录的差异，结果提示C蛋白能抑制P16、P27的转录与表达。由于C蛋白抑制了P16和P27的表达，因此间接提高了细胞周期素依赖性激酶(CDK)的功能，进而促进细胞进入S期。

Ray等[6]发现C蛋白在COS7细胞和Hela细胞中能够抑制P53基因启动子的转录，认为这很可能是HCV致癌的一个重要机制。相似的研究报告称C蛋白还能够抑制P21基因启动子的转录[7]。但近期Wen等[3]报告在无P53表达的肝癌细胞株Hep3B和表达野生型P53的肝癌细胞株$HePG_2$中，HCV C蛋白对内源性和外源性p53均表现为激活作用，并通过p53依赖途径激活p21。我们的结果与Wen等的研究结论相似，在表达野生型P53的肝癌细胞株$HePG_2$中，HCVC蛋白对p53表现为激活作用。如何解释HCV C蛋白对P53基因表达影响的差异，尚需进一步的研究讨论。

虽然HCV核心蛋白被认为有致癌作用，但其致癌机制仍存在较大争议。我们的研究提示HCV核心蛋白可能通过调节某些基因的转录与表达，增加细胞DNA合成，扰乱细胞周期，进而参与致癌过程。

参考文献：

[1] 刘重阳，刘为纹，杨建民，等. HCV核心基因cDNA真核表达载体的构建及其表达[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(9)：1 049－1 050.
[2] Farinat F, Cardin R, D' Errico A, *et al*. Hepatocyte proliferative activity in chronic liver damage as assessed by the monoclonal antibody MIB1 Ki67 in archival material: the role of etiology, disease activity, iron, and lipid peroxidation[J]. Hepatology, 1996, 23(6): 1 468－1 475.
[3] Wen L, Shih Y L, Min C, *et al*. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein[J]. Virology, 1999, 264: 134－141.
[4] 黄杰雄，黄致治. 增殖细胞核抗原的研究进展[J]. 国外医学：生理病理科学与临床分册，1994，14(1)：9.
[5] 杨建民，汪荣泉，保 国，等. HCV感染对肝癌一些相关基因产物表达的影响[J]. 肿瘤，2000，20(1)：40－41.
[6] Ray R B, Steele R, Meyer K, *et al*. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein[J]. J Bio Chem, 1997, 272(17): 10 983－10 986.
[7] Ray R B, Steele R, Meyer K, *et al*. Hepatitis C virus core protein represses p21WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity[J]. Gene, 1998, 208(2): 331－336.

(编辑 薛国文)

文章编号：1000-5404(2001)09-1057-01

个案与短篇

C5a对血管内皮细胞表达P-选择素的影响

Effect of C5a on p-selectin expression in endothelial cells *in vitro*

黎 庶，汪正清 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室，重庆 400038)

中性粒细胞与血管内皮细胞间的粘附及跨内皮移行是炎症反应的关键环节，选择素等粘附分子在其中发挥着重要的作用。炎症局部产生的TNF、凝血酶、激活的补体片段等多种因素都能上调粘附分子的表达，但C5a对P-选择素表达的影响尚不十分清楚，本实验在体外用不同浓度C5a与培养的人脐静脉内皮细胞用，测定P-选择素及中性粒细胞粘附率的动态变化，研究C5a对P-选择素表达和对中性粒细胞粘附的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株ECV304：本室冻存；重组人C5a[美国sigma公司]；小鼠抗人P-选择素单克隆抗体[美国Pharmingen公司]；其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 按常规方法进行。

1.2.2 多形核中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophil：PMN)的分离与纯化 按常规Percoll密度梯度离心法分离中性粒细胞配制工作悬液(1.0×10^6个/ml)。

1.2.3 P-选择素的检测 将培养至融合的细胞分两组，1组用10、25、50、100、250、500 nmol/L的C5a分别刺激10 min以观察量效关系；另1组选用250 nmol/L的C5a分别作用5、10、15、30 min观察时效关系。ELISA夹心法[1]测定内皮细胞P-选择素表达水平。490 nm处检测吸光度。同时设阴性对照组(用PBS代替一抗)。

1.2.4 白细胞粘附率的测定 将内皮细胞培养至融合后，C5a的作用剂量及时间与上述相同，弃培养基，每孔加PMN工作悬液100μl，孵育30 min，取上清液，并用200μl无血清，无抗生素的DMEM培养基轻洗2次，连同上清液一并进行白细胞计数(重复3次)。粘附率＝(1×10^5－收集的白细胞数)/1×10^5。

1.2.5 统计学处理 实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，用单因素方差分析。

2 结果

2.1 C5a刺激内皮细胞P-选择素的表达及中性粒细胞粘附率的量效关系

结果显示，P-选择素的表达水平随C5a浓度的增加而逐渐增高。尤当C5a浓度为10 nmol/L时最显著(P-选择素由正常时的0.326±0.07升至0.506±0.01)，而当C5a浓度≥250 nmol/L时，这种上升趋势明显减弱。但各浓度点的测值与正常对照比

(下转1060页)

作者简介：黎 庶(1972－)，女，重庆市人，硕士研究生，助教，主要从事微生物致病机制及防治方面的研究。电话：(023)68752239
收稿日期：2001-06-20；修回日期：2001-08-30

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

白分子量为20.1×10³，二者基本一致。使用"单抗"TRAIL抗体进行Western blot，结果显示我们所纯化的蛋白和上清液所在泳道阳性条带均在20.1×10³处，进一步证实了我们所提的蛋白为可溶性TRAIL。

为了检测TRAIL的抗肿瘤活性，我们用MTT法研究TRAIL对结肠癌细胞系SW480的作用，结果显示，TRAIL能有效的杀死结肠癌SW480细胞，呈现出较好的量效关系和时效关系。国外也有报道[1,6]，TRAIL对包括SW480在内的多种结肠癌细胞系有较好的作用。与国外类似的结果表明我们所纯化的蛋白具有很好的抗肿瘤活性。TRAIL抗肿瘤作用主要是通过与TRAIL-R1、R2结合后导致肿瘤细胞凋亡[7,8]而实现的，MTT法检测的是活细胞数，因此，TRAIL诱导细胞凋亡的作用尚需在今后进一步研究。

尽管最近发现正常人的肝细胞对TRAIL很敏感，有可能给TRAIL的临床应用带来障碍，但Ozoren等[6]发现caspase-9的抑制剂Z-LEHD-FMK可以保护正常人的肝细胞，而不影响TRAIL对一些肿瘤细胞的杀伤作用。因此，TRAIL仍有可能成为一种很好的抗肿瘤药物。本研究成功地利用大肠杆菌表达出TRAIL蛋白，并且分离纯化出的TRAIL蛋白有较好的抗肿瘤活性，为今后TRAIL进一步开发利用提供了实验基础。

参考文献：

[1] Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, *et al*. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand[J]. J Clin Invest, 1999, 104(2): 155—162.

[2] Walczak H, Miller R E, Ariail K, *et al*. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*[J]. Nat Med, 1999, 5(2): 157—163.

[3] Snell V, Clodi K, Zhao S, *et al*. Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies[J]. Br J Haematol, 1997, 99(3): 618—624.

[4] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯 著. 金冬雁, 黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998.55—56.

[5] 刘昌孝, 孙瑞元 著. 药物评价实验设计与统计学基础[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999.17.

[6] Ozoren N, Kim K, Burns T F, *et al*. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand[J]. Cancer Res, 2000, 60(22): 6 529—6 265.

[7] Pan G, Ni J, Wei Y F, *et al*. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL[J]. Science, 1997, 277(5 327): 815—818.

[8] Sheridan J P, Marsters S A, Pitti R M, *et al*. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors[J]. Science, 1997, 277(5 327): 818—821.

（编辑 潘式文）

（上接1057页）

较相差显著（$P<0.05$），同样，中性粒细胞的粘附率也表现类似变化趋势。即随C5a浓度的增加，中性粒细胞与人脐静脉内皮细胞间的粘附率逐渐递增。

2.2 C5a刺激内皮细胞与P-选择素表达及中性粒细胞粘附率的时效关系

用250 nmol/L的C5a作用5 min后，P-选择素水平就明显上升（由正常时的0.319±0.02升至0.422±0.07），10 min最高达0.568±0.04，而后逐渐下降。但各时相点测值均与对照有显著差异（$P<0.05$），同样，粘附率也随作用时间延长而增加，尤以作用后15 min最高（测值为12.833±0.09，$P<0.01$），30 min时虽有下降，但显著高于对照组水平（$P<0.05$）。

3 讨论

中性粒细胞参与机体的多种炎症反应。其作用的发挥由三个步骤组成：即血液中的中性粒细胞在激活的血管内皮细胞表面缓慢滚动；中性粒细胞激活并与内皮细胞之间发生粘附；细胞变形经由血管内皮细胞间隙外移并向炎症部位游走[2]。其中，第二步是其发挥免疫功能的关键环节，涉及多种粘附分子的参与。P-选择素是一种分子量为140×10³的跨膜糖蛋白，平时存在于内皮细胞的Weibel-Palade小体及血小板α颗粒中，当内皮细胞受到组织胺、氧自由基等因素作用后数分钟便在细胞表面表达，参与炎症细胞的滚动效应的产生[3]。研究发现：预先用蛇毒因子耗竭体内补体可减轻P-选择素介导在中性粒细胞的聚集和粘附程度[4]。本实验结果显示，当用不同浓度的C5a刺激10 min时，P-选择素的表达随着C5a浓度的增加而增加，中性粒细胞粘附率也表现类似的趋势，二者存在量效关系；用250 nmol/L的C5a刺激不同时间，P-选择素的表达水平随着刺激时间的延长而升高，15 min后逐渐下降，而中性粒细胞粘附率在30 min之前逐渐升高，30 min略有下降，二者存在时效关系。中性粒细胞粘附率的下降滞后于P-选择素水平的降低，提示P-选择素可能是影响中性粒细胞与内皮细胞间粘附的重要因子之一。本实验结果对C5a过敏毒素介导的急性炎症反应的防治提供了实验依据。

关键词：C5a；P-选择素；内皮细胞粘附率
中图法分类号：R392.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] Coll V B, Grau J M, Lopez S A, *et al*. Circulating soluble adhesion molecules in patients with classical polyarteritis nodosa[J]. Br J Rheumatol, 1997, 36(11): 1 178—1 183.

[2] Tedder T F, Steeber D A, Chen A, *et al*. The selectins: vascular adhesion molecules[J]. FASEB J, 1995, 9(10): 866—873.

[3] Gibbs S A, Weiser M R, Kobzik L, *et al*. P-selectin mediates intestinal ischemic injury by enhancing complement deposition[J]. Surgery, 1996, 119(6): 652—656.

[4] Bless N M, Tojo S J, Kawarai H, *et al*. Differing patterns of P-selsetin expression in lung injury[J]. Am J Pathol, 1998, 153(4): 1 113—1 122.

（编辑 汪勤俭）

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