癌细胞具有自分泌 GnRH 的功能;Fas/FasL 系统可能参与了 LHRH 类似物对肝癌细胞增殖的抑制作用。

关键词:Fas/FasL;半定量 RT-PCR;免疫组织化学;GnRH/类似物
中图法分类号:R394.2;R735.7;R977.12 文献标识码:A

Effect of Alarelin on Fas/FasL gene expression in gonadotropin-releasing hormone receptor positive hepatocarcinoma cells

YUAN Biao, ZHANG Jin-shan, ZHANG Yuan-qiang, LI Ren, HUANG Lu-yu, SUN Lan, BU Yong-an (Department of Histology and Embryology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: **Objective** To explore the significance of Fas/FasL system in the inhibition of gonadotropin releasing hormone (GnRH) analog Alarelin on hepatocellular carcinoma (HCC) cell proliferation. **Methods** Expression of GnRH receptor in HCC cell line-SMMC7721 was detected by using immunohistochemical ABC technique. Semi-quantitative RT-PCR (QRT-PCR) was employed to observe the changes of Fas/FasL mRNA in HCC cells following Alarelin treatment at different concentrations. **Results** Human HCC cell line-SMMC-7721 exhibited GnRH and its receptors immunoreactivity positive. The length of RT-PCR product was consistent with that of the predicted Fas/FasL mRNA. The expression of Fas/FasL mRNA in SMMC-7721 cells increased with the enhancement of Alarelin concentration. Analysis of variance revealed significant difference between the groups ($P<0.01$). **Conclusion** Human hepatocarcinoma SMMC-7721 cell can induce GnRH in an autocrine manner. Fas/FasL system might be involved in the inhibitory effect of GnRH analog on human hepatoma cell proliferation.

Key words: Fas/FasL; semi-quantitative RT-PCR; immunohistochemistry; GnRH/analog

原发性肝癌或称肝细胞性肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度高,进展快,由于肝癌目前对手术加化疗和放疗的综合治疗效果并不满意[1,2],因此迫切需要找到一种更加高效、安全的治疗方法。近年来肿瘤的内分泌治疗作为一种高效低毒的治疗方法,已引起众多肿瘤病理学家和临床工作者的重视[3~5]。促性腺激素释放激素(GnRH)是由下丘脑神经元分泌的一种十肽激素,对哺乳类生殖功能有重要调节作用。已有研究表明[6],肝癌细胞上存在 GnRH 结合位点,GnRH 类似物在体外可抑制肝癌细胞的生长,但其具体机制仍不明了,有推测可能是通过增加细胞的凋亡导致的。本研究拟检测 SMMC7721 肝癌细胞系的 GnRH 自分泌功能;并重点探讨 GnRH 类似物阿拉瑞林对 SMMC7721 肝癌细胞 Fas/FasLmRNA 表达的影响,为深入研究 GnRH 类似物抑制肝癌细胞增殖的机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 SMMC7721 由本校细胞工程研究中心惠赠并在本室保存。兔抗 GnRH 多克隆抗体由法国波尔多大学神经

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900142)
作者简介:袁 彪(1963-),男,北京市人,硕士,讲师,主要从事组织学与胚胎学方面的研究。电话:(029)3374511
通信作者:张金山,电话:(029)3374511,E-mail:Jszhang@fmmu.edu.cn
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞化学实验室 Tramu 教授惠赠；兔抗 GnRH 独特型抗体为本室制备，可识别 GnRH 受体。SABC 试剂盒购自武汉博士德生物公司；DAB 和牛血清白蛋白为 Sigma 公司产品。DMEM 培养基液购自 Gibco 公司；胎牛血清为杭州四季青生物材料研究所生产；Trizol 购自 Invitrogen 公司；反转录系统 Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 及 DNA Marker 均购自 MBI Fermantas 公司；Taq 酶及琼脂糖购自上海生物工程公司。所用引物均根据 GeneBank 中人的 Fas、FasL 及内参β-actin 的 mRNA 序列用软件 Primer Premier5.0 设计，引物均由上海生工生物工程公司合成，Fas 引物序列为：上游：5′-GCATCTGGACCCTCCTACCTCTG-3′、下游：5′-GACAAAGCCACCCCAAGTTAGA-3′，PCR 产物长度为 528 bp；FasL 引物为：上游：5′-TTCTGGTTGCCTTGGTAGGATTG-3′、下游：5′-TTCCTCCATTTGTCTGGCTCATA-3′，PCR 产物长度为 775 bp；β-actin 引物上游为：5′-GGCCGGGACCTGACTGACTAC-3′、下游为：5′-TCTTTGCGGATGTCCACGTC-3′，PCR 产物长度为 332 bp。

1.2 方法

SMMC7721 人肝癌细胞可在 DMEM 培养基中贴壁生长，按常规方法培养。免疫组织化学染色按常规 SABC 方法进行，将长有 SMMC7721 肝癌细胞的盖玻片从培养皿中取出，40 g/L 聚甲醛固定 30 min，玻片分别经 0.3% 甲醇双氧水和 1 g/L TritonX-100(PBS)处理 30 min 后，滴加 10 ml/L 正常羊血清孵育 30 min；滴加第一抗体(兔抗 GnRH 抗体的稀释度为 1∶4 000，兔抗 GnRH 独特型抗体的稀释度为 1∶200)后 4 ℃湿盒内孵育过夜；PBS 冲洗后滴加 1∶200 稀释的羊抗兔 IgG 室温下孵育 3 h；最后滴加 1∶100 的 SABC 复合物室温下孵育 1 h 后 DAB 显色，镜下观察控制反应强度。阴性对照实验包括用正常兔血清和 PBS 代替第一抗体进行孵育。RT-PCR 将 SMMC7721 细胞按每孔 1×10^5 接种到 5 块 24 孔细胞培养板中，待细胞完全贴壁后，加入阿拉瑞林，使每块培养板中每孔的药物终浓度分别达到 100 μmol/L(A 组)，10 μmol/L(B 组)，1 μmol/L(C 组)，100 nmol/L(D 组)和 10 nmol/L(E 组)。培养 48 h 后，收集细胞，提取 RNA。将每组细胞等分为 6 小组，分别提取 RNA，加入 Trizol 1 ml，并以加样器反复抽吸直至细胞充分裂解，室温静置 5 min，加入氯仿 0.2 ml，剧烈振荡 15 s 后，4 ℃，12 000× g 离心 20 min，小心吸取上层水相，加入等体积异丙醇，4 ℃静置 30 min，4 ℃，12 000× g 离心 20 min，弃上清，以 75% 乙醇洗涤沉淀 1 次，4 ℃ 5 000× g 离心 5 min，弃上清，沉淀自然干燥 3 min，加 15 μl 无 Rnase 水溶解沉淀，取 5 μl 用于反转录。cDNA 第一链的合成根据 RevertaidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书，在 PCR 反应管 1 ml 中依次加入去离子水 6 μl，随机六聚体引物 1 μl 和 5 μl 总 RNA，70 ℃变性 5 min，立即冰浴，加入 5× Reaction Buffer 4 μl，RNA 酶抑制剂 1 μl 和 10 mmol/L dNTP 2，25 ℃ 5 min，加入反转录酶 1 μl，25 ℃继续反应 10 min，42 ℃ 1 h，70 ℃ 5 min 灭活反转录酶置－20 ℃备用。PCR 扩增在 0.5 ml PCR 反应管中依次加入：41 μl 去离子水、10× PCR Buffer(plus Mg^{2+}) 5 μl 10 mmol/L dNTP 1 μl、Fas 和 FasL 上下游引物各 0.5 μl、反转录产物 2 μl，Taq 酶 0.5 μl 总反应体积 50 μl，加入少许矿物油后，置 PCR 仪上进行扩增，反应条件为：94 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 40 s，58 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 2 min，共循环 35 次，待循环至第 7 轮结束时，分别再加入β-actin 的上下游引物各 0.5 μl，继续反应，最后 72 ℃再延伸 10 min。PCR 产物含量的检测 分别取 10 μl PCR 产物上样于含 10 g/L 琼脂糖的凝胶中电泳 1 h，经 EB 染色后，在紫外灯下观察，并扫描各条带的度值，并计算 Fas 和 FasLmRNA 的相对含量。

1.3 统计学处理

全部数据以软件 SPSS10.0 进行 t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 GnRH 及其受体蛋白的检测

免疫组化 SABC 法染色特异性良好，免疫反应产物呈棕褐色，背景着色很浅，反差明显，阳性反应物质易于识别。两种阴性对照试验均呈阴性反应。GnRH 及其受体蛋白均定位于 SMMC7721 细胞的胞质内和胞膜上，胞核未见阳性反应产物，见图 1、2，说明 SMMC7721 肝癌细胞能同时表达 GnRH 和其受体。



图 1 肝癌细胞 **GnRH** 免疫染色 (SABC× 170)

Fig 1 Immunostaining of GnRH in hepatocarcinoma cells (SABC× 170)



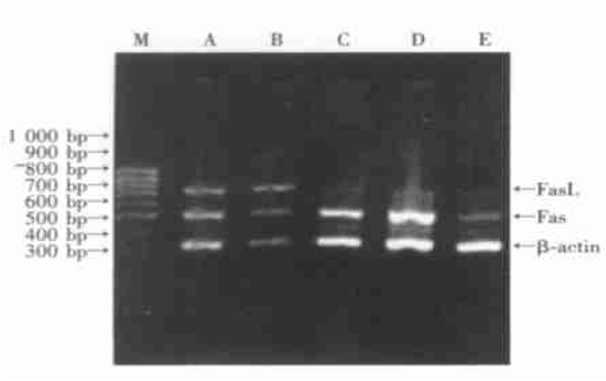
图 2 肝癌细胞 **GnRH** 受体免疫染色 (SABC× 340)

Fig 2 Immunostaining of GnRH receptor protein in hepatocarcinoma cells (SABC× 340)

2.2 PCR 产物的凝胶电泳

PCR 产物经凝胶电泳鉴定，扩增片段特异性强，Fas 条带大小约 500 bp，FasL 条带大小约 700 bp，β-actin 条带大小约 300 bp，均与预期大小相符，见图 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



M: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder; A: 100 μmol/L; B: 10 μmol/L; C: 1 μmol/L; D: 100 nmol/L; E: 10 nmol/L

图 3　PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig 3　Agarose electrophoresis of PCR product

2.3　Fas/FasLmRNA 的定量分析

不同浓度阿拉瑞林处理后 SMMC7721 细胞 Fas/FasLmRNA 表达的相对量见表 1。Fas 组间差异显著（$F=16.518$，$P<0.01$）；FasL 组间差异显著（$F=111.583$，$P<0.01$）。各浓度组间以均具有显著性差异（$P<0.01$）。

表 1　不同浓度阿拉瑞林作用下肝癌细胞 Fas/FasLmRNA 的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

Tab 1　Expressions of Fas/FasL mRNA in the hepatoma SMMC7721 cells following Alarelin treatment at different concentrations（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

Group	Fas/β-actin	FasL/β-actin
A	0.797±0.035	0.541±0.022
B	0.854±0.034	0.602±0.014
C	0.905±0.043	0.639±0.028
D	0.838±0.049	0.536±0.028
E	0.797±0.051	0.455±0.033

3　讨论

人肝癌组织中有 GnRH 及其受体分布，其表达与肝癌组织的增殖与分化有关[7,8]。Yin 等首先发现人肝癌细胞系 $HepG_2$ 可表达 GnRH 及其受体基因，认为 GnRH 可能是肝癌细胞生长的自分泌调节因子。我们也发现 GnRH 类似物可抑制肝癌 hHCC 细胞荷瘤裸鼠瘤体的生长，现用免疫组织化学方法检测到 SMMC7721 中有 GnRH 受体表达，从而证实 SMMC7721 肝癌细胞为 GnRH 受体阳性细胞。

Fas 又称 CD95，属于肿瘤坏死因子受体家族（Tumor necrosis factor receptor，TNFR）中的一员，其配体 FasL(CD95L)则属于肿瘤坏死因子家族，Fas 和 FasL 在多种免疫事件中发挥了重要的角色，Fas/FasL 系统不仅是 CTL 细胞杀伤靶细胞的三大途径之一，也是机体下调免疫反应时激活的 T 淋巴自我清除的主要因素[8]，在这些作用中，其最基本的分子水平机制是由 Fas/FasL 参与的细胞凋亡信号传导作用，目前的研究认为，当细胞膜表面的 fas 与 fasL 结合后，Fas 分子胞浆侧的死亡结构域（Death domain）通过一个被称为 FADD/MORT1 的接头分子募集 Caspase8 激酶，并引起 Caspase8 的自激活，从而启动表达 Fas 细胞的程序性死亡。目前 Fas/FasL 系统已成为肿瘤免疫学上免疫性凋亡的研究热点[9~11]，研究表明多种肿瘤可通过 Fas 反攻击模式作为逃避机体免疫识别和杀伤的方式，肿瘤细胞通过低表达或不表达 Fas 而自身表达 FasL 来诱导肿瘤组织中浸润的淋巴细胞发生凋亡，从而得以逃避免疫细胞的杀伤及自身的凋亡作用，该机制已在较多的体外实验中得到证实。体外诱导肝癌细胞凋亡的方法很多[12~16]，将 FasL 基因转入人肝癌细胞 HCC9204 后发现肝癌细胞出现凋亡。我们利用不同浓度的 GnRH 类似物阿拉瑞林刺激 GnRH 受体阳性肝癌细胞系 SMMC7721，半定量 PCR 方法检测 Fas/FasL-mRNA 水平的变化，发现给予阿拉瑞林刺激后，肝癌细胞中 Fas 及 FasLmRNA 的表达水平均上调，其中 Fas 的增加水平尤为明显，阿拉瑞林的这种刺激效应与刺激浓度及作用时间有关，由于 Fas 表达量的增加，从而促进了肿瘤细胞的自我凋亡作用。

参考文献：

[1] Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, *et al*. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial[J]. Lancet, 2000, 356(9232): 802—807.

[2] Hargreaves G M, Adam R, Bismuth H. Results after nonsurgical local treatment of primary liver malignancies[J]. Langenbecks Arch Surg, 2000, 385(3): 185—193.

[3] Neskovic-Konstantinovic Z B, Nikolic-Vukosavljevic D B, Brankovic-Magic M V, *et al*. Content of epidermal growth factor receptor in metastatic breast cancer: its role in endocrine sensitivity prediction[J]. Neoplasma, 2000, 47(2): 107—113.

[4] Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, *et al*. Circulating neuroendocrine markers in patients with prostate carcinoma[J]. Cancer, 2000, 88(11): 2590—2597.

[5] Furuya Y, Akakura K, Tanaka M, *et al*. Endocrine therapy for recurrence after definitive radiotherapy in patients with prostate cancer[J]. Int J Urol, 2001, 8(5): 222—226.

[6] Teplan I. Peptides and antitumor activity. Development and investigation of some peptides with antitumor activity[J]. Acta Biol Hung, 2000, 51(1): 1—29.

[7] Nakatani T, Roy G, Fujimoto N, *et al*. Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin[J]. Jpn J Cancer Res, 2001, 92(3): 249—256.

[8] Webb S, Sherratt J, Fish R. Cells behaving badly: a theoretical model for

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

the Fas/FasL system in tumour immunology[J]. Math Biosci, 2002, 179(2): 113.
[9] Hsieh M H, Patterson A E, Korngold R. T-cell subsets mediate graft-versus-myeloid leukemia responses *via* different cytotoxic mechanisms[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2000, 6(3): 231—240.
[10] Silvestris F, Cafforio P, Tucci M, *et al*. VEINCTR-N, an immunogenic epitope of Fas (CD95/Apo-1), and soluble Fas enhance T-cell apoptosis *in vitro*. Ⅱ. Functional analysis and possible implications in HIV-1 disease[J]. Mol Med, 2000, 6(6): 509—526.
[11] Shimonishi T, Isse K, Shibata F, *et al*. Up-regulation of fas ligand at early stages and down-regulation of Fas at progressed stages of intrahepatic cholangiocarcinoma reflect evasion from immune surveillance[J]. Hepatology, 2000, 32(4 Pt 1): 761—769.
[12] 姬统理, 催大祥, 高 下, 等. 转染的FasL基因诱导HCC9204细胞凋亡的形态学研究[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(2): 141—143.
[13] 扬连君, 王文亮. Bax蛋白稳定高表达肝癌细胞的建立及其凋亡[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(5): 455—458.
[14] 吴 涛, 窦科峰, 李开宗. 全反式维甲酸和苯乙酸钠联合对人体肝癌细胞的诱导分化作用[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(9): 783—785.
[15] 扬连君, 王文亮, 司晓辉. 乙醇诱导肝癌细胞凋亡的形态学观察[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(16): 1460—1462
[16] 张传山, 王文亮, 黄高升, 等. 反义端粒酶RNA抑制肝癌细胞生长的机制[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(18): 1637—1640

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)12-1068-02

三峡库区肺吸虫病临床表现和误诊原因分析

Clinical manifestations of paragonimiasis and analysis of the reasons for misdiagnosis in reservoir areas of the Three Gorges of Yangtze River

张敬如, 王 英, 杨 松, 张锡林 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室, 重庆 400038)

肺吸虫病临床表现复杂多变, 误诊率高。我们收集了近年来在我室确诊的肺吸病46例, 对其临床表现及误诊原因分析如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

46例病人中男36例, 女10例。年龄4~54岁, 15岁以下儿童占83%。从发病到确诊时间20 d至10年。41例有吃生溪蟹史, 4例曾吃油煎溪蟹, 1例不详。病人主要来自三峡库区的奉节、丰都、云阳、涪陵、万县, 少数病人来自渝北、市郊和川南地区等。46例病人都为我校附属医院的门诊或住院病人。

1.2 临床表现

本组病例起病均较缓慢, 从吃溪蟹到发病最短20 d, 最长2年。发病初期症状轻微, 主要表现为胸部不适、食欲减退、乏力等。后期因虫体侵害部位不同有不同表现, 同一病例可出现一种或一种以上临床症状。①皮下包块型22例, 其中15例为游走性包块, 除3例同时出现多个包块外, 其余均为单个。位于腹部8例, 胸部6例, 颈部3例, 腰部2例, 背部、阴囊各1例。包块表面光滑, 质中, 最大4 cm×5 cm, 最小1 cm×0.5 cm。8例作活检, 病理切片均为嗜酸性肉芽肿, 可见虫体移行形成的隧道, 2例检获斯氏肺吸虫童虫。②胸肺型21例, 以胸痛、咳嗽、胸腔积液为主要表现。咳嗽以干咳为主, 症状较轻, 痰量少, 呈白色粘稠状, 3例咳铁锈色痰, 咯血1例。胸腔积液16例, 反复抽液者6例, 1例抽液总量达8 000 ml。胸水草黄色12例, 血性2例, 脓性2例。③脑型4例, 均表现为阵发性剧烈头痛、呕吐, 1例出现左侧肢体瘫痪, 1例出现左侧肢体麻木, 1例行脑手术, 术后病理检查提示嗜酸性粒细胞浸润。④心包炎型4例, 主要表现为呼吸困难、胸痛、心包积液。⑤腹型2例, 以腹痛、腹泻为主要表现。

1.3 诊断

由于斯氏肺吸虫在人体内不能发育为成虫, 痰和粪便中很难查到虫卵, 因此我们以免疫学诊断为依据, 结合流行病史、临床体征, 如生食或半生食溪蟹史、皮下游走性包块等进行确诊。诊断标准:①到过或来自流行区, 有生食或半生食溪蟹史。②皮下游走性包块。③外周血嗜酸性粒细胞增多。④肺吸虫抗原皮试阳性。⑤肺吸虫对流免疫电泳或ELISA阳性。因肺吸虫抗原皮试和其它蠕虫感染有交叉反应, 所以最后确诊一般依据对流免疫电泳或ELISA结果。

本组46例病人外周血嗜酸性粒细增高者40例; 肺吸虫抗原皮内试验阳性者44例, 其中强阳性反应17例, 有1例出现延迟反应, 在皮试阳性皮丘消退后16 h皮丘肿大为直径4 cm包块, 质软, 40 h后消退; 19例病人做过肺吸虫对流免疫电泳均为阳性; 42例病人做过ELISA均为阳性。

1.4 误诊情况

46例病人初诊时仅6例怀疑为肺吸虫感染, 但未明确诊断和进行抗肺吸虫治疗。40例患者在院外多次误诊, 误诊率达86%。被误诊为结核性胸膜炎者10例, 肺炎9例, 肺结核6例, 脑占位性病变3例, 癫痫、败血症、肺肿瘤、结核性心包炎、化脓性心包炎各2例, 肝脓肿、支气管扩张各1例, 其中支气管扩张1例误诊时间长达10年。

(下转1072页)

作者简介: 张敬如(1972—), 女, 河北省深泽县人, 助理实验师, 主要从事疟疾防治方面的研究。电话: (023)68752243

收稿日期: 2002-10-28; 修回日期: 2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net