

- 2004,70:199-200.
- [4] 陆星华. 小肠镜的临床应用[J]. 中国消化内镜, 2007, 1(2):25-34.
- [5] Tang SJ, Haber GB. Capsule endoscopy in obscure gastrointestinal bleeding[J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2004, 14:87-100.
- [6] Willis JR, Chokshi HR, Zucherman GR, et al. Enteroscopy-enteroclysis: experience with a combined endoscopic-radiographic technique[J]. *Gastrointest Endosc*, 1997, 45:163-167.
- [7] 张晨莉, 马天乐, 金承荣, 等. 34 例不明原因疑小肠出血的病因诊断——推进式双气囊小肠镜与小肠钡灌检查对比研究[J]. *胃肠病学*, 2005, 10(1):15-19.
- [8] Yamamoto H, Kita H, Sunada K, et al. Clinical outcomes of double-balloon endoscopy for the diagnosis and treatment of small-intestinal diseases[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004, 2(11):1010-1016.
- [9] Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, et al. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with obscure gastrointestinal bleeding[J]. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100:2407-2418.
- [10] Carretero C, Fernandez-Urien I, Betes M, et al. Role of videocapsule endoscopy for gastrointestinal bleeding[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(34):5261-5264.
- [11] Pennazio M, Eisen G, Goldfarb N. ICCE consensus for obscure gastrointestinal bleeding[J]. *Endoscopy*, 2005, 37:1046-1050.
- [12] Chan FS, Chu KM. Capsule endoscopy for gastrointestinal bleeding of obscure origin[J]. *Asian J Surg*, 2008, 31:96-99.
- [13] Pennazio M, Santucci R, Rondonotti E, et al. Outcome of patients with obscure gastrointestinal bleeding after capsule endoscopy; report of 100 consecutive cases[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126:643-653.
- [14] 陈翔, 冉志华, 童锦禄, 等. 胶囊内镜与双气囊小肠镜对小肠疾病诊断的荟萃分析[J]. *中华消化内镜杂志*, 2007, 24(4):269-272.
- [15] Fireman Z, Kopelman Y. Small bowel capsule endoscopy: have we conquered the last frontier? [J] *Isr Med Assoc J*, 2008, 10:298-301.
- [16] Voderholzer WA, Ortner M, Rogalla P, et al. Diagnostic yield of wireless capsule enteroscopy in comparison with computed tomography enteroclysis[J]. *Endoscopy*, 2003, 35:1009-1014.
- [17] Golder SK, Schreier AG, Endlicher E, et al. Comparison of capsule endoscopy and magnetic resonance (MR) enteroclysis in suspected small bowel disease[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2006, 21:97-104.
- [18] 戈之铮, 冯楠. 老年人不明原因消化道出血的诊治[J]. *实用老年医学*, 2009, 23(1):15-17.
- [19] Molina Infante J, Perez Gallardo B, Fernandez Bermeio M. Update on medical therapy for obscure gastrointestinal hemorrhage[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2007, 99:457-462.
- [20] Bauditz J, Schachschal G, Wedel S, et al. Thalidomide for treatment of severe intestinal bleeding[J]. *Gut*, 2004, 53:609-612.
- [21] 徐春红, 戈之铮, 刘文忠, 等. 沙利度胺治疗血管发育不良所致消化道出血的疗效观察[J]. *中华消化杂志*, 2008, 28(5):547-550.

(收稿日期:2010-07-22)

白藜芦醇抗白血病作用的分子机制研究进展

姚君霞 综述, 李永军 审校(河北医科大学附属第二医院检验科, 石家庄 050000)

【关键词】 藜芦; 醇类; 白血病; 细胞增殖; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.01.042 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)01-0080-03

白藜芦醇化学名为 3,4',5-三羟基-1,2-二苯乙烯(3,4',5-trihydrolystil-bene), 分子式为 $C_{14}H_{12}O_3$, 属于非黄酮类多酚化合物, 是植物在环境恶化和受到紫外线照射、真菌感染等病理情况下产生的一种植物补体, 对植物本身起保护作用。它主要存在于葡萄、花生、虎杖、桑葚等多种植物中^[1], 以新鲜葡萄皮中的含量最为丰富。早期研究发现, 白藜芦醇具有抗心血管疾病、抗菌、抗病毒、抗氧化、抑制血小板聚集、免疫调节等作用^[2]。随着对其研究的深入, 发现白藜芦醇还具有抗肿瘤活性, 并且在肿瘤的起始、促进和发展 3 个阶段均能起到抑制作用^[3]。近年来的研究表明, 白藜芦醇对多种肿瘤如肝癌、食管癌、肺癌、骨髓瘤、白血病等均有抑制作用, 但其作用机制却不尽相同。本文就其在治疗白血病方面的作用机制加以概述。

1 抑制白血病始发的突变

1.1 抑制细胞色素酶 细胞色素酶 P4501A1(CYP1A1)是正常细胞癌变最重要的酶之一, 它能使致癌物质与胞质中的芳香

烃受体(AHR)结合活化为最终致癌物。体外实验表明, 白藜芦醇可以通过抑制 CYP1A1, 从而抑制致癌物与 AHR 的结合, 达到抑制肿瘤始发的突变^[4]。国外报道, 白藜芦醇可以在 CYP1B1 的作用下转化为一种羟基化合物, 这种羟基化合物可以抑制白血病细胞的增殖^[5]。

1.2 抗氧化和抗氧自由基活性 研究表明, 体内的氧化水平高低以及氧自由基的过表达, 可以引起机体 DNA 的损伤, 导致原癌基因的活化和抑癌基因的失活而引起细胞的癌变。白藜芦醇具有较强的抗氧化活性, 能通过抑制二巯基谷胱甘肽的形成, 使谷胱甘肽处于还原状态, 从而抑制体内氧自由基的形成, 起到抑制肿瘤的始发突变作用^[6], 在对白血病、肝癌、黑色素瘤等的研究中均有此类报道。

2 抑制白血病细胞增殖

2.1 阻滞细胞周期 细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 细胞周期的调控依赖于细胞周期素依赖激酶(CDK), 细胞周期

素(Cyclin)能激活 CDK,细胞周期抑制蛋白 P21WAF1、P27PIP1 却能使 CDK 失活。研究表明,白藜芦醇通过影响 Cyclin 的表达来影响 Cyclin-CDK,从而达到对细胞周期的阻滞。进一步研究发现,白藜芦醇能够诱导细胞周期抑制蛋白 P21WAF1、P27PIP1 的产生,并下调细胞周期蛋白 D1、D2、E 和 CDK2、4、6 的表达,同时还降低 CDK 的活性^[7]。Liu 等^[8]通过对 K562 细胞的研究发现,白藜芦醇作用于 K562 细胞后导致 G1 期细胞增多,而 S 期细胞减少。这一结果显示,白藜芦醇可以通过对细胞周期的调控来达到抑制白血病细胞增殖的作用。

2.2 干扰相关信号转导通路

2.2.1 JAK/STAT

Janus 蛋白酪氨酸激酶(janus protein tyrosine Kinase, JAK)/信号转导子和转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)是细胞内和受体相结合的蛋白质,能完成从胞质到胞核的信号转导。JAK 是非受体型酪氨酸激酶,由 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 组成。JAK1、JAK2 和 TYK2 分布广泛,而 JAK3 仅分布于骨髓和淋巴细胞来源细胞;STAT 是 JAK 的底物,由 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B、STAT6 组成。JAK/STAT 可被多种受体激活,细胞膜上的细胞因子受体与配体结合后,受体能吸引非受体型 JAK 形成同源或异源二聚体,JAK 将受体上的酪氨酸位点磷酸化,使受体上产生与 STAT 结合的区域,STAT 在未受到特异性刺激时位于胞质中,当细胞受到刺激时,STAT 上的 SH2 结构域与受体上被磷酸化的酪氨酸残基结合,此时 STAT 被磷酸化而激活,活化后的 STAT 形成二聚体转运至胞核,一旦活化的 STAT 二聚体识别了目的序列,目的基因的转录效率会迅速提高,在一些抑制因素的作用下,STAT 被去磷酸化而失活,移出核外,终止信号转导^[9]。研究表明,白血病细胞中存在 JAK/STAT 的持续活化现象,用 JAK/STAT 信号通路抑制剂可以抑制白血病细胞增殖,诱导其分化或凋亡^[10]。Li 等^[11]研究发现,白藜芦醇能通过减弱 JAK1 酪氨酸磷酸化活性及下调 P-STAT3 酪氨酸磷酸化程度影响其下游靶基因 Bcl-2 的表达而抑制白血病细胞增殖。

2.2.2 核因子(NF)- κ B

NF- κ B 是最先在成熟的 B 细胞中发现的一种核蛋白,在免疫、炎症反应、细胞的增殖分化和凋亡等方面起作用,NF- κ B 通常与其抑制蛋白 I κ B 结合,以非活跃状态存在于细胞质中。I κ B 是一种抑制蛋白,主要功能是对 NF- κ B 的活化起调控作用,在肿瘤细胞中,I κ B 发生磷酸化被水解释放,解除了 I κ B 抑制作用的 NF- κ B 迅速进入细胞核内,与相应的 κ B 位点特异结合,参与转录过程中 mRNA 的合成,实现对相关基因表达的调控,抑制细胞的增殖,并诱导其凋亡^[12]。Etrov 等^[13]报道,白藜芦醇可以抑制 I κ B 的降解,使其与 NF- κ B 以结合的形式保留在细胞质中,无法参与核内基因的转录,诱导骨髓性白血病细胞凋亡(apoptosis)。

3 诱导白血病细胞凋亡

细胞凋亡又称程序化细胞死亡(programmed cell death),是一种由基因控制的细胞自主性死亡过程,是有核细胞在受到刺激后通过内源性 DNA 内切酶的激活而发生的自动死亡过程,此过程由一系列相关基因协同作用,自 1993 年 Dive 提出以诱导白血病细胞凋亡作为治疗白血病的新方法以来,国内外专家在治疗白血病方面取得了很大进展。现将目前发现的白藜芦醇在诱导白血病细胞凋亡过程中参与的基因作一总结。

3.1 Bcl-2 家族

Bcl-2 蛋白是一种凋亡抑制因子,在细胞凋

亡过程中起重要作用。Bcl-2 蛋白和 Bcl-xL 是 Bcl-2 家族中主要的抗凋亡蛋白,Bax 是主要的促凋亡蛋白,在细胞凋亡过程中 Bcl-2 家族促凋亡蛋白在胱冬肽酶的激活下易位到线粒体膜上,破坏线粒体结构,释放线粒体内一些促凋亡因子,导致细胞凋亡,Bcl-2 蛋白通过其 BH3 结构域与 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白形成二聚体来阻止细胞进入凋亡程序,Bcl-2 能阻止细胞色素 C 从线粒体中释放出来,使细胞色素 C 无法达到激活下游胱冬肽酶的阈值,从而保护细胞不发生凋亡。李覃等^[14]通过对 3 种不同来源的白血病细胞株的研究发现,白藜芦醇可以通过下调 Bcl-2 蛋白的表达,诱导白血病细胞凋亡。

3.2 Caspase

半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)有 10 多种,广泛存在于细胞中,主要以酶原形式存在,Caspase 诱导凋亡与线粒体有很大关系,线粒体内膜释放细胞色素 C 与促凋亡因子 Apaf-1、Caspase-3 形成一个复合体,在 dATP 和腺苷三磷酸(ATP)存在的条件下激活 Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7 等,使凋亡进行下去。冯骥良和温巧莲^[15]发现白藜芦醇可以以 Caspase 依赖方式导致急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞死亡。

3.3 生存素(Survivin)

Survivin 是凋亡抑制蛋白家族中最简单的蛋白分子。研究表明 Survivin 是至今发现的最强的凋亡抑制因子,其存在于胚胎组织及大多数肿瘤组织内,在正常分化成熟的组织中不表达。Caspase 级联式激活并溶解蛋白质是凋亡发生的核心机制,Survivin 可直接作用于细胞凋亡途径末端因子 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9,但并不与它们的酶原或者活化的 Caspase-8 结合,从而阻断凋亡过程。有学者报道,白藜芦醇能下调成人 T 细胞白血病细胞中 Survivin 的表达来诱导肿瘤细胞凋亡^[16]。

3.4 通过 MPTP 诱导凋亡

线粒体通透性转变孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)是位于线粒体内外膜之间由多个蛋白质组成的复合通道,电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)与腺苷酸转位酶(adenine nucleotide translocator, ANT)是其必要的和主要组成部分。MPTP 的开放状态决定着线粒体功能的发挥,细胞氧化还原水平、能量代谢水平、Ca²⁺ 和其他二价金属离子等均可调节 MPTP 开放,促凋亡蛋白 Bax 可与 ANT 或 VDAC 相互作用促进 MPTP 开放,抗凋亡蛋白 Bcl-2 可与 ANT 相互作用或阻止 Bax 与 ANT 相互作用来抑制 MPTP 开放,MPTP 高水平开放导致线粒体质子、电化学梯度耗散,离子稳态被打破,线粒体肿胀和 ATP 水解。这些效应可以通过多种机制导致细胞死亡,包括 ATP 水平下降、胞质 Ca²⁺ 上升、细胞凋亡诱导因子(AIF)及细胞色素 C 释放,导致细胞死亡,白藜芦醇可以通过调节 MPTP 的开放状态来诱导急性淋巴细胞白血病细胞凋亡^[17]。

4 逆转白血病细胞耐药

白血病细胞对化疗药物产生耐药是化疗失败的主要原因,如何克服和逆转白血病细胞的耐药性成为临床化疗急需解决的难题。研究表明,凋亡抑制基因的过表达及凋亡抑制与肿瘤细胞耐药密切相关^[18]。马泳泳和黄进^[19]通过对耐药细胞株 K562/AO2 细胞的研究发现,白藜芦醇能显著抑制 K562/AO2 细胞的增殖并诱导其凋亡,其作用机制是通过下调耐药基因 mdr1 的表达而逆转 K562/AO2 细胞的耐药。

综上所述,白藜芦醇在抗白血病方面显示出越来越重要的作用,但其作用机制比较复杂,对于不同来源的细胞系作用机制也不同。随着现代科学技术的迅速发展,特别是分子生物学

的发展,为进一步深入研究白藜芦醇抗白血病作用的分子机制提供了条件。因此应很好的利用这一条件,进一步加强对白藜芦醇抗肿瘤分子机制的研究,为白藜芦醇的临床应用提供更可靠的依据。

参考文献

- [1] Hudson TS, Hartle DK, Hursting SD, et al. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 8396-8405.
- [2] 黎永胜, 文军. 白藜芦醇的药理作用研究进展[J]. *医学综述*, 2008, 14(3): 469-471.
- [3] Alkhalaf M, Jaffal S. Potent antiproliferative effect of resveratrol on human osteosarcoma SJSA1 cells: Novel cellular mechanisms involving the ERK/P53 cascade[J]. *Free Radical Biol Med*, 2006, 41: 318-325.
- [4] Hari L, Ratan B. Resveratrol-A prostate cancer chemopreventive agent? [J]. *Urologic Oncology*, 2002, 7: 223-227.
- [5] Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, et al. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent pice-atannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86: 774-778.
- [6] Hung LM, Chen JK, Hung SS, et al. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 47: 549-555.
- [7] Athar M, Back JH, Kopelovich L, et al. Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 486: 95-102.
- [8] Liu BQ, Gao YY, Niu XF, et al. Implication of unfolded protein response in resveratrol-induced inhibition of K562 cell proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391: 778-782.
- [9] 吴剑锋, 沈佐君. JAK/STAT 信号通路及其与肿瘤侵袭、转移的关系[J]. *Chem Life*, 2009, 29(2): 176-179.
- [10] Beneklim JH, Baer MR, Baumann H, et al. Signal trans-

ducer and activator transcription proteins in leukemias [J]. *Blood*, 2003, 101: 2940-2954.

- [11] Li T, Wang W, Chen H, et al. Evaluation of anti-leukemia effect of resveratrol by modulating SATA3 signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10: 18-25.
- [12] 崔嵩, 刘学峰, 吴斌. NF- κ B 在肿瘤中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(1): 134-137.
- [13] Etrov Z, Shishodia S, Federl S, et al. Resveratrol blocks interleukin beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-KappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of myeloid leukemia cell[J]. *Blood*, 2003, 102: 987-995.
- [14] 李覃, 范桂香, 王伟, 等. 虎杖提取物白藜芦醇的抗白血病作用及其可能的分子机制[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2008, 29(3): 340-345.
- [15] 冯骥良, 温巧莲. 白藜芦醇以 Caspase 依赖和非依赖两种方式导致 Jurkat 细胞死亡[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(1): 103-108.
- [16] Hayashibara T, Yamada Y, Nakayama S, et al. Resveratrol induces down regulation in surviving expression and apoptosis in HTLV-1-infected cell lines a prospective agent for adult T cell leukemia chemotherapy [J]. *Nutr Cancer*, 2002, 44: 193-201.
- [17] Susan JZ, David HS. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore[J]. *Cancer Lett*, 2006, 240: 123-134.
- [18] Gao F, Zhang JD, Liu YP, et al. Analysis of methylation status of the promoter of mdrl gene in K562/DNR cells [J]. *Chin J Hematol*, 2004, 25: 293-295.
- [19] 马泳泳, 黄进. 白藜芦醇诱导 K562/AO2 凋亡与 mdrl 基因表达的关系[J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17(4): 487-489.

(收稿日期: 2010-07-22)

酶联免疫斑点检测技术研究进展

聂 华 综述, 郝世勇 审校(湖北省襄樊市中心血站 441000)

【关键词】 酶联免疫吸附测定; 免疫印迹法; 实验室技术和方法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.01.043 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)01-0082-03

酶联免疫斑点检测技术(ELISPOT)结合了细胞培养技术与酶联免疫吸附试验(ELISA)的长处,能够分析经特异抗原活化后分泌细胞因子[如 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等]的单个效应细胞的频数,具有敏感、特异、易于重复的优点。ELISPOT 是检测抗原反应性效应细胞的最可靠实验方法之一^[1],目前已成为抗原特异性 T 细胞免疫学研究的主流技术。本文对 ELISPOT 技术作如下综述。

1 ELISPOT 的基本原理

ELISPOT 的培养板以聚偏二氟乙烯(PVDF)膜等为基质,包被上特异性单克隆抗体,在培养板孔内加入细胞培养基、待检测的细胞及抗原刺激物进行培养。在特异性抗原或非特

异性有丝分裂原的刺激下, T 细胞分泌各种细胞因子,细胞因子被膜上的单克隆抗体捕获。被捕获的细胞因子可以与生物素标记的第二抗体结合,然后用酶标亲和素与生物素进行化学酶联显色,在膜的局部形成一个圆形斑点^[2]。

2 ELISPOT 的优点

ELISPOT 得到广泛应用首先是由于其在检测抗原特异性细胞低频数时的高敏感性,比以流式细胞术为基础的技术(四聚体和细胞内细胞因子染色)的敏感性要高出 1~2 个数量级。其次,ELISPOT 可以利用冻存的外周血单(个)核细胞(PBMC)样本来进行免疫监测分析而不丧失细胞的重要活性^[3],同时计算机辅助图像分析系统的使用也使大规模研究成为可能。