

胃癌腹膜转移研究之策略

戴冬秋

戴冬秋, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科、辽宁省胃癌分子病理重点实验室 辽宁省沈阳市 110001

戴冬秋, 男, 1963-10-04 生, 辽宁省凤城市人, 蒙古族, 中国医科大学医学博士, 教授, 主任医师, 博士生导师. 2000-2002 年美国 M.D. 安德森癌症中心博士后研究员, 中国抗癌协会全国胃癌专业委员会委员, 《CMJ》及《世界华人消化杂志》等 5 刊编委及审稿人. 主要从事肿瘤外科、化疗及生物治疗等工作, 专于胃癌转移分子机制及早期预测与阻断的基础和临床研究.

国家自然科学基金项目, No. 30271477

教育部留学回国人员科研启动基金项目, No. 2002-247

辽宁省自然科学基金项目, No. 972273, No. 001037

通讯作者: 戴冬秋, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科、辽宁省胃癌分子病理重点实验室. daidq63@163.com

电话: 024-23256666-6227

收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-11

摘要

腹膜复发转移是胃癌根治术后复发的主要形式, 成为影响胃癌疗效的关键问题. 胃癌腹膜播散转移的形成是一个多因素参与、多阶段的复杂病理生理过程, 其中, 腹膜亚临床转移的早期预测与及时阻断尤为重要. 本文评述了胃癌腹膜转移机制、早诊、预防及治疗的研究进展和策略, 着重分析了进展期胃癌根治术后腹膜亚临床转移早期预测方法及预防措施的地位与存在问题.

关键词: 胃癌; 腹膜转移; 预测; 治疗

戴冬秋. 胃癌腹膜转移研究之策略. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1049-1051
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1049.asp>

0 引言

就我国而言, 胃癌仍是消化系统最常见的恶性肿瘤, 其死亡率仍居恶性肿瘤首位. 临床上诊治的多为进展期胃癌患者, 即使进行了根治性手术等治疗, 其术后 5 a 生存率仍徘徊不前, 究其原因主要是术后复发转移问题, 其中约 50% 左右的患者存在腹膜复发转移, 导致死亡^[1], 表明腹膜是胃癌的常见转移部位. 腹腔内脱落癌细胞的存在是进展期胃癌根治术后腹膜复发转移的前提, 因此, 进展期胃癌根治术的现代理念是必需充分切除原发癌肿, 彻底清除胃周淋巴结, 完全杀灭腹腔脱落癌细胞. 三者中任何一点处理不完善, 均可导致治疗失败. 检测与杀灭腹腔脱落癌细胞已成为外科医师的一项重要工作内容, 有效的预测与控制腹膜转移亦是当今提高进展期胃癌疗效的关键课题之一. 因此, 同道们应加强协作, 集中攻关, 针对进展期胃癌腹膜复发转移机制、预测方法及阻断措施等问题制定相应研究策略, 进而指导胃癌的合理治疗, 降低腹膜复发转移率, 改善预后.

1 胃癌腹膜转移机制的研究

尽管胃癌腹膜复发转移的机制目前尚未明了, 但已有的研究表明, 胃癌腹膜播散转移是一个多阶段、多因素参与的复杂过程. 其基本步骤包括: (1) 癌细胞脱落入腹腔, 主要源于浸透浆膜的胃癌原发灶, 当然亦包括来自于腹腔淋巴结或脏器转移灶. 此外, 部分因素为医源性播散, 如术中解剖分离、残留血块、切断端淋巴管癌细胞溢出等. (2) 脱落癌细胞保持活性, 在腹腔内游走并黏附于腹膜. (3) 癌细胞着床, 增殖侵袭, 新生血管形成, 发展成转移癌结节.

目前认为进展期胃癌术后腹膜复发转移的主要机制是“种子-土壤”学说. 前述脱落的具有活性的胃癌细胞即为“种子”, “种子”的活性可影响腹膜形态发生变化, 间皮细胞分离, 甚至脱落^[2], 而且手术造成的腹膜创伤, 使腹膜间皮下细胞外基质暴露, 即形成所谓的“土壤”. 此外, Hagiwara *et al* 于 1993 年提出乳斑学说, 认为大网膜乳斑为腹膜上的淋巴样组织. 此处间皮细胞排列并非连续, 有助于脱落胃癌细胞种植^[3]. 成纤维细胞增生, 纤维蛋白将腹腔内癌栓截留于受创伤的腹膜表面亦是术后腹膜复发转移的原因之一.

关于胃癌腹膜转移的分子机制, 国内外学者从不同角度进行了大量研究, 认为黏附分子参与其中, 主要包括 E-钙黏附素, β_1 整合素, CD44 及 CEA 等^[4-10]. 此外, β -葡萄糖醛酸酶、基质金属蛋白酶(MMP)等蛋白水解酶, 细胞动力因子及新生血管形成与增殖亦是腹膜转移相关的重要因素^[11-14]. 尽管国内学者在此领域做了许多工作, 所涉及的范围亦较广, 但许多文章为阶段性工作, 尚缺乏系统性与连续性, 多为跟踪性或重复性研究, 原创性内容并不多, 反映出目前的研究与国际水平尚有一定差距, 这些问题亟待解决.

2 胃癌腹膜转移的早诊与预测

腹膜转移的早期难于诊断, 为“亚临床”状态, 出现肠梗阻和腹水时即为晚期. 借助超声、CT 等影像学手段、腹腔镜及腹腔穿刺抽吸腹水查癌细胞等办法多可确诊, 在此不再赘述. 如何提高胃癌根治术后腹膜亚临床转移的早期预测水平是目前的热点和难点, 结合我们的系列研究工作与文献报道情况, 主要包

括以下问题: (1) 胃癌原发灶生物学行为与腹腔脱落癌细胞检测. 腹腔内大量具有活性的脱落癌细胞的存在是胃癌根治术后腹膜复发转移的先决条件, 1998年日本胃癌学会把胃癌腹腔脱落癌细胞列入分期的一项重要诊断指标^[15]. 因此, 腹腔冲洗液细胞学检查仍是目前胃癌腹膜亚临床转移早期预测的最常用方法和金标准. 但并非所有浸透浆膜的进展期胃癌均能检测出腹腔脱落癌细胞, 80年代我们率先在国内开展此项研究发现, 胃癌浆膜类型及受浸面积与癌细胞脱落关系密切, 浆膜受浸时, 腹腔脱落胃癌细胞阳性率达43.2%; 受浸面积超过20 cm²者, 腹腔脱落癌细胞阳性率大于60%, 且脱落癌细胞阳性者90%以上为臃肿与多彩弥漫型^[16-18]. 目前, 术前影像学、超声内镜判定浆膜受浸状态, 术中胃癌浆膜类型判定、腹腔冲洗液细胞学及相关因子检查已成为我们早期预测胃癌腹膜亚临床转移较为有效的常规手段. (2) 腹腔冲洗液的分子标志物检查. 据国内外文献报告, 目前常用的指标包括CEA、E-cadherin、CD44、整合素 $\alpha_2\beta_1$ 、 β -葡萄糖醛酸酶、MMP-2、MMP-7、Survivin、L3-PP、Reg-IV、DCC、CK20、TGF- β 、VEGF、IV型胶原和层粘连蛋白等^[6-14, 19-23], 最近有报道检测腹腔冲洗液中基因启动子甲基化水平对预测腹膜亚临床转移有一定意义. 腹腔冲洗液中肿瘤分子标志物检测除了常规手段外, 近年来RT-PCR方法检查基因mRNA表达水平得到广泛应用, 其敏感性较传统方法有所提高. 但总体上这些分子标志物尚存在特异性、敏感性、检查方法或技术的标准化程度及实用性等方面的不足, 其临床应用价值仍需进一步验证. 尽管目前国内外大量实验与临床研究表明, 进展期胃癌腹膜转移早期预测的分子标志物候选者众多, 但迄今国内外的基础研究尚未找到一种公认的进展期胃癌腹膜转移早期预测的分子标志物, 临床上更是如此, 仅能做辅助诊断参考指标之一, 即目前进展期胃癌腹膜转移预测尚缺乏有效的分子标志物. 因此, 在筛选胃癌腹膜转移早期预测的分子标志物方面, 应加强基础和临床研究的联系, 着眼于高起点, 鼓励原创性研究, 加强多中心合作, 使基础研究的新成果能尽快过渡到临床应用, 提高临床诊断水平, 指导胃癌亚临床转移的合理防治. 就目前而言, 术前、术中胃癌原发灶浆膜受浸程度、面积及类型的判定, 术中腹腔冲洗液脱落癌细胞检查及肿瘤分子标志物水平的联合检测, 仍是临床上早期预测进展期胃癌根治术后腹膜亚临床转移的有效策略.

3 胃癌腹膜转移的防治策略

迄今为止, 关于进展期胃癌腹膜转移的防治尚无一套标准方案. 进展期胃癌腹膜转移者的5 a生存率低

于20%, 对于已经发生腹膜转移者, 若转移性病灶分布较局限, 可采用腹膜切除术(Peritonectomy)治疗, 辅以术前、术中和术后腹腔化疗. 对转移广泛者, 除了对症处理外, 可适当进行腹腔化疗及生物治疗. 典型的胃癌腹膜转移是疾病的晚期表现, 目前的治疗效果仍不十分理想, 因此, 在胃癌腹膜转移亚临床阶段即给予及时有效的阻断显得尤为重要. 首先, 就外科医生而言, 术中的严格无瘤操作观念和技术是预防胃癌细胞在腹腔医源性播散的重要环节; 其次, 术中封闭癌细胞露出面, 尽量防止血液流入腹腔, 不用纱布擦拭手术野外脏器, 以避免增加癌细胞黏附腹膜的因素; 最后, 术中关腹前的大量液体腹腔冲洗和腹腔温热灌注化疗(CHPP)亦是目前常用的比较有效的腹膜亚临床转移预防办法. 我们经过20 a的基础和临床系列研究表明, 关腹前用含表面活性剂的温热低渗液4 000 mL进行腹腔灌注, 可明显提高进展期胃癌根治术后患者的5 a生存率, 降低腹膜复发率, 无明显毒副作用, 方法简便, 具有较强的可操作性, 易于推广^[24-29]. 国外文献报道, 术中腹腔温热灌注化疗防治胃癌腹膜亚临床或临床微转移有一定效果^[30], 但该方法操作稍复杂, 有一定副作用, 不宜于临床上广泛应用. 此外, 胃癌根治术后早期腹腔化疗已成为目前防治进展期胃癌根治术后腹膜亚临床转移的常规手段, 腹腔化疗的药代动力学研究表明, 腹腔内用药具有作用时间长和维持药物高浓度的明显特点^[31]. 在延长药物腹腔作用时间及药效学等方面, 许多学者进行了探索, 如开发缓释剂型、增敏剂等. 近年来, 随着新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy)的兴起, 胃癌术前腹腔化疗亦成为胃癌腹膜亚临床转移防治的一种尝试, Yano *et al*最新研究报告认为, 以铂类药物为主的胃癌术前腹腔化疗是安全的, 对浆膜受浸的进展期胃癌腹膜亚临床转移有一定防治作用^[32-33], 但其疗效尚需多中心大样本研究验证, 而且严格掌握应用标准和适应证.

总之, 胃癌术后腹膜亚临床转移早诊和防治研究任重而道远, 目前亟待加强基础与临床研究相结合, 注重系统性和连续性, 加强地区间、国内外的多中心协作, 以期建立一整套规范的、实用的胃癌腹膜亚临床及临床转移诊治体系, 提高胃癌腹膜转移预测与防治水平.

4 参考文献

- 1 Maehara Y, Hasuda S, Koga T, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Postoperative outcome and sites of recurrence in patients following curative resection of gastric cancer. *Br J Surg* 2000;87:353-357
- 2 Kiyasu Y, Kaneshima S, Koga S. Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer. *Cancer Res* 1981;41:1236-1239

- 3 Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Taniguchi H, Shimotsu M, Okano S, Sakakura C, Tsujimoto H, Osaki K, Sasaki S. Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res* 1993;53:687-692
- 4 戴冬秋, 陈峻青, 徐蕾, 赵凤凯, 吴东瑛. 胃癌组织中 E-钙黏附素表达的定量检测及临床病理学评价. *中华医学杂志* 1997;77:668-671
- 5 戴冬秋, 陈峻青, 徐惠绵, 王舒宝, 赵凤凯, 王梅先. E-钙黏附素及 α -连接素的表达与胃癌生物学行为及淋巴结转移规律的关系. *中华肿瘤杂志* 2001;23:35-38
- 6 杨军, 戴冬秋. 胃癌原发灶与转移灶 E-钙黏附素 mRNA 表达水平的比较研究. *中华肿瘤杂志* 2005;27:25-28
- 7 Matsuoka T, Yashiro M, Nishimura S, Inoue T, Fujihara T, Sawada T, Kato Y, Seki S, Hirakawa-Ys Chung K. Increased expression of α 2 β 1-integrin in the peritoneal dissemination of human gastric carcinoma. *Int J Mol Med* 2000;5:21-25
- 8 Nishimura S, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M. CD44H plays an important role in peritoneal dissemination of scirrhous gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:1235-1244
- 9 戴冬秋, 陈峻青, 赵凤凯, 吴东瑛, 王梅先. 细胞黏附分子 CD44S、CD44V6 在胃癌组织中的表达及其意义. *中华肿瘤杂志* 1998;20:376-379
- 10 徐惠绵, 王剑峰, 王振宁. CEA mRNA、CEA 蛋白及细胞学检测胃癌腹腔液中游离癌细胞的初步评价. *中华肿瘤杂志* 2000;22:45-47
- 11 戴冬秋, 陈峻青, 任常山, 张文范. β -葡萄糖苷酶对胃癌诊断及分型意义的研究. *中华肿瘤杂志* 1992;14:316-317
- 12 Yonemura Y, Endou Y, Fujita H, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T. Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000;3:63-70
- 13 Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacin A, Gastells A, Volant A, Pera M. p53 and VEGF expression are independent predictors of recurrence and survival following curative resection gastric cancer. *Br J Cancer* 2004;90:206-215
- 14 Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:858-863
- 15 Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma- 2nd English Edition. *Gastric Cancer* 1998;1:10-24
- 16 陈峻青. 胃癌浆膜的分型及其意义. *中华医学杂志* 1986;66:736-738
- 17 刘庆华, 陈峻青. 胃癌浆膜类型、病理特点与腹腔内游离癌细胞关系的临床研究. *中华肿瘤杂志* 1988;10:430-433
- 18 Chen JQ, Liu QH. Identification and classification of serosal invasion, as it relates to cancer cells shedding and surgical treatment in gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 1994;10:107-110
- 19 Wang ZN, Xu HM, Jiang L, Zhou X, Lu C, Zhang X. Expression of survivin mRNA in peritoneal lavage fluid from patients with gastric carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1210-1217
- 20 Shimomura K, Sakakura C, Takemura M, Takagi T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Miyagawa K, Ohgaki M, Fujiyama J, Fujita Y, Nakanishi M, Hagiwara A, Shirane M, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. Combination of L-3-phosphoserine phosphatase and CEA using real-time RT-PCR improves accuracy in detection of peritoneal micrometastasis of gastric cancer. *Anticancer Res* 2004;24:1113-1120
- 21 Sakakura C, Takemura M, Hagiwara A, Shimomura K, Miyagawa K, Nakashima S, Yoshikawa T, Takagi T, Kin S, Nakase Y, Fujiyama J, Hayashizaki Y, Okazaki Y, Yamagishi H. Overexpression of dopa decarboxylase in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastases with real-time RT-PCR. *Br J Cancer* 2004;90:665-671
- 22 Mori K, Aoyagi K, Ueda T, Danjoh I, Tsubosa Y, Yanagihara K, Matsuno Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune K, Kaminishi M, Yoshida T, Terada M, Sasaki H. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:931-937
- 23 Miyagawa K, Sakakura C, Kin S, Nakase Y, Fukuda K, Hagiwara A, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. Over expression of Reg IV in peritoneal dissemination of gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004;31:1909-1911
- 24 陈峻青, 张忠彪, 宫伟, 董明, 杨广育, 李宏. 低渗液、温热对体外培养胃癌细胞系 MGC-803 杀伤效应的研究. *中华肿瘤杂志* 1991;13:97-99
- 25 董怡民, 陈峻青. 表面活性剂加强双蒸馏水对体外培养胃癌细胞系 MGC-803 杀伤效应的实验研究. *中华肿瘤杂志* 1994;16:318
- 26 Dai DQ, Chen JQ, Yuan Y, Dong M, Wang MX, Wang SB, Qi CL, Liang HW. The effect of hypo-osmolar solutions with hibitane on shed cancer cells in peritoneal cavity of patients with gastric cancer. *Chin J Cancer Res* 1995;7:148-152
- 27 徐惠绵, 陈峻青, 何三光. 温热低渗液、洗必泰、卡铂对胃癌腹膜移植瘤增殖活性的影响. *中华肿瘤杂志* 1997;19:270-273
- 28 陈峻青, 王舒宝, 徐惠绵, 刘庆华, 戴冬秋, 单吉贤, 梁洪伟. 胃癌根治切除并温热低渗液腹腔灌洗的疗效分析. *中华医学杂志* 2001;81:730-732
- 29 Chen JQ, Xu HM, Dai DQ, Liu QH, Dong YM, Wang SB. The effect of thermal double distilled water on gastric cancer cell line and its effect in peritoneal lavage during radical gastrectomy. *Chine German J Clin Oncol* 2002;1:185-189
- 30 Yonemura Y, Bandou E, Kinoshita K, Kawamura T, Takahashi S, Endou Y, Sasaki T. Effective therapy for peritoneal dissemination in gastric cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2003;12:635-648
- 31 王娟, 陈峻青. 卡铂腹腔化疗药代动力学实验研究. *中华肿瘤杂志* 1994;16:196-198
- 32 Yano M, Yasuda T, Fujiwara Y, Takiguchi S, Miyata H, Monden M. Preoperative intraperitoneal chemotherapy for patients with serosa-infiltrating gastric cancer. *J Surg Oncol* 2004;88:39-43
- 33 Yonemura Y, Kawamura T, Bando E, Takahashi S, Sawa T, Yoshimitsu Y, Obata T, Endo Y, Sasaki T, Sugarbaker PH. Treatment results of peritoneal dissemination from gastric cancer by neoadjuvant intraperitoneal-systemic chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004;31:1723-1726

编辑 张海宁

胰腺干细胞及其治疗糖尿病的研究进展

宋振顺, 安家泽

宋振顺, 安家泽, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科
陕西省西安市 710032

宋振顺, 男, 1961-1-30 生, 上海市人, 汉族, 1984 年第四军医大学本科毕业, 教授, 主要从事肝胆外科疑难疾病的诊治及肝移植、胰腺干细胞的研究。

通讯作者: 宋振顺, 710032, 陕西省西安市长乐西路 15 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科, zhenshunsong@yahoo.com.cn
电话: 029-83373564

收稿日期: 2005-03-12 接受日期: 2005-03-23

摘要

胰岛素产生细胞的缺陷或缺乏导致的 I 型糖尿病是影响人类健康的重要疾病之一。最近细胞移植和组织工程的研究进展, 使得糖尿病的细胞替代治疗成为可能, 供体的缺乏和移植排斥反应制约了胰岛移植的广泛应用, 胰腺干细胞将成为胰岛素产生细胞的潜在来源, 随着干细胞领域研究的深入, 胰腺干细胞分离及诱导分化技术的进步将有助于解决这一问题。

关键词: 干细胞; 糖尿病

宋振顺, 安家泽. 胰腺干细胞及其治疗糖尿病的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1052-1054
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1052.asp>

0 引言

近年来糖尿病患病率不断增加, 我国人口患病率与发达国家的 5% 相近, 已经成为患者和社会的巨大负担, 人们在不断寻找新的治疗方法。胰岛移植治疗糖尿病已取得了突破性进展, 然而这种新方法一般需要至少从 2-3 人的供体胰腺中分离得到的胰岛用于 1 例糖尿病患者的胰岛移植, 供体的缺乏和移植排斥反应制约了胰岛移植的广泛应用^[1]。为了使这种治疗用于广大糖尿病患者, 必须寻找胰岛素产生细胞的新来源。由于干细胞具有无限自我更新以及可进行高度分化的能力, 人们首先考虑到的方法是开发干细胞资源。随着干细胞领域研究的深入, 胰腺干细胞移植成为目前糖尿病治疗研究的热点之一。

1 胰腺干细胞来源

1.1 胚胎干细胞来源的胰腺干细胞 胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 具有全能性或多能性, 在适当条件下可被诱导分化为多种细胞或组织。Lumelsky *et al*^[2] 成功诱导胚胎干细胞分化出了胰岛细胞, 将培养出的胰岛移植到链脲霉素诱导的糖尿病小鼠皮

下, 发现其呈现正常胰岛的形态, 能够血管化, 且能够维持动物体重, 显著延长糖尿病小鼠的生存时间。Assady *et al*^[3] 报道在体外培养和诱导人胚胎干细胞 (hES-H9) 分化为具有 β 细胞特征可合成、分泌胰岛素的细胞, 并且表达葡萄糖转运体 2 (GLUT2) 和葡萄糖激酶 (GK)。

1.2 成体干细胞来源的胰腺干细胞

1.2.1 来源于胰腺导管上皮细胞的胰腺干细胞 Bonner-Weir *et al*^[4] 在体外分离出人胰腺导管细胞, 经培养后出现有组织结构的胰岛样细胞团, 即 CHIBs (culture human islet buds)。在 CHIBs 中有细胞角蛋白 19 (cytokeratin-19, CK-19) 阳性的导管细胞和胰岛素阳性的胰岛细胞。CHIBs 能分泌低浓度胰岛素并对葡萄糖刺激产生反应。我们也使用人胰腺组织在体外培养转分化出较多具有内分泌功能的胰岛, 也证明了成人胰腺的导管上皮具有干细胞潜能。

1.2.2 其他细胞转分化得到胰岛素分泌细胞 转分化 (transdifferentiation) 是指一种已分化的组织细胞分化为另一种组织细胞的不可逆过程, 包括了细胞形态、功能及表面标记物变化。Ferber *et al*^[5] 将含有 pdx-1 基因和巨细胞病毒启动子的重组腺病毒注入鼠尾静脉后, 检测到 pdx-1 基因主要在肝脏表达, 他能诱导内源性鼠胰岛素 I 和 II 的表达。注射了上述重组腺病毒的糖尿病小鼠的血糖从 6 g/L 缓慢降到 2 g/L, 这表明一部分肝细胞在外源基因的作用下可能发生转分化而表达胰岛素。Suzuki *et al*^[6] 也报告成功从肝脏干细胞诱导分化产生出胰腺 β 细胞。

2 胰腺干细胞分子标志

2.1 胰十二指肠同源异型盒基因 (pdx-1) 胰腺干细胞发育过程中表达的第 1 个分子标记是 1 个同源区蛋白, 即 PDX-1。pdx-1 对于出现在肠内胚层背侧及腹侧的胰腺萌芽的生长分化起重要作用, pdx-1 的纯合子缺失突变会导致胰腺无法形成^[7]。pdx-1 阳性胚胎胰腺干细胞向内分泌细胞分化是多步骤的, pdx-1 阳性导管样细胞也可产生外分泌腺泡细胞。

2.2 细胞角质蛋白 19 (cytokeratin-19, CK-19) Gmyr *et al*^[8] 发现成人 CK-19 阳性细胞能在体外再表达胰岛素促进因子 1 (insulin promoter factor 1) 进一

步表明人胰腺多能前体细胞的存在, 也表明CK-19可能为胰腺前体细胞的分子标志之一。

2.3 细胞角质蛋白 20(cytokeratin-20, CK-20) 胰腺起源于妊娠第10 d的原始前肠, 能定向分化成内外分泌细胞的原分化上皮细胞也于此时出现. 这些原分化上皮细胞表达1种细胞角质蛋白20, 是成熟导管细胞的1个特异标志. 胰腺内分泌细胞最初形成有2种机制: (1) 在胚胎胰腺发育初期, 形成大的CK-20阳性导管细胞集落, 位于该集落中心的细胞逐渐分化成激素分泌细胞, 即所谓的胰岛形成单位. 在这一过程中, CK-20的表达随着原分化细胞的分化而逐渐减少, 最终形成CK-20阴性的胰岛细胞. (2) 内分泌细胞最初形成于导管内衬中CK-20阳性细胞, 然后以出芽的形式从导管内衬脱离出来进一步分化成CK-20阴性胰岛细胞. 无论哪一种机制, CK-20都可作为胰腺干细胞或者始祖细胞的一个分子标志^[9].

2.4 巢蛋白(nestin) 巢蛋白是一高分子质量中间丝蛋白, 在分化细胞中巢蛋白表达于纤维母细胞, 而未见表达于上皮细胞, 但在未分化始祖上皮细胞中却可见其表达. Peters *et al*^[10]通过将表达有巢蛋白的胰腺导管未分化上皮样细胞诱导分化成胰岛细胞的1个亚群, 证明巢蛋白是胰腺干细胞的1个分子标记物, 他可能起着促进胰腺内分泌干细胞分化的作用.

2.5 神经元素3(ngn3) Jensen *et al*^[11]认为属于bHLH转录因子家族的Ngn3在胚胎最早期呈点状分布于背侧胰腺萌芽, 即内分泌细胞起始发育的部位. Ngn3是在胰腺发育过程中短暂表达的bHLH家族蛋白, 他是胰腺内分泌细胞系的定向因子, 且在成熟胰岛中不存在. 用PDX-1启动子促进转基因小鼠中早期胰腺前体细胞中Ngn3表达, 会导致内分泌细胞数增加, 外分泌细胞数减少.

2.6 其他的分子标志 Schmied *et al*^[12]通过将胰岛细胞长期培养并退化为未分化导管样上皮细胞, 发现波形蛋白限制性表达于这些未分化的具有向胰腺内外分泌细胞分化潜能的干细胞中, 从而认为波形蛋白也可作为胰腺干细胞的1个标志. 近来, 有学者研究发现kit基因在部分胰腺导管上皮细胞中呈高表达, 提示其可能是 β 细胞亚群的标志物^[10].

3 胰腺干细胞的分离、培养

3.1 胰腺干细胞的分离 胰腺导管上皮是具有干细胞潜能的一类细胞, 其在胰腺中所占比例甚少, 约占1%. 目前成人、动物胰腺导管上皮细胞的分离多采用胶原酶消化法^[13]. 消化后胰岛已从外分泌组织中释放出来, 但仍与外分泌组织混悬. 由于内、外分泌组织的密度不同, 可用密度梯度离心法将他们纯化. 如消化

的胰腺组织较多, 可用Euro-Ficoll或Lymphaprep或Ficoll液在COBE 2991细胞分离机中进行连续密度梯度离心, 亦可对少量组织采用非连续密度梯度离心纯化, 而外分泌组织则需进一步处理以便达到获取导管上皮细胞的目的.

另一种获取导管上皮细胞的方法是剪取胰腺的大导管, 然后再将大导管切成小块后以胶原酶消化, 在显微镜下将消化后的导管上皮从多种细胞的混悬液中挑出, 此法仅适用于需少量细胞的研究工作. 此外, 尚有用机械的方法将导管上皮从导管上刮下后收集, 此法收获量小, 已较少应用.

3.2 胰腺干细胞的培养 消化后的胰腺细胞纯化后, 胰岛细胞即被从混悬液中分出, 而外分泌细胞中则绝大多数(>99%)为腺泡细胞, 少量为导管上皮细胞, 根据这两种细胞的不同生物学特性, 即导管上皮细胞在6-12 h即可贴壁生长而腺泡细胞不具备此特性, 在培养的前期置换培养液时, 几乎可将所有的腺泡细胞在换液时丢弃, 仅留有少量的贴壁细胞即导管上皮细胞生长^[4]. 由于干细胞可在无血清培养液中生长和增殖而其他细胞(除成纤维细胞外)不易生长, 故在培养3-7 d后即换为不含血清的DMEM/F12培养液, 其中加入一定量的胰岛素、转铁蛋白和硒、青霉素、链霉素、牛血清白蛋白、尼克酰胺和角朊细胞生长因子(KGF)等. 一般经培养5-7 d后, 细胞集落增大, 互相开始连接成片. 在此基础上可形成一单层细胞, 几乎覆盖培养瓶底, 此时亦开始出现具有三维结构的细胞团, 在相差显微镜下呈山嵴或山峰样隆起, 这种三维细胞团结构随培养时间的延长逐渐增多增大, 当直径达到100 μm 以上时, 轻摇培养瓶则可使胰岛细胞团悬于培养液中, 双硫腺染色阳性. Bonner-Weir报告成人全胰腺的干细胞经过5-7 wk培养后, 可平均收获32 000新生的胰岛细胞团. 而我们改良的方法经27 d培养后平均每克胰腺组织可收获760个胰岛^[13].

在胰腺干细胞培养过程中, 不同的外部条件可以促进干细胞的增殖与分化, 他们包括生长激素, 如胰岛素样生长因子(IGF); 其他激素如胃泌素、胰高血糖素样多肽(GLP-1)等; 生长因子和细胞因子如转化生长因子(TGF- α 、表皮生长因子(EGF)、 β 细胞素(betacellulin)、白介素1 β (IL-1 β)、肝细胞生长因子(HGF)、角朊细胞生长因子(KGF)等; 营养成分如葡萄糖; 细胞外基质如上皮细胞黏附分子(Ep-CAM), 胶原1和胶原4等; 其他物质如尼克酰胺、丁酸钠等也有促进干细胞增殖和分化的作用^[14].

目前仍未找到培养干细胞的最佳条件. 成体胰腺干细胞在体外培养后所获的胰岛因数量及其胰岛素含量尚不足以用于临床试验. 部分动物实验表明, 小鼠

胰腺干细胞在体外培养后获得的胰岛植入同种糖尿病小鼠体内,可纠正糖尿病状态,基本恢复正常的糖代谢.但其实验所用动物数量少,有待进一步研究.

4 胰腺干细胞临床应用前景

近年来,许多研究组进行了胰腺干细胞移植治疗糖尿病的相关研究.体外培养的、源于干细胞的胰岛可能在不远的将来替代同种供体的胰岛,用于治疗糖尿病. Ramiya *et al*^[15]用胶原酶消化成年非肥胖糖尿病模型小鼠(NOD鼠)的胰腺导管组织,经一系列培养后可分化形成“生胰岛细胞”(islet producing cells, IPCs),IPCs可进一步分化成有组织结构的胰岛细胞团,包括 α 、 β 、 δ 细胞,可表达一系列胰岛细胞标志,分泌胰岛素并与葡萄糖剂量相关.他们将这些细胞移植入糖尿病小鼠的肾被膜下,经过55 d的观察发现,接受细胞移植的糖尿病小鼠血糖控制良好,而对照小鼠死于糖尿病. Garcia *et al*报道将转基因高度表达HGF的 β 细胞移植给糖尿病小鼠,可以明显改善胰岛功能和胰岛移植物的产量^[16]. Cornelius *et al*从成年小鼠胰腺分离出多能干细胞,移植给NOD糖尿病小鼠后,在停用胰岛素的情况下血糖正常可达到50 d之久^[17],表明用干细胞治疗糖尿病有较好的前景.

何时能将同种供者的干细胞起源的胰岛用于治疗糖尿病?应当说,目前已具备了一定的条件.利用自体胰岛不论在伦理上及免疫反应上都明显优于同种供者或异种供者.因而,如果能将糖尿病患者的胰腺干细胞以细针穿刺法从胰腺中取出,再在体外培养成胰岛后移植给该患者,将可造福大量糖尿病患者.真正地将此技术用于临床治疗糖尿病,仍要克服不少障碍,例如对于来源于干细胞的胰岛素分泌细胞分泌胰岛素的调控机制需要进一步研究^[18],此外,为了扩大胰岛素分泌细胞的来源,如何将骨髓基质干细胞、肝干细胞转分化为胰岛细胞也是将来重要的研究课题^[19].总之,随着干细胞研究的深入,以干细胞为基础的糖尿病治疗将会给人们带来新的希望.

5 参考文献

- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343: 230-238
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R.

- Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-1394
- Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-1697
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97: 7999-8004
- Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seijffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 2000;6:568-572
- Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002;156:173-184
- McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 2001;44:1203-1214
- Gmyr V, Kerr-Conte J, Belaich S, Vandewalle B, Leteurtre E, Vantyghem MC, Lecomte-Houcke M, Proye C, Lefebvre J, Pattou F. Adult human cytotokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 in vitro: further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. *Diabetes* 2000;49:1671-1680
- Wang R, Li J, Yashpal N. Phenotypic analysis of c-Kit expression in epithelial monolayers derived from postnatal rat pancreatic islets. *J Endocrinol* 2004;182:113-122
- Peters K, Panienka R, Li J, Kloppel G, Wang R. Expression of stem cell markers and transcription factors during the remodeling of the rat pancreas after duct ligation. *Virchows Arch* 2005;446:56-63
- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 2000;49:163-176
- Schmied BM, Ulrich A, Matsuzaki H, Ding X, Ricordi C, Weide L, Moyer MP, Batra SK, Adrian TE, Pour PM. Transdifferentiation of human islet cells in a long-term culture. *Pancreas* 2001;23:157-171
- 宋振顺, 顾克菊. 成人胰腺干细胞转分化为胰岛的研究. *中华外科杂志* 2002;40:807-810
- Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 2001;68:205-219
- Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000;6:278-282
- Garcia-Ocana A, Vasavada RC, Cebrian A, Reddy V, Takane KK, Lopez-Talavera JC, Stewart AF. Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. *Diabetes* 2001;50:2752-2762
- Cornelius JG, Tchernev V, Kao KJ, Peck AB. In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm Metab Res* 1997;29:271-277
- Lechner A. Stem cells and regenerative medicine for the treatment of type 1 diabetes: the challenges lying ahead. *Pediatr Diabetes* 2004;5:88-93
- Blyszczuk P, Wobus AM. Stem cells and pancreatic differentiation in vitro. *J Biotechnol* 2004;113:3-13

健脾法为基础的中医药干预对胃癌预后的影响

赵爱光, 蔡泳, 杨金坤, 郑坚, 沈克平

赵爱光, 杨金坤, 郑坚, 沈克平, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科
上海市 200032
蔡泳, 第二医科大学公共卫生学院预防医学教研室 上海市 200025
赵爱光, 女, 1968-04-28 生, 上海人, 汉族. 2001 年上海中医药大学博士,
副主任医师, 主要从事肿瘤临床和中医药防治消化道肿瘤的研究工作.
上海市科委青年科技启明星计划资助项目, No. 02QB14043
上海市教委研究基金资助项目, No. 01C06
通讯作者: 赵爱光, 200032, 上海市徐汇区宛平南路 725 号, 上海中医药大学
附属龙华医院肿瘤一科. Aiguang@hotmail.com
电话: 021-64385700 传真: 021-64398310
收稿日期: 2005-01-21 接受日期: 2005-02-16

Effect of Chinese *Jianpi* herbs on prognosis of gastric cancer

Ai-Guang Zhao, Yong Cai, Jin-Kun Yang, Jian Zheng,
Ke-Ping Shen

Ai-Guang Zhao, Jin-Kun Yang, Jian Zheng, Ke-Ping Shen, Department
of Oncology Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chi-
nese Medicine, Shanghai 200032, China
Yong Cai, School of Public Health, the Second Medical University of
Shanghai, Shanghai 200025, China
Supported by Shanghai Science and Technique Ministerial Foundation,
No. 02QB14043; and Shanghai High-Education Bureau Foundation, No.
01C06
Correspondence to: Dr. Ai-Guang Zhao, Department of Oncology,
Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,
725 Wanping South Road, Shanghai 200032, China. aiguang@hotmail.com
Received: 2005-01-21 Accepted: 2005-02-16

Abstract

AIM: To evaluate the effect of Chinese *jianpi* herbal recipe
Wei Chang An (WCA) on the prognosis of gastric cancer.

METHODS: Univariate and Cox regressions were applied
to analyze the influence of the clinical, pathological and
therapeutical variables on the prognosis of 166 gastric can-
cer patients.

RESULTS: In univariate analysis, the significant prognos-
tic factors were the site of the tumor, the TNM stage,
surgery, chemotherapy and WCA. Multivariate analysis
suggested that the TNM stage, radical resection, and WCA
were independent prognostic factors. Patients who received
WCA demonstrated better prognosis independent of other
prognostic factors in multivariate analysis. The odds ra-
tios [Exp(B)] of stage II, III and IV were 0.091 (95% CI:
0.028-0.294), 0.038 (95% CI: 0.008-0.175) and 0.303 (95%
CI: 0.152-0.603), respectively. Exp(B) of WCA was 3.575
(95% CI: 1.768-7.228). The site of the tumor and chemo-

therapy had no influence on survival in multivariate analy-
sis ($P>0.05$).

CONCLUSION: Cox regression analysis is a proper sta-
tistical method for the evaluation of the effectiveness of
Traditional Chinese Medicine therapy on gastric cancer.
The Chinese *jianpi* herbal recipe WCA has important value
for improving the prognosis of gastric cancer.

Key Words: *Jianpi* herbal recipe; Gastric cancer; Prognosis

Zhao AG, Cai Y, Yang JK, Zheng J, Shen KP. Effect of Chinese *Jianpi*
herbs on prognosis of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*
2005;13(9):1055-1058

摘要

目的: 探讨比例风险模型(Cox 模型)在中医药治疗胃癌
疗效评价中的运用, 研究健脾法为基础的中医药治疗
对胃癌预后的影响作用。

方法: 采用单因素及 Cox 多因素回归分析了 166 例胃癌
患者临床病理因素及治疗措施对预后的影响。

结果: 单因素分析表明, 胃癌预后与肿瘤原发部位、
临床病理分期、手术方式、化疗及健脾法为基础的中药
胃肠安治疗相关. Cox 多因素回归分析表明: 临床病理分
期、手术方式及中药胃肠安治疗是影响胃癌预后的独
立因素. 临床病理分期中以 I 期为参照, II 期、III 期
及 IV 期的相对危险度分别为 0.091、0.038 及 0.303; 手
术方式中以根治术为参照, 姑息切除术改道及探查术
的相对危险度分别为 0.054、0.128; 中药胃肠安的相对
危险度为 3.575. 而肿瘤原发部位、化疗则未显示为独
立预后因素($P>0.05$).

结论: 比例风险模型在中医药治疗胃癌的疗效评价中是
适合和有价值的方法; 健脾法为基础的中医药治疗是改
善胃癌预后的有效干预措施。

关键词: 健脾法; 胃癌; 预后

赵爱光, 蔡泳, 杨金坤, 郑坚, 沈克平. 健脾法为基础的中医药干预对胃癌预
后的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1055-1058
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1055.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率仍居前列^[1-3].

比例风险模型是目前肿瘤疗效评价和预后因素分析中最重要和运用最广泛的多变量分析方法^[4-5],但在中医药治疗胃癌的疗效评价中尚未见将此模型引入的文献报道,我们采用此模型评价健脾法为基础的中医药对胃癌预后的影响,探讨中医药治疗在胃癌综合治疗中的作用如下。

1 材料和方法

1.1 材料 1987-1/1999-11住院有完整TNM分期信息,能够按照1997年国际抗癌联盟UICC的胃癌TNM分期法^[8]重新进行临床病理分期的胃癌患者166例。排除转移性胃癌患者。手术有根治术,姑息切除术,改道或探查术。化疗需完成3个周期以上。

1.2 方法 健脾法为基础的中药复方胃肠安方加减治疗,持续12 wk以上。胃肠安基本处方由炒白术12 g,茯苓30 g,白扁豆30 g,红藤30 g,生牡蛎30 g,夏枯草9 g组成,采用水煎剂,每日1剂,分2-4次服。住院病例1 wk,门诊随访病例2 wk根据临床辨证结果,在胃肠安基本处方基础上相应加减某些单味药一次。门诊随访、定期信访及电话随访,直至观察截止日期2004-11-30或出现最终结局。数据采用统一表格收集病例的一般情况、诊治信息形成一览表并录入计算机。对有关信息编码赋值。连续变量以四分分数为标准划分为等级变量进行分组(年龄除外);多因素分析时将分类变量量值为二值变量(表1)。生存时间计算:手术患者以手术日、未手术者以胃镜病理诊断之日至死亡或最后接触日。

表1 胃癌病例变量赋值表

变量	赋值
性别(SEX)	男: 1; 女: 2
原发部位(LOCUS)	贲门胃底部: 1; 胃体胃窦部: 2; 皮革胃: 3
病理类型(PATHOLO)	腺癌: 1; 低分化腺癌: 2; 黏液腺癌、印戒细胞癌及未分化癌: 3
临床病理分期(STAGE)	I期: 1; II期: 2; III期: 3; IV期: 4
手术(SURG)	根治术: 1; 姑息切除术: 2; 改道及探查术: 3; 未手术: 4
化疗(CHEM)	未行或不足3个周期者: 0; 完成3个周期及以上: 1
中药胃肠安(WCA)	未用: 0; 胃肠安: 1
胃肠安介入时间(BEGIN)	诊断/术后3 mo内: 1; 诊断/术后3-6 mo: 2; 诊断/术后6-12 mo: 3; 诊断/术后12 mo后: 4

统计学处理 单因素分析:应用Kaplan-meier法估计生存率,各因素组间生存分布差异采用Log-rank

进行显著性检验。多变量分析:应用Cox模型进行预后因素分析。以上处理均以SPSS10.0软件在微机上完成。

2 结果

共得到有效病例166例。全部病例均经病理学证实。全部病例中完全数据159例,占95.8%,截尾数据66例,占39.8%,其中失访28例,失访率16.7%。年龄24-80岁;男92例,女74例(表2)。1, 3, 5, 7, 10 a生存率分别为64.03%, 46.42%, 43.29%, 41.03%和39.48%,中位数生存期为42.95 mo。

表2 胃癌病例的基本资料

临床病理分期(STAGE)	I期: 22例 II期: 20例 III期: 57例 IV期: 67例
手术(SURG)	根治术: 120例 姑息切除术: 26例 改道及探查术: 13例 未手术: 8例
化疗(CHEM)	未行或不足3个周期者: 57例 完成3个周期及以上: 109例
中药胃肠安(WCA)	未服: 37例 服用者: 129例

2.1 单因素分析 肿瘤部位、临床病理分期、手术方式、化疗及中药胃肠安治疗影响胃癌的预后,而性别、年龄、病理类型则不是影响生存期的因素。中药胃肠安治疗组的1, 3, 5 a生存率分别为78.03%, 57.13%, 54.06%,中位生存期102.36 mo,而未用中药的对照组的1, 3, 5 a生存率分别为14.23%, 8.54%, 5.69%。中位生存期9.52 mo。

2.2 多因素分析 影响胃癌生存独立的预后因素分别是临床病理分期($P<0.01$)、手术方式($P<0.01$)和中药胃肠安治疗($P<0.01$)。临床病理分期中以I期为参照,II期、III期及IV期的相对危险度分别为0.091, 0.038及0.303;手术方式中以根治术为参照,姑息切除术改道及探查术的相对危险度分别为0.054, 0.128;中药胃肠安的相对危险度为3.575(表3)。而肿瘤原发部位、化疗虽然在单因素分析中与胃癌生存有关,但在最终的多变量模型中却未能显示其为有意义的预后因素($P>0.05$)。

3 讨论

在我国中药特别是复方在胃癌的治疗中发挥了一定的作用^[6-9]。采用胃癌总生存期的改善这一疗效评价金标准,中医药的疗效究竟如何?在手术、化疗等相结合

表3 胃癌比例风险模型分析结果

因子	回归系数 B	标准误 sx	统计量 Wald 值	P 值	相对危险度 Exp(B)	95%CI for Exp (B)	
						lower	upper
I 期			29.884	0.000			
II 期	-2.392	0.597	16.070	0.000	0.091	0.028	0.294
III 期	-3.282	0.786	17.449	0.000	0.038	0.008	0.175
IV 期	-1.195	0.352	11.541	0.001	0.303	0.152	0.603
根治术			12.720	0.005			
姑息切除术	-2.910	0.966	9.073	0.003	0.054	0.008	0.362
改道及探查术	-2.056	0.949	4.697	0.030	0.128	0.020	0.821
中药胃肠安	1.274	0.359	12.574	0.000	3.575	1.768	7.228

的胃癌综合治疗方案中中医药是否具有独立的治疗作用?是当前中医药防治胃癌临床研究领域内值得深入探讨的问题.我们采用比例风险模型,将健脾为基础的中药复方胃肠安治疗纳入胃癌的预后因素的综合分析中,评价其在胃癌综合治疗中的作用和意义.结果显示,临床病理分期(pTNM分期)仍是影响胃癌预后的重要指标,与文献[10-11, 22-23]报道一致.pTNM分期包含了肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移,可综合反应肿瘤的生物学行为和进展情况.特别是近年来的研究认为在淋巴结转移中,不仅分布的部位且淋巴结阳性的数目与胃癌预后相关^[24].在治疗性因素中,根治性手术无疑是最重要的保护性因子^[12],我们的结果也证实了这一点.研究结果同时表明,健脾为基础的中药复方胃肠安治疗是影响胃癌预后的保护性因子,提示中药胃肠安治疗在胃癌的综合治疗中具有独立的治疗作用.

长期以来,研究者主张“脾”为胃癌的“病本”,病因病机与“虚”、“痰”、“瘀”、“毒”有关,其中尤以脾胃虚弱为胃癌发生与发展的一个基本因素,形成了以健脾理气为基础,结合清热解毒,软坚化痰的中药复方胃肠安作为胃癌治疗的基础用方.既往研究已经显示胃肠安复方治疗进展期胃癌的生存率较MMF方案化疗为高,胃肠安组生存质量优于化疗组^[6].以上临床研究的结果在ENNG诱发皮革狗胃癌的模拟临床治疗对比研究、人胃癌细胞株SGC-7901裸小鼠皮下移植瘤和裸小鼠胃原位移植瘤等多种动物模型中证实^[13-14].机理研究发现上述胃肠安复方有抑制胃癌细胞增殖、诱导凋亡并影响某些凋亡调节相关基因表达的作用^[15].本结果从多变量分析角度再次证实中药复方胃肠安在胃癌综合治疗中具有明确的、独立的治疗作用,且与以往的随机分层配对的研究结果^[6]一致,表明比例风险模型在中医药治疗胃癌的疗效评价中是适合和有价值的方法.多变量模型是一种在统计学上排除混杂因素的极好工具,无论临床设计是否

随机,具有校正可能的混杂以识别与预后有关的因素;对各组基线间存在的差别进行校正以及疾病预后的估计、疾病诊断的确定等很多用途.采用多变量分析可以近似地达到组间的均衡性而使大量的、非随机条件下的临床资料得到合理的分析、利用.因此在肿瘤疗效评价和预后因素分析中受到广泛重视和运用.我们以比例风险模型评价中医药治疗对胃癌生存的影响,为在中医药治疗肿瘤的疗效评价中引入多变量分析的相关统计方法作了方法学上的初步探索.

本次研究中原发肿瘤年龄、肿瘤部位、肿瘤组织类型均未在Cox模型中显示为有意义的预后因素.与有些文献[16]的结果一致.也可能与样本例数较少有关,仍需进一步研究.而化疗因素最终未进入模型的原因可能与以下因素有关:样本例数较少;采用的化疗药物和方案较传统,一些新的药物和方案尚未进入观察病例,因此未得到化疗在延长胃癌生存期方面的疗效结果.另一方面,对于晚期病例,不少研究表明:化疗的有效率并不与长生存率并存^[17-19].而术后病例,辅助化疗是否可降低胃癌复发和转移率,延长生存期,报道也不一^[20-21].因此,尽管近年来胃癌化疗的有效率不断提高,其对远期生存的影响仍需作深入的研究.

4 参考文献

1 Otsuji E, Yamaguchi T, Sawai K, Hagiwara A, Taniguchi H, Takahashi T. Recent advances in surgical treatment have improved the survival of patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1998;82:1233-1237

2 Nakajima T, Nashimoto A, Kitamura M, Kito T, Iwanaga T, Okabayashi K, Goto M. Adjuvant mitomycin and fluorouracil followed by oral uracil plus tegafur in serosa-negative gastric cancer: a randomised trial. *Gastric Cancer Surgical Study Group. Lancet* 1999;354:273-277

3 Cirera L, Balil A, Batiste-Alentorn E, Tusquets I, Cardona T, Arcusa A, Jolis L, Saigi E, Guasch I, Badia A, Boleda M. Randomized clinical trial of adjuvant mitomycin plus tegafur in patients with resected stage III gastric cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:3810-3815

4 Borie F, Rigau V, Fingerhut A, Millat B; French Association for Surgical Research. Prognostic factors for early gastric cancer in France: Cox regression analysis of 332 cases. *World J Surg*

- 2004;28:686-691
- 5 Zhang CW, Zou SC, Shi D, Zhao DJ. Clinical significance of preoperative regional intra-arterial infusion chemotherapy for advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:3070-3072
- 6 邱佳信, 贾筠生, 杨金坤, 郑坚, 郑嘉昌, 唐莱娣, 王楠, 沈克平, 庞惠芳, 计高荣, 钦丹萍, 李裕民, 周学义, 骆学新, 刘铭升, 邱志芳, 曹林华, 董茂芝. 健脾法为主治疗晚期胃癌的探讨. *中医杂志* 1992;8:23-25
- 7 Yang JK, Zhen J, Shen KP. Clinical study on post-operative metastasis prevention of progressive stage of gastric cancer by weichang'an. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2003;23:580-582
- 8 Shimada K, Ajani JA. Adjuvant therapy for gastric carcinoma patients in the past 15 years: a review of western and oriental trials. *Cancer* 1999;86:1657-1668
- 9 王冠庭, 朱金水, 徐文玉, 王易, 周阿高. 扶正抗癌冲剂结合化疗治疗晚期胃癌的临床与实验研究. *华人消化杂志* 1998;6:214-218
- 10 Bando E, Yonemura Y, Taniguchi K, Fushida S, Fujimura T, Miwa K. Outcome of ratio of lymph node metastasis in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002;9:775-784
- 11 Bozzetti F, Bonfanti G, Morabito A, Bufalino R, Menotti V, Andreola S, Doci R, Gennari L. A multifactorial approach for the prognosis of patients with carcinoma of the stomach after curative resection. *Surg Gynecol Obstet* 1986;162:229-234
- 12 Allgayer H, Heiss MM, Schhildberg FW. Prognostic factors in gastric cancer. *Br J Surg* 1997;84:1651-1664
- 13 赵爱光, 杨金坤, 赵海磊. 健脾中药诱导人胃癌细胞裸小鼠移植瘤细胞凋亡的实验研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:737-740
- 14 赵爱光, 赵海磊, 杨金坤, 顾缨, 刘静, 唐莱娣. 人胃癌原位移植模型中宿主脾虚证的探讨. *中国中西医结合消化杂志* 2001;9:198-200
- 15 Zhao AG, Zhao HL, Yan JK, Tang LD. Effects of Chinese Jianpi herbs on cell apoptosis and related gene expression in human gastric cancer grafted onto nude mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:792-796
- 16 张成武, 邹寿椿, 裘华森, 赵大建, 施敦. 胃癌预后指标的多因素回归分析. *中华胃肠外科杂志* 2002;5:113-116
- 17 Vanhoefer U, Rougier P, Wilke H, Ducreux MP, Lacave AJ, Van Cutsem E, Planker M, Santos JG, Piedbois P, Paillet B, Bodenstein H, Schmoll HJ, Bleiberg H, Nordlinger B, Couvreur ML, Baron B, Wils JA. Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin versus etoposide, leucovorin, and fluorouracil versus infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: A trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Group. *J Clin Oncol* 2000;18:2648-2657
- 18 Ohtsu A, Shimada Y, Shirao K, Boku N, Hyodo I, Saito H, Yamamichi N, Miyata Y, Ikeda N, Yamamoto S, Fukuda H, Yoshida S; Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9205). Randomized phase III trial of fluorouracil alone versus fluorouracil plus cisplatin versus uracil and tegafur plus mitomycin in patients with unresectable, advanced gastric cancer: The Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9205). *J Clin Oncol* 2003;21:54-59
- 19 Kim NK, Park YS, Heo DS, Suh C, Kim SY, Park KC, Kang YK, Shin DB, Kim HT, Kim HJ. A phase III randomized study of 5-fluorouracil and cisplatin versus 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C versus 5-fluorouracil alone in the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer* 1993;71:3813-3818
- 20 Hermans J, Bonenkamp JJ, Boon MC, Bunt AM, Ohya S, Sasako M, Van de Velde CJ. Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: Meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 1993;11:1441-1447
- 21 Earle CC, Maroun JA. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients: revisiting a meta-analysis of randomised trials. *Eur J Cancer* 1999;35:1059-1064
- 22 Klein Kranenbarg E, Hermans J, van Krieken JH, van de Velde CJ. Evaluation of the 5th edition of the TNM classification for gastric cancer: improved prognostic value. *Br J Cancer* 2001;84:64-71
- 23 Kim JP, Kim YW, Yang HK, Noh DY. Significant prognostic factors by multivariate analysis of 3926 gastric cancer patients. *World J Surg* 1994;18:872-877
- 24 Weitz J, D'Angelica M, Gonen M, Klimstra D, Coit DG, Brennan MF, Karpeh MS. Interaction of splenectomy and perioperative blood transfusions on prognosis of patients with proximal gastric and gastroesophageal junction cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:4597-4603

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005年亚太消化系疾病周会议通知

本刊讯 由APDW2005组委会主办, 亚太胃肠病学学会 (APAGE)、亚太消化内镜学会 (APSDE)、亚太肝病研究会 (APASL) 和国际消化外科协会 (ISDS) 联合举办的 2005 年亚太消化系疾病周 (Asian Pacific Digestive Week 2005, 简称 APDW2005) 将于 2005-09-25/2005-09-28 在韩国汉城举行。

1 相关内容

会议主题为“亚洲胃肠疾病新发现”, 会议过程使用英语, 所有打印资料均以英文表达。摘要截稿日期为 2005-06-15, 前期注册日期定于 2005-06-30 终止。

2 联系方式

大会秘书长: Jin-Ho Kim, M.D., Professor of Unin. of Ulsan, #1510 Hyosung Olympic Count II, 175-12, Chamsil-dong, Songpa-gu, Seoul, 138-220. Korea. 电话: +82-2-412-0673; 传真: +82-2-412-0674. Email: jhkm@amc.seoul.kr

请登陆 APDW2005 网站 (www.APDW2005.org) 获取详细信息。

肿瘤相关未知功能基因MGC39325的克隆及生物信息学分析

李学农, 李亚玲, 刘国炳, 丁彦青

李学农, 李亚玲, 丁彦青, 南方医科大学病理学教研室
广东省广州市 510515

刘国炳, 南方医科大学南方医院妇产科 广东省广州市 510515

李学农, 1963-09-02 生, 男, 汉族, 安徽省望江县人, 2002年毕业于第一军医大学博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤病理学的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30170486

通讯作者: 李学农, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学病理学教研室。
leexue0@163.com

电话: 020-61647807

收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-03-03

Molecular cloning and bioinformatic analysis of a novel tumor-associated gene MGC39325

Xue-Nong Li, Ya-Ling Li, Guo-Bing Liu, Yan-Qing Ding

Xue-Nong Li, Ya-Ling Li, Yan-Qing Ding, Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Guo-Bing Liu, Department of Obstetrics and Gynecology, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30170486

Correspondence to: Dr. Xue-Nong Li, Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. leexue0@163.com

Received: 2005-01-29 Accepted: 2005-03-03

Abstract

AIM: To clone human MGC39325, a novel gene possibly involved in tumor progression identified in our laboratory by cDNA microarray analysis of colonic carcinoma and choriocarcinoma, and to construct its recombinant eukaryotic expression vector so as to explore its function and roles in neoplasms.

METHODS: Human MGC39325 full length ORF was amplified by RT-PCR from colonic carcinoma LoVo cells and inserted into the vector pGEM-T by TA cloning. Recombinant eukaryotic expression vector (pcDNA3.1-MGC) was then constructed by subcloning technique and confirmed by restriction enzyme digestion analysis and sequencing. Bioinformatic methods were used to analyze its possible structure and function.

RESULTS: MGC39325, with 1158bp, was amplified by RT-PCR from human LoVo cells. The eukaryotic expression vector corresponding to MGC39325 (pcDNA3.1-MGC) was successfully constructed, which was confirmed by RT-PCR and sequencing. Bioinformatic analyses indicated that this

gene was mapped on chromosome 8q12.1 with an open reading frame of 1 113 bp. It contained EGF-like domain signature 1 (3-14, 12-23), integrin beta chain cysteine-rich domain signature (183-196), iron-sulfur binding region signature (389-397, 1027-1038), Von Willebrand factor domain signature (105-157, 548-591), and C-terminal cysteine knot signature (744-782) in DNA sequence. It encoded a 370 aa protein as expected. The putative protein, with molecular weight 40 727.9, pI 9.45, and grand average of hydropathicity -0.668, included N-myristoylation site (19-24, 130-135), cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (38-41, 46-49, 204-207), casein kinase II phosphorylation site (49-52, 158-161), tyrosine kinase phosphorylation site (53-61), protein kinase C phosphorylation site (97-99, 140-142, 208-210), and N-glycosylation site (97-99). These structural characteristics suggested that it might play a role on cell growth, adhesion and cell signal transduction that may be related to tumor progression and metastasis.

CONCLUSION: Human MGC39325 gene has been successfully cloned, which will benefit further research on its function as well as its implications in cancer and other diseases.

Key Words: Gene cloning; Tumor-associated genes; Bioinformatics

Li XN, Li YL, Liu GB, Ding YQ. Molecular cloning and bioinformatic analysis of a novel tumor-associated gene MGC39325. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1059-1064

摘要

目的: 克隆与肿瘤恶性演进相关但未知功能的新基因MGC39325, 构建其真核表达载体, 并应用生物信息学初步探讨其功能。

方法: 应用RT-PCR技术从LoVo细胞中扩增MGC39325基因全长ORF, 选用pGEM-T载体进行TA克隆, 再将其亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1(+)的启动子和终止子之间, 通过PCR、限制性酶切分析及测序进行鉴定。应用生物信息学初步分析其染色体定位、蛋白序列、结构域及功能。

结果: 从LoVo细胞中扩增出1 158 bp的cDNA, 成功进行TA克隆并进一步亚克隆至pcDNA3.1(+)真核表达

载体, 测序证实为人MGC39325基因. 生物信息学分析显示此基因定位于8q12.1, 含有2个外显子(1 113 bp), DNA序列含有表皮样生长因子位点标记(3-14, 12-23)、整合素beta链半胱氨酸富集区点标记(183-196)、铁氧化还原蛋白铁硫结合区点标记(389-397, 1027-1038)、第VIII因子结构域位点标记(105-157, 548-591)、羧基端胱氨酸结位点标记(744-782)等, 编码由370个氨基酸组成蛋白质, M_r 40 727.9, pI值为9.45, 疏水性平均值为-0.668, 含3个低复杂性区域结构, 氨基酸序列含有豆蔻酰化位点(19-24, 130-135)、cAMP和cGMP依赖性蛋白激酶(38-41, 46-49, 204-207)、酪蛋白激酶(49-52, 158-161)、酪氨酸激酶(53-61)、蛋白激酶C磷酸化位点(97-99, 140-142, 208-210)、N-糖基化位点(97-99)等结构域, 提示这一新的蛋白质可能在细胞生长、黏附及细胞信号转导方面具有重要功能.

结论: 成功地克隆了人MGC39325基因全长ORF, 构建了其pcDNA3.1(+)-真核表达载体, 为进一步研究其功能及其肿瘤中的作用创造了条件.

关键词: 基因克隆; 肿瘤相关基因; 生物信息学

李学农, 李亚玲, 刘国炳, 丁彦青. 肿瘤相关未知功能基因MGC39325的克隆及生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1059-1064
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1059.asp>

0 引言

我们在研究大肠癌及绒毛膜癌基因表达谱过程中新发现一个可能与肿瘤恶性演进相关的ESTs序列U79298 cDNA^[1-2], 他在大肠癌及绒毛膜癌中均显著高表达, 而在相应正常大肠黏膜及正常胎盘绒毛中低表达, 通过NCBI Entrez搜索发现U79298 cDNA所代表的基因为未知功能基因MGC39325. 有关MGC39325基因的生物功能及其在肿瘤中的作用尚未见国内外文献报道(中国生物医学文献数据库、中国期刊网及Medline检索), 为探讨其生物学功能及其作用, 我们首次构建了其真核表达载体, 并进行生物信息学初步分析.

1 材料和方法

1.1 材料 Taq酶, AMV反转录酶, Oligo(dT), dNTP, 琼脂糖, pGEM-T vector System I(内含pGEM-T vector, T4 DNA ligation, 10X buffer, JM109 competent cells), PCR产物纯化试剂盒及质粒抽提试剂盒均为Promega产品, *Eco*RI, *Hind*III, DL2000 DNA ladder为Takara公司产品, pcDNA3.1(+), SNAP MiniPrep kit购自Invitrogen公司. RPMI 1640, Trizol购自Gibco公司. SDS, DEPC, G418, 溴化乙锭(EB, Ethidium Bromide)购自Sigma公司. 小牛血清购自杭州四季青公司; 氯仿, 异丙醇等均为国产分析纯.

1.2 方法 人大肠癌LoVo细胞系(本室细胞库保存)在含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养液于5% CO₂湿化孵箱常规培养, 收获细胞(1.0×10^7), 用Trizol试剂抽提总RNA, 并进行RT-PCR. RT反应以oligo dT为引物, 反应条件为: 70℃ 5 min, 42℃ 90 min, 94℃灭活AMV反转录酶6 min. PCR扩增反应条件为: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸90 s, 35个循环, 72℃延伸10 min. 根据GenBank人MGC39325基因全长ORF序列设计PCR引物, 上游引物: 5' ATAAGCTTAGAAGAGCATCCAACACG 3', 引入*Hind* III酶切位点及A突出端; 下游引物: 5' ATGAATTCTTTACACATGGGAGACC 3' 引入*Eco*R I酶切位点及A突出端^[3], 并由上海生工公司合成. PCR产物用15 g/L低熔点琼脂糖凝胶电泳鉴定及回收, PCR产物纯化试剂盒抽提及纯化, -20℃保存备用. 利用pGEM-T vector system I将纯化PCR产物进行连接反应(30 min及4℃过夜), 常规转化JM109感受态细菌, X-gal/LB平板(含氨苄青霉素和IPTG)筛选, 37℃培养过夜得到抗性白色菌落, 碱裂解法抽提质粒DNA, 并进行*Eco*R I、*Hind* III双酶切鉴定, 阳性克隆命名为pGEM-MGC.

1.2.1 pcDNA3.1(+)-真核表达载体的定向克隆 挑取上述白色菌落扩大培养, 碱裂解法提取质粒, 选择酶切鉴定阳性克隆, 并回收纯化目的MGC39325基因片段; 同时将pcDNA3.1(+)-真核表达载体进行*Eco*R I, *Hind* III双酶切反应, 回收纯化线性化pcDNA3.1(+)-载体, 以T4连接酶构建pcDNA3.1(+)-MGC重组载体. 按上述方法常规转化感受态细菌, X-gal/LB平板筛选, 提取质粒, 作*Eco*R I, *Hind* III双酶切鉴定, 并在ABI377自动测序仪上进行序列测定.

1.2.2 生物信息学分析 通过Internet查询美国国家生物信息中心(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) EST, Unigene和CGAP(cancer genome anatomy project)数据库, 核酸数据库为GenBank, 数据库搜索采用BLAST. MGC39325基因染色体定位依据Genecard (<http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.html>)和Ensembl (<http://www.ensembl.org/>)获得. 数字化组织分布表达分析在Genecard及Unigene服务器 (<http://genecards.weizmann.ac.il/>)上进行, 以待检基因的全长cDNA序列为“探针”, 采用BLAST程序对人类EST数据库进行匹配分析, 得到一致性大于95%, P 值小于 e^{-10} 的代表该基因的EST, 通过计算各类组织的cDNA文库中代表该基因的EST数量, 代表该基因在不同组织中的表达丰度^[4]. MGC39325基因的氨基酸序列由蛋白质专家分析系统(ExPASy, <http://au.expasy.org>)推算产生. 蛋白质二级结构模拟、结

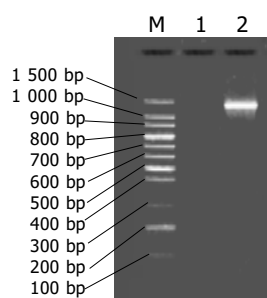


图1 MGC39325 RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析, M: 100 bp DNA ladder mark; 1: Negative control; 2: MGC39325.

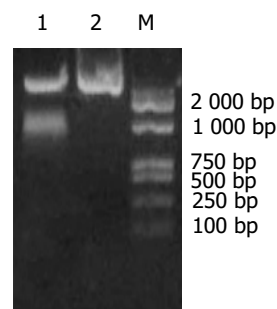


图2 重组质粒pGEM-MGC的酶切鉴定. 1: pGEM-MGC/digest; 2: pGEM-MGC; M: DL2000 ladder mark.

构域及氨基酸序列比对分析则在Prosite(<http://au.expasy.org/Prosite>)及EMBL-EBI 蛋白预测服务器(<http://www.ebi.ac.uk/services/>)上运算获得^[5], 蛋白质二级结构预测采用 APSSP 2 服务器(www.imtech.res.in/raghava/apssp2/)进行。

2 结果

2.1 MGC39325 基因扩增及克隆鉴定 LoVo 细胞总 RNA 变性琼脂糖凝胶电泳可见 28 s, 18 s 条带, 分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 值为 2.01. 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 可见 1 200 bp 左右的 1 条带(图 1). 利用 pGEM-T vector System I 将纯化 PCR 产物进行 TA 克隆(图 2). *EcoR* I, *Hind* III 双酶切得 2 条带, 1 200 bp 左右为 MGC3932 基因片断. 该质粒即为阳性克隆, 命名为 pGEM-MGC. 进一步地将 pcDNA3.1 和 pGEM-MGC 作 *EcoR* I, *Hind* III 双酶切, 回收目的片段, 构建了重组 pcDNA3.1(+) 真核表达载体 pcDNA3.1-MGC, 经酶切鉴定重组载体在 1 200 bp 左右见 1 条带, 证明 pcDNA3.1-MGC 构建成功(图 3). DNA 测序结果如下:

DNA 测序结果与 GenBank 进行比对分析示, 与 MGC39325 基因 cDNA 序列同源性为 99.35%, 含人 MGC39325 基因的全长 ORF.

2.2 MGC39325 基因生物信息学分析 通过 Ensembl 和 Genecard 数据库搜寻, MGC39325 基因定位于人染色体 8q12.1, 转录本(NM_147189)为 2 971 bp, 包含 2 个外显子(图 4). DNA 序列含有表皮样生长因子位点标记(3-14, 12-23)、整合素 beta 链半胱氨酸富集区位点标记(183-196)、铁氧化还原蛋白铁硫结合区位点标记(389-397, 1027-1038)、第 VIII 因子结构域位点标记(105-157, 548-591)、羧基端胱氨酸结位点标记(744-782)等标记, Unigene 数字化组织分布表达分析发现 MGC39325 基因主要表达于乳腺、脾、肝、骨骼肌、肾、肺、前列腺等(图 5). EMBL-EBI 蛋白质预测显示, MGC39325 基因编码由 370 个氨基酸组成蛋白质, 分子质量为 40727.9 u, pI 值为 9.45, MGC39325 蛋白分子式为 $C_{1768}H_{2850}N_{532}O_{553}S_{10}$, 不稳定指数为 64.12. 应用 Hphob./Kyte & Doolittle 算法预测蛋白质的疏水性(图 6), 其疏水性平均值为 -0.668

```

1 ctcccagget gcacccgccg cccctggcgc ttcattgaaca tgtgtccatt caggccttgc
61 ggagcgcccc agaagagcat ccaacacggc tgccggggaa agaacgcccc ccatgccccac
121 ggagacccta cagacaggta gcatggtgaa gccggtcagc ccccggggca ccttcacctc
181 tgtgtgtccc ctgcgcattc tgaacaagg gccagactac ttccgcagge agaccgagcc
241 caaccccaag aggtcagcg cegtggagag gctggaggcc gacaaggcca agtacgtcaa
301 gagccaggag gtgatcaacg ccaagcagga gcccggtgaag cccgcctgac tgccaagcc
361 cccggtgtgc ccggtgcca agcgcgcact gggcagcccc acgctcaaag ttttcggcaa
421 ccacgcccaag accgagagcg gcgtgcagag ggagaacctg aagctggaga tcctgaagaa
481 catcatcaat agctccgagg gctctagctc gggctcgggg cacaagcaca gctcccgcga
541 ctggccgccc caccggtcgg aagccactga cctgcaacct cactccttcg cggagtcctt
601 gaaggtctac cccacgcagg gccgcaggag cccgcaggag ggcggctccc acgtgggcag
661 gagactgctg gagcagtcag ccgagtcctt cctccacgtg tcccacagct cttcgacat
721 ccgcaagggtg accagcgtga agccctcaa ggccatcccc tgcagtagct ctgcccctcc
781 cctgcctccc aagccccaaa tcgcagccat cgcctccatg aagtcccccg aggcgcagccc
841 tgtggaacca gcttgtggag tcagccgaag accctccctc cagcggtcta agtcagactt
901 gactgacaga tatttcgag tggacgcgga cgtggagagg ttcttcaact actgtgact
961 ggacccgga gagctggaaa acctgggaat ggaaaactat gcaagggcta attctgacat
1021 aatatccctc aacttccgca gcgcaagtat gatcagctca gactgtgaac agtctcagga
1081 cagtaacagt gaccttagaa atgatgacag tgccaatgac cgcgtgccgt atggcatttc
1141 gtcacagaag tgtaaaaa

```

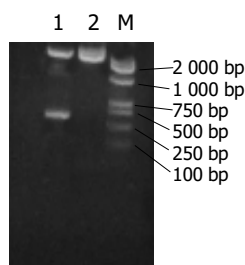


图3 重组真核表达载体 pcDNA-MGC 的酶切鉴定。1: pcDNA-MGC/ digest; 2: pcDNA-MGC; M: DL2000 ladder mark.

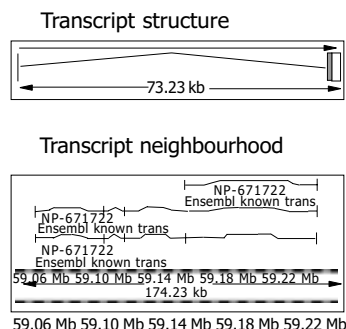


图4 MGC39325 基因转录本结构分析.

(-2.83-1.34), 脂溶指数 (Aliphatic index) 为 71.73, MGC39325 半寿期为 30 h, 为疏水性脂溶性蛋白. 应用神经网络算法, 蛋白质位于细胞浆 (可能性 61.5%). ScanProsite 蛋白结构域分析氨基酸序列含有豆蔻酰化位点 (19-24, 130-135)、cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶 (38-41, 46-49, 204-207)、酪蛋白激酶 (49-52, 158-161)、酪氨酸激酶 (53-61)、蛋白激酶 C 磷酸化位点 (97-99, 140-142, 208-210)、N-糖基化位点 (97-99) 等结构域, 与整合素 beta 家族的特有结构域同源性达 100%, 含 3 个低复杂性区域结构 (图 7), 提示这一新的蛋白质可能在细胞生长、黏附及细胞信号转导方面具有重要功能. 蛋白质二级结构预测显示蛋白主体结构为螺旋结构 (coil), 并含有 5 个螺旋结构 (helix) 及 8 个绞链区 (strand).

3 讨论

我们首次构建了 MGC39325 真核表达载体, 并应用生

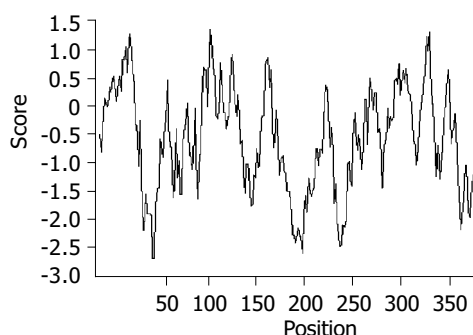


图6 MGC39325 蛋白的疏水性分析.

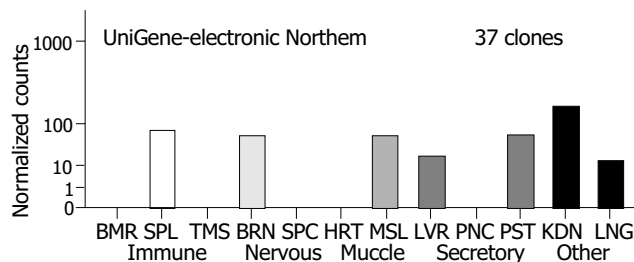


图5 MGC39325 基因数字化组织分布表达分析. BMR: 骨髓 SPL: 脾 TMS: 胸腺 BRN: 脑 SPC: 脊髓 HRT: 心脏 MSL: 骨骼肌 LVR: 肝脏 PNC: 胰腺 PST: 前列腺 KDN: 肾脏 LUN: 肺脏.

物信息学预测其结构及功能, 为进一步研究其功能及其肿瘤中的作用创造了条件. 本实验采用分子克隆技术构建了其真核表达载体, 以期采用基因转染及表达方法探讨其在人类疾病中的作用. 分子克隆的困难之一在于重组子的筛选, 克隆设计的瑕疵, 将导致筛选工作巨大甚至无法筛选, 有时还无法解释实验结果^[6-9]. 我们设计的特异定向克隆策略使筛选工作量降至最低, 从而提高了克隆效率. 其中引入合适的酶切位点极为关键. 合适的酶切位点由所用的两种载体序列、目的基因片段序列等决定, 最佳设计是所引入的位点在 T 载体、pcDNA3.1 (+) 载体及所克隆的目的基因片段中均只有唯一的识别点, 且扩增片段的酶切位点与载体相互匹配, 以便于相互唯一性地识别和连接, 从而保证正确的插入位置及方向. 我们在 MGC39325 片段上游、下游分别引入 *EcoR* I, *Hind* III 酶切位点, 并且均加入 A 突出端, 利用 pGEM-T 载体对 RT-PCR 产物进行 TA 克隆, 将 TA 克隆双酶切产物鉴定后的片段纯化回收, 再克隆至 pcDNA3.1 (+) 真核表达载体. 分子克隆实验的成败关键在于最优化的克隆设计策略和方法, 如 RNA 的完整性、设计最合适的引物、最优化 PCR 扩增条件、RT-PCR 产物回收纯化质量、合适的连接反应及酶切反应体系等. RT-PCR 产物的直接酶切克隆, 虽然简便但效率很低^[10-13], 我们选用高效率的 TA 克隆, 他利用 Taq DNA 聚合酶可以在双链 DNA 的 3' 端独立地加上一个脱氧腺苷酸 (A), 产生一个带有 3' -A 的尾巴的特征, 制备在外源片段

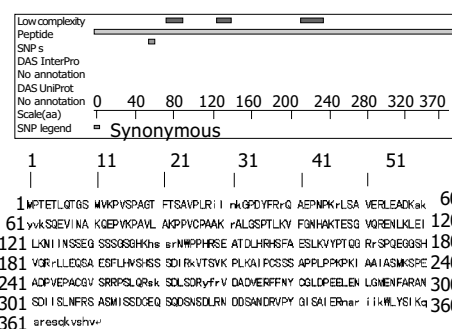


图7 MGC39325 基因 ScanProsite 蛋白结构域分析及其编码蛋白序列.

切口处有一突出的T的载体(称为T载体), 使PCR产物直接与T载体以粘端方式连接. 这样既不需要对PCR产物进行酶切处理, 又提高了连接效率. 由此将目的基因片段先进行高质量的生物法扩增, 提取重组质粒, 进行较高效的酶切反应, 再进行二次克隆, 将目的基因片段正确插入到真核表达载体, 二次克隆策略设计较好地解决了 RT-PCR 等较低质量的 DNA 的分子克隆问题.

我们选用 pcDNA3.1(+) 真核表达载体, 它具有合适的多克隆位点, 有高效能稳定和瞬时转染哺乳动物及人类细胞的能力, 具有高效率 hCMV 立即早期启动子和增强子、T7 启动子、BGH 多腺苷酸信号、SV40 早期启动子、SV40 复制起点(origin)和 pUC 复制起点(ori), 特别是具有在转染细胞中以载体附加体(episome)这一染色体外形式复制的能力, 能在广泛的宿主细胞中稳定复制, 载体在细胞中拷贝数可高达 10^3 , 且该载体已去掉编码病毒结构蛋白的反式作用序列, 无转座作用的长末端重复序列(LTR), 一般认为无再次形成病毒之虞, 因而是一种高效的、相对安全的真核表达载体^[14-17], 较适宜于进一步实验研究. 生物信息学分析发现 MGC39325 基因定位于人染色体 8q12.1, 主要表达于乳腺、脾、肝、骨骼肌、肾、肺、前列腺等, DNA 序列含有表皮样生长因子位点标记(3-14, 12-23)、整合素 β 链半胱氨酸富集区位点标记(183-196)、铁氧化还原蛋白铁硫结合区位点标记(389-397, 1027-1038)、第VIII因子结构域位点标记(105-157, 548-591)、羧基端胱氨酸结位点标记(744-782)等, 基因编码由370个氨基酸组成蛋白质, 为小分子量、疏水性脂溶性蛋白, 可能定位于细胞浆. ScanProsite 蛋白结构域分析显示 MGC39325 氨基酸序列含有豆蔻酰化位点(19-24, 130-135)、cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶(38-41, 46-49, 204-207)、酪蛋白激酶(49-52, 158-161)、酪氨酸激酶(53-61)、蛋白激酶C磷酸化位点(97-99, 140-142, 208-210)、N-糖基化位点(97-99)等结构域, 含3个低复杂性区域结构, 与整合素 β 家族的特有结构域同源性达100%, 其中整合素^[18]、豆蔻酰化位点^[19-21]、cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶^[22-24]、酪蛋白激酶^[25-27]、酪氨酸激酶^[28-29]、蛋白激酶C^[30-31]、N-糖基化位点^[32]等均与肿瘤失调生长、黏附性及细胞信号转导有关, 有的已列为肿瘤转移促进基因. MGC39325 半寿期较短, 我们推测他可能是细胞浆内与细胞运动相关某个功能复合体的亚单位或调节分子, 其疏水性结构可能有助于他通过细胞膜相结构, 提示这一新的蛋白质可能在细胞生长、黏附方面具有重要功能. 这些生物信息学分析为下一步的研究提供了线索, 对 MGC39325 基因功能的进一步分析及实验尚在进行中.

4 参考文献

- Li XN, Ding YQ, Liu GB. Transcriptional gene expression profiles of HGF/SF-met signaling pathway in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1734-1738
- Li XN, Li YL, Liu GB, Ding YQ. Selection of choriocarcinoma-associated genes using bioinformatics. *J First Mil Med Univ* 2005;25:1-6
- Jo C, Jo SA. A simple method to construct T-vectors using XcmI cassettes amplified by nonspecific PCR. *Plasmid* 2001;45:37-40
- Sen TZ, Kloczkowski A, Jernigan RL, Yan C, Honavar V, Ho KM, Wang CZ, Ihm Y, Cao H, Gu X, Dobbs D. Predicting binding sites of hydrolase-inhibitor complexes by combining several methods. *BMC Bioinformatics* 2004;5:205
- Pagni M, Ioannidis V, Cerutti L, Zahn-Zabal M, Jongeneel CV, Falquet L. MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Res* 2004;32:332-335
- Gori F, Divieti P, Demay MB. Cloning and characterization of a novel WD-40 repeat protein that dramatically accelerates osteoblastic differentiation. *J Biol Chem* 2001;276:46515-46522
- Hou L, Tang JW, Cui XN, Wang B, Song B, Sun L. Construction and selection of subtracted cDNA library of mouse hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic metastasis potential. *World J Gastroenterol* 2004;10:2318-2322
- Liu L, Yu XZ, Li TS, Song LX, Chen PL, Suo TL, Li YH, Wang SD, Chen Y, Ren YM, Zhang SP, Chang ZJ, Fu XY. A novel protein tyrosine kinase NOK that shares homology with platelet-derived growth factor/fibroblast growth factor receptors induces tumorigenesis and metastasis in nude mice. *Cancer Res* 2004;64:3491-3499
- Zhou J, Rothman VL, Sargiannidou I, Dimitrov S, Qiu C, Smith E, Sheffield J, Sharma M, Tuszyński GP. Cloning and characterization of angiocidin, a tumor cell binding protein for thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 2004;92:125-146
- Fukasawa KM, Fukasawa K, Higaki K, Shiina N, Ohno M, Ito S, Otagoto J, Ota N. Cloning and functional expression of rat kidney dipeptidyl peptidase II. *Biochem J* 2001;353(Pt 2):283-290
- Yuan X, Gubbins MJ, Berry JD. A simple and rapid protocol for the sequence determination of functional kappa light chain cDNAs from aberrant-chain-positive murine hybridomas. *J Immunol Methods* 2004;294:199-207
- Joh JH, Kim BG, Kong WS, Yoo YB, Kim NK, Park HR, Cho BG, Lee CS. Cloning and developmental expression of a metzincin family metalloprotease cDNA from oyster mushroom pleurotus ostreatus. *FEMS Microbiol Lett* 2004;239:57-62
- Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004;53:2330-2337
- Lim SP, Garzino-Demo A. Cloning trap for signal peptide sequences. *Biotechniques* 2000;28:124-126
- Du DF, Chang S, Chen BC, Chen ZH. Eukaryotic expression vector of heme oxygenase-1 and its expression in endothelial cell. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:360-364
- Liu SF, Lu GX, Liu G, Xing XW, Li LY, Wang Z. Cloning of a full-length cDNA of human testis-specific spermatogenic cell apoptosis inhibitor TSARG2 as a candidate oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:32-40
- Liao G, Li Q, Feng Y, Deng Y, Li Z, Gong F, Ma D. Construction of antisense RNA expression plasmid for u-PAR and its transfection to highly invasive PC-3M cell subclones. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003;23:369-372
- Pochee E, Litynska A, Amoresano A, Casbarra A. Glycosylation profile of integrin alpha 3 beta 1 changes with melanoma progression. *Biochim Biophys Acta* 2003;1643:113-123
- Lu Y, Selvakumar P, Ali K, Shrivastav A, Bajaj G, Resch L, Griebel R, Fournier D, Meguro K, Sharma RK. Expression of N-myristoyltransferase in human brain tumors. *Neurochem Res* 2005;30:9-13

- 20 Shrivastav A, Pasha MK, Selvakumar P, Gowda S, Olson DJ, Ross AR, Dimmock JR, Sharma RK. Potent inhibitor of N-myristoylation: a novel molecular target for cancer. *Cancer Res* 2003;63:7975-7978
- 21 Herness EA, Naz RK. A novel human prostate-specific gene-1 (HPG-1): molecular cloning, sequencing, and its potential involvement in prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 2003;63:329-336
- 22 Keicher C, Gambaryan S, Schulze E, Marcus K, Meyer HE, Butt E. Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:308-316
- 23 Soulsby MD, Alzayady K, Xu Q, Wojcikiewicz RJ. The contribution of serine residues 1588 and 1755 to phosphorylation of the type I inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor by PKA and PKG. *FEBS Lett* 2004;557:181-184
- 24 Pilz RB, Casteel DE. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 2003;93:1034-1046
- 25 Izeradjene K, Douglas L, Delaney A, Houghton JA. Influence of casein kinase II in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:6650-6660
- 26 O-charoenrat P, Rusch V, Talbot SG, Sarkaria I, Viale A, Socci N, Ngai I, Rao P, Singh B. Casein kinase II alpha subunit and C1-inhibitor are independent predictors of outcome in patients with squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 2004;10:5792-5803
- 27 Unger GM, Davis AT, Slaton JW, Ahmed K. Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:77-84
- 28 Miyata Y, Nishid E. Supervision of multiple signaling protein kinases by the CK2-Cdc37 couple, a possible novel cancer therapeutic target. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:150-157
- 29 Machida S, Saga Y, Takei Y, Mizuno I, Takayama T, Kohno T, Konno R, Ohwada M, Suzuki M. Inhibition of peritoneal dissemination of ovarian cancer by tyrosine kinase receptor inhibitor SU6668 (TSU-68). *Int J Cancer* 2005;114:224-229
- 30 Hofmann J. Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:125-146
- 31 Laudanna C, Sorio C, Tecchio C, Butcher EC, Bonora A, Bassi C, Scarpa A. Motility analysis of pancreatic adenocarcinoma cells reveals a role for the atypical zeta isoform of protein kinase C in cancer cell movement. *Lab Invest* 2003;83:1155-1163
- 32 Wobus M, Vogel B, Schmucking E, Hamann J, Aust G. N-glycosylation of CD97 within the EGF domains is crucial for epitope accessibility in normal and malignant cells as well as CD55 ligand binding. *Int J Cancer* 2004;112:815-822

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

旅美华人科学家揭示细胞膜伸展突起机制

细胞膜的突起伸展是如何调控的?与疾病发生发展关系如何?旅美华人科学家陈贤明完成的一项研究揭示了其中的奥秘,该研究为感染性疾病及肿瘤的临床治疗提供了新的思路.这一成果发表在2005-04-25在线出版的《美国科学院院刊》上,审稿人认为,该研究具有很广泛的影响.

细胞膜伸展突起与细胞正常运动、肿瘤细胞的浸润转移、免疫细胞对异物的吞噬等紧密相关,但细胞调控细胞膜伸展突起的分子机理目前还不清楚,以往的研究也多局限于细胞结构蛋白重组对细胞膜突起的调控方面.

陈贤明研究员是山西医科大学客座教授,曾在山西医科大学从事肝病机制等的研究工作.由陈贤明领衔的研究小组,在以研究消化性疾病见长的美国梅奥医学中心消化病基础研究所,利用体外胆管上皮细胞感染模型,探讨了隐孢子虫的子孢子进入宿主细胞膜内的过程,发现隐孢子虫的子孢子在侵入宿主细胞膜内时,诱发大量宿主细胞膜载体及水通道聚集,导致细胞膜的膜局部快速水内流,从而促使局部细胞膜伸展突起,首次证实了局部水内流在细胞膜伸展突起中所具有的重要作用.该研究得到了美国国立卫生研究院(NIH)的资助.

在谈到该项研究的意义时,项目负责人、原美国胃肠病学会主席、梅奥消化病基础研究所所长 Nicholas F. LaRusso 教授说:“该研究具有广泛的基础研究与临床应用意义,它从一个全新的角度揭示了细胞膜伸展突起调控的分子机理,为微生物感染或肿瘤细胞的浸润转移等疾病的防治提供了新的途径.”

在抗微生物感染方面, Nicholas F. LaRusso 指出:尽管现在所取得的研究成果仅仅只是一个开端,但由于隐孢子虫感染是一种全球性常见病,尤其是对免疫缺陷患者(如艾滋病)和新生儿的危害性更大,而目前临床上还没有有效的治疗药物.因此这项研究提示人们,抑制宿主细胞膜突起的形成,可阻断隐孢子虫的子孢子进入宿主细胞,从而阻断其感染途径;同样原理亦可能适用于其它依赖宿主细胞膜感染的病原微生物感染所致疾病的防治.

Nicholas F. LaRusso 说,更为重要的是该研究将有望为人类肿瘤治疗提供一个新的方向.肿瘤细胞的浸润和转移是当前国际医学界研究的热点之一,而肿瘤细胞的浸润转移与肿瘤细胞膜的伸展突起相关,现在已经有不少研究发现,许多肿瘤细胞表达的水通道分子是增强的,因此进一步探讨水通道相关的细胞膜突起在肿瘤细胞浸润转移中的作用,将具有十分重要的临床意义.(2005-04-29, 科学网)

兔酸灌注性食管炎发病机制中血管活性肠肽的作用

韩 勇, 徐 晖, 李小飞, 王云杰

韩勇, 李小飞, 王云杰, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸外科
陕西省西安市 710038
徐晖, 中国人民解放军第四军医大学神经生物学教研室
陕西省西安市 710033
韩勇, 男, 1970-02-03 生, 山东省兖州市人, 汉族. 2002 年第四军医大学胸外科博士. 主要从事肺癌及食管功能研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30300344
通讯作者: 韩勇, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸外科. hanyongmd@yahoo.com
电话: 029-83377736 传真: 029-83246270
收稿日期: 2005-02-28 接受日期: 2005-03-22

Role of vasoactive intestine peptide in development of experimental acid esophagitis in rabbits

Yong Han, Hui Xu, Xiao-Fei Li, Yun-Jie Wang

Yong Han, Xiao-Fei Li, Yun-Jie Wang, Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province China
Hui Xu, Department of Neurobiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30300344
Correspondence to: Dr. Yong Han, Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province China. hanyongmd@yahoo.com
Received: 2005-02-28 Accepted: 2005-03-22

Abstract

AIM: To evaluate the role of vasoactive intestine peptide (VIP) in the development of experimental acid reflux esophagitis (ARE) in rabbits.

METHODS: The ARE model was established by 30 min perfusion of 0.1 mol/L HCl (1 mL/min) 5 cm above the lower esophageal sphincter (LES) for 4 consecutive days (96 h). Mucosal pathological changes of LES were examined under microscope. LES pressure was measured, and VIP expression were determined in the esophageal tissues 48 h and 96 h after the perfusion.

RESULTS: Significant inflammatory changes were observed in the esophageal mucosa after the acid perfusion (48 and 96 h). LES pressure was (1.4±0.16 kPa vs 0.7±0.12 kPa, $P<0.01$) at 96 h after perfusion. No significant change was detected at 48 h after perfusion (1.6±0.11 kPa vs 1.4±0.13 kPa, $P>0.05$). It was (1.3±0.14 vs 1.4±0.12) in the control rabbits (96 h after pNS perfusion). Expression of VIP in animal models after perfusion (48 and 96 h) was increased

significantly compared with controls.

CONCLUSION: LES pressure was reduced, and expression of VIP was increased significantly in the esophageal tissue following acid perfusion. It is suggested that VIP might play an important role in the development of ARE in rabbits.

Key Words: Vasoactive intestine peptide; Acid esophagitis; Rabbits

Han Y, Xu H, Li XF, Wang YJ. Role of vasoactive intestine peptide in development of experimental acid esophagitis in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1065-1068

摘要

目的: 观察兔食管损伤后下括约肌(lower esophageal sphincter, LES)血管活性肠肽(VIP)的改变, 探讨血管活性肠肽(VIP)在兔实验性反流性食管炎发病中的作用。

方法: 采用 0.1 mol/L HCL (1 mL/min, 30 min/d) 连续行兔食管灌注 4 d 建立实验性反流性食管炎模型. 利用光镜、透射电镜下观察酸灌注 48 和 96 h 后 LES 的病理表现, 测定食管下括约肌(LES)的压力, 并测定食管组织的 VIP 表达。

结果: 实验组酸灌注 48 和 96 h 后食管下端黏膜呈现明显食管炎性改变; LES 压力在 0.1 mol/L HCl 灌注 96 h 后明显下降[(1.4±0.16 vs 0.7±0.12) kPa, $P<0.01$]; 而在连续灌注 48 h 后无显著改变[(1.6±0.11 vs 1.4±0.13) kPa, $P>0.05$]. 对照组(生理盐水灌注 96 h 后)LES 压力在灌注前后未见显著改变[(1.3±0.14 vs 1.4±0.12) kPa, $P>0.05$]; 食管组织 VIP 表达在动物模型(酸灌注 48 和 96 h 后)有明显的增加。

结论: 酸灌注后 LES 压力明显下降, 食管组织 VIP 表达明显增加. VIP 在酸损伤食管炎的发生中可能起着重要作用。

关键词: 血管活性肠肽; 酸灌注性食管炎; 兔

韩勇, 徐晖, 李小飞, 王云杰. 兔酸灌注性食管炎发病机制中血管活性肠肽的作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1065-1068
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1065.asp>

0 引言

胃食管反流病是食管黏膜受损的一种慢性疾病, 其发病率很高^[1-4]. 长期慢性病变可以导致慢性食管炎、

吸入性肺炎、食管狭窄,甚至癌变,严重威胁人类健康^[5-9].食管功能障碍性疾病是多因素疾病,其病因一直未得到证实,其中食管收缩、舒张功能障碍成为其发病的主要因素.血管活性肠肽作为非肾上腺能非胆碱能(NANC)的神经递质^[10-12],广泛存在于消化道中并发挥重要作用.对胃肠道的运动有一定的抑制作用,可以导致食管下括约肌(LES)松弛,影响LES功能.关于VIP在反流性食管炎中作用究竟如何,并不十分清楚.我们在兔酸灌注食管炎模型上,探讨了VIP在其发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰白兔45只,体重2-3 kg,雌雄不拘.随机等分为3组,分别为实验组(酸灌注48及96 h组)和对照组(生理盐水灌注96 h组),每组15只.实验组手术前禁食12 h. VIP试剂盒购自Sigma公司.

Hanks液(g/L):NaCl 8.00, KCl 0.40, MgSO₄-7H₂O 0.20, Na₂HPO₄-12H₂O 0.12, KH₂PO₄ 0.06. D-glucose 1.00, CaCl₂ 0.14, NaHCO₃ 0.35. D-Hanks液:按Hanks液配方,不加CaCl₂和MgSO₄. Hanks液和D-Hanks液均采用国产分析纯试剂和超纯水配制.

1.2 方法

1.2.1 建立兔食管炎模型^[13] 用速眠新 0.2 mL/kg肌肉注射麻醉.插入胃管至贲门LES上约3-5 cm处(LES位置的确定采用食管灌注测压的方法,根据LES处的特定波形来定位),灌注0.1 mol/L HCl(1 mL/min共30 min),以此方法连续灌注96 h,同时于酸灌注前后测定LES的压力.48及96 h后分别于家兔耳静脉注入空气约20 mL,致家兔死亡后使兔仰卧固定于手术台上,正中切口剖腹取出食管及贲门,在胃贲门与食管相连处有一呈壶腹状膨大且黏膜增厚,肌纤维呈环形排列的节段,该节段即LES.剥去浆膜,环形切取带有黏膜的LES及从胃食管连接处向上5 cm的食管体部各长约0.8 cm平滑肌组织固定后制备光镜及电镜标本.30 g/L戊二醛固定组织.经逐次脱水、石蜡包埋组织制备光镜标本.用锋利刀片将组织切成3-4 mm小块,用10 g/L

锇酸后固定2 h,乙醇逐级脱水,Epon812做倒扣包埋.聚合后在90℃左右的温度下取下包埋块,定位及超薄切片,铀-铅双重染色后在H-800电镜下观察.

1.2.2 LES的压力测定 用麻醉剂速眠新(846)0.2 mL/kg, im.麻醉兔,使兔仰卧固定于手术台上.通过兔口腔插入胃管.使用三腔管腔内牵拉导管的方法测定食管全长的压力,压力最高处为LES位置所在,测定LES上方5 cm处的食管腔内压力.

1.2.3 食管组织VIP表达 采用免疫组化EnVision法染色,组织切片脱蜡至水;加过氧化物酶阻断液5 min;0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液微波抗原修复8 min;加一抗置37℃恒温箱2 h;加二抗30 min;加新鲜配制的DAB液镜控显色8 min;HE复染.以对照组组织作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照.按照半定量积分方法,每例均随机观察5个高倍视野(×400),进行半定量积分判断VIP阳性结果:阳性细胞≤5%为0分,6-25%为1分,26-50%为2分,51-75%为3分,>75%为4分;阳性强度黄色为1分,棕黄为2分,棕褐色为3分.将细胞阳性率与染色强度二者积分相乘:0分为阴性(-),1-4分为弱阳性(+),5-8分为中度阳性(++),9-12分为强阳性(+++).

统计学处理 数据用mean±SD表示,灌注前后LES压力测定数据采用配对t检验进行分析,P<0.05有统计学意义.

2 结果

2.1 LES形态学特征 HE染色在正常家兔LES横切片上观察到LES的环肌、纵肌完全由平滑肌细胞构成.LES与食管相接处环肌层渐薄,可见掺杂少许横纹肌纤维.实验组家兔LES黏膜明显发红,部分黏膜可见上皮脱落、表面溃疡.光镜下可见实验组家兔食管黏膜基底细胞层明显增生,黏膜下层内血管扩张,充血,部分鳞状上皮固缩脱落.对照组未见明显异常.电子显微镜下可见连续灌注96 h后实验组平滑肌细胞内线粒体肿大,嵴溶解,周围肌浆网明显扩张,肌丝部分溶解减少.对照组未见明显变化(图1 A-B).

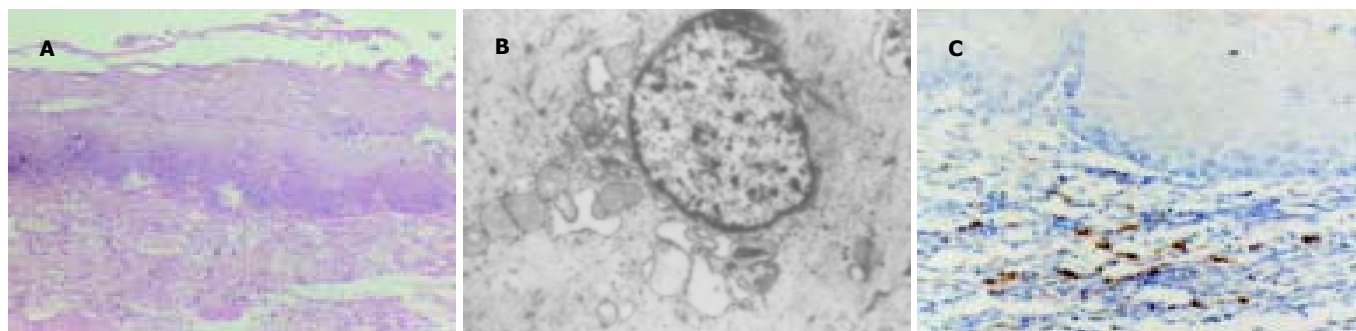


图1 酸灌注性食管炎. A: LES黏膜 HE × 40; B: LES平滑肌细胞 TEM × 10 000; C: VIP SP × 40.

2.2 LES 压力改变 LES 压力在 0.1 mol/L HCl 灌注 96 h 后明显下降(1.4 ± 0.16 vs 0.7 ± 0.12) kPa, $t = 13.55$, $P < 0.01$;而在连续灌注 48 h 后无显著改变(1.6 ± 0.11 vs 1.4 ± 0.13) kPa, $t = 4.54$, $P > 0.05$. 对照组(生理盐水灌注 96 h 后)LES 压力在灌注前后未见显著改变(1.3 ± 0.14 vs 1.4 ± 0.12) kPa, $t = 2.10$, $P > 0.05$.

2.3 食管组织 VIP 表达 酸损伤 48 h, 96 h 后 VIP 表达较对照组明显增加($P < 0.05$), 48 h 与 94 h 两组之间无明显差异($P > 0.05$, 表 1, 图 1C).

表1 食管组织 VIP 表达

Group	n	阳性强度				阳性率
		-	+	++	+++	
48 h	15	4	8	2	1	73.3%
96 h	15	2	6	5	2	86.7%
Control	15	10	4	1	0	33.3%

3 讨论

以食管功能异常为主要表现的食管疾病, 是严重危害患者身心健康的常见病和多发病. 与此相对应的食管功能研究一直侧重于宏观器官和单纯动力学的研究, 明显限制了对食管疾病的发病机理的认识, 疾病的预防和治疗^[14-17]. 目前对于食管炎的研究多为人体的实验, 且局限于测量食管压力及 pH 值等方面. 对于动物实验研究, 目前大多是通过模拟酸及胃蛋白酶、胆汁、胰十二指肠液等反流物质的作用, 及通过手术对 LES 的破坏, 来建立反流性食管炎模型^[18-21]. 这些模型均存在一定的局限. 我们采用酸连续灌注 4 d 的方法建立了免食管炎模型, 通过病理学的改变证实产生典型食管炎病理变化, 同时出现 LES 的功能变化, 是一种较好的急性食管炎模型.

乙酰胆碱 (ACh) 能神经是食管收缩的重要神经递质, 但是 ACh 的异常改变不能充分解释食管平滑肌功能障碍的机理. VIP 为肠神经系统中非肾上腺素能、非胆碱能神经 (NANC) 的主要抑制性神经递质. 作为一种肽能神经递质主要以神经分泌方式在局部起作用, 在食管神经肌肉的调控中可能发挥重要作用^[22-24]. 我们发现小鼠胚胎食管平滑肌内神经元含有 VIP, 这些神经元的终端与运动终板相联系; 在豚鼠食管也发现有 VIP 免疫活性神经元; 这些神经元呈簇状存在于神经节, 沿 VIP 能神经网络散在分布于肌间神经丛内^[25]. 推测食管平滑肌就是在胆碱能神经纤维和 VIP 等肽能神经纤维的协调支配下完成正常的舒缩功能. 我们对食管平滑肌血管活性肠肽 (VIP) 与反流性食管炎中的关

系进行了探讨, 在本实验中, 酸灌注后食管组织均有明显上皮充血, 同时酸灌注 48 h、96 h 后食管组织 VIP 表达明显增加, 提示酸反流后刺激食管组织可能产生 VIP, 导致组织中 VIP 表达明显升高, 酸损伤后 VIP 的明显升高可能对食管功能改变起到重要的作用.

本研究结果显示, 酸损伤后 LES 的压力明显下降, 证实酸侵害可以造成食管功能改变. 我们的前期工作证实^[26-27] 酸灌注后 LES 的功能障碍可能与酸损伤造成了 LES 平滑肌细胞内钙离子的贮存与释放功能损伤及信号转导途径的改变有关. 然而内源性 VIP 作为一种抑制性调节递质, 在食管神经肌肉的调控中同样可能发挥重要作用. VIP 可使袋鼠和犬食管下段括约肌及袋鼠食管体部平滑肌松弛, 这种平滑肌松弛不为 一氧化氮合成酶抑制剂所阻滞. 贲门失弛缓症患者食管中呈抑制性作用的 VIP 神经元大量缺失, 而呈现兴奋性作用的胆碱能神经元相对增多, 可能是该病发生发展的机制之一^[28-30]. 在本实验中我们发现, 酸损伤后 LES 组织中 VIP 含量明显增加的同时, 食管 LES 压力降低, 提示酸损伤后食管组织中 VIP 可能参与调节 LES 的功能, 进而导致 LES 压力下降, 最终导致反流的形成. 总之, 本研究结果显示酸损伤后食管组织 VIP 含量的增加, VIP 在酸损伤食管炎的发生中可能起着重要作用.

4 参考文献

- Zhang J, Chen XL, Wang KM, Guo XD, Zuo AL, Gong J. Barrett's esophagus and its correlation with gastroesophageal reflux in Chinese. *World J Gastroenterol* 2004;10:1065-1068
- Liu JF, Zhang J, Tian ZQ, Wang QZ, Li BQ, Wang FS, Cao FM, Zhang YF, Li Y, Fan Z, Han JJ, Liu H. Long-term outcome of esophageal myotomy for achalasia. *World J Gastroenterol* 2004;10:287-291
- Shah A, Uribe J, Katz PO. Gastroesophageal reflux disease and obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 2005;34:35-43
- Mudawi HM, Fedail SS. Familial achalasia in Sudan. *Trop Gastroenterol* 2004;25:27
- Guo RB, Peng LH, Cheng LF, Wang WF. Alteration of esophageal motility in elderly patients with gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12:125-128
- Cameron AJ. The history of Barrett esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001;76:94-96
- Cameron AJ, Arora AS. Barrett's esophagus and reflux esophagitis: is there a missing link? *Am J Gastroenterol* 2002;97:273-278
- Leggett JJ, Johnston BT, Mills M, Gamble J, Heaney LG. Prevalence of gastroesophageal reflux in difficult asthma: relationship to asthma outcome. *Chest* 2005;127:1227-1231
- Calleja JL, Suarez M, De Tejada AH, Navarro A; Pantogerd Group. *Helicobacter pylori* infection in patients with erosive esophagitis is associated with rapid heartburn relief and lack of relapse after treatment with pantoprazole. *Dig Dis Sci* 2005;50:432-439
- Pfannkuche H, Schellhorn C, Schemann M, Gabel G. Reticular groove and reticulum are innervated by myenteric neurons with different neurochemical codes. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;274:917-922

- 11 Storr M, Geisler F, Neuhauser WL, Schusdziarra V, Allescher HD. Characterization of vagal input to the rat esophageal muscle. *Auton Neurosci* 2001;91:1-9
- 12 Ku SK, Lee HS, Lee JH, Park KD. An immunohistochemical study on the endocrine cells in the alimentary tract of the reared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Anat Histol Embryol* 2001;30:33-39
- 13 韩勇, 赵振源, 王云杰. 食管炎模型的建立及评价. 第四军医大学学报 1999;20:152-154
- 14 Prakash C, Clouse RE. Value of extended recording time with wireless pH monitoring in evaluating gastroesophageal reflux disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:329-334
- 15 Monteiro VR, Sdepanian VL, Weckx L, Fagundes-Neto U, Morais MB. Twenty-four-hour esophageal pH monitoring in children and adolescents with chronic and/or recurrent rhinosinusitis. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:215-220
- 16 Shim CS, Jung IS, Cheon YK, Ryu CB, Hong SJ, Kim JO, Cho JY, Lee JS, Lee MS, Kim BS. Management of malignant stricture of the esophagogastric junction with a newly designed self-expanding metal stent with an antireflux mechanism. *Endoscopy* 2005;37:335-339
- 17 Heikkinen T, Koivukangas V, Wiik H, Saarnio J, Rautio T, Haukipuro K. The quality of life of gastroesophageal reflux disease patients waiting for an antireflux operation. *Surg Endosc* 2004;18:1712-1715
- 18 Tugtepe H, Iskit HS, Bozkurt S, Kiyan G, Yegen BC, Dagli TE. Effects of Stamm gastrostomy on gastric emptying rate in rats. *Eur Surg Res* 2004;36:362-366
- 19 Szentpali K, Eros G, Kaszaki J, Tiszlavicz L, Lazar G, Wolfard A, Balogh A, Boros M. Microcirculatory changes in the canine esophageal mucosa during experimental reflux oesophagitis: comparison of the effects of acid and bile. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1016-1022
- 20 Pera M, Pera M. Experimental Barrett's esophagus and the origin of intestinal metaplasia. *Chest Surg Clin N Am* 2002;12:25-37
- 21 Nishijima K, Miwa K, Miyashita T, Kinami S, Ninomiya I, Fushida S, Fujimura T, Hattori T. Impact of the biliary diversion procedure on carcinogenesis in Barrett's esophagus surgically induced by duodenoesophageal reflux in rats. *Ann Surg* 2004;240:57-67
- 22 Rumessen JJ, de Kerchove d'Exaerde A, Mignon S, Bernex F, Timmermans JP, Schiffmann SN, Panthier JJ, Vanderwinden JM. Interstitial cells of Cajal in the striated musculature of the mouse esophagus. *Cell Tissue Res* 2001;306:1-14
- 23 Jun CH, Lee TS, Sohn UD. NO/cyclic GMP pathway mediates the relaxation of feline lower oesophageal sphincter. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003;23:159-166
- 24 Wu M, Majewski M, Wojtkiewicz J, Vanderwinden JM, Adriaensen D, Timmermans JP. Anatomical and neurochemical features of the extrinsic and intrinsic innervation of the striated muscle in the porcine esophagus: evidence for regional and species differences. *Cell Tissue Res* 2003;311:289-297
- 25 Smid SD, Blackshaw LA. Vagal ganglionic and nonadrenergic noncholinergic neurotransmission to the ferret lower oesophageal sphincter. *Auton Neurosci* 2000;86:30-36
- 26 韩勇, 王云杰, 刘锐. 酸灌注对食管下端扩约肌平滑肌细胞收缩功能的影响. 中国胸心血管外科临床杂志 2000;7:252-255
- 27 赵正源, 王云杰, 刘锐. 兔实验性食管炎食管平滑肌细胞内钙离子浓度的变化. 第四军医大学学报 1999;20:703-706
- 28 Qi BQ, Uemura S, Farmer P, Myers NA, Hutson JM. Intrinsic innervation of the oesophagus in fetal rats with oesophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 1999;15:2-7
- 29 Cheng W, Poon KH, Lui VC, Yong JL, Law S, So KT, Tse K, Tam PK. Esophageal atresia and achalasia-like esophageal dysmotility. *J Pediatr Surg* 2004;39:1581-1583
- 30 Cheng W, Bishop AE, Spitz L, Polak JM. Abnormal enteric nerve morphology in atretic esophagus of fetal rats with adriamycin-induced esophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 1999;15:8-10

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获 我国期刊界的最高政府奖项——国家期刊奖百种重点期刊

本刊讯 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓, 由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后, 第二次获得此项殊荣。

第三届国家期刊奖颁奖大会于2005-02-28在北京举行。中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关方面负责同志出席了颁奖大会。新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向, 促进期刊繁荣”的重要讲话。国家期刊奖是经中共中央宣传部批准, 由国家新闻出版总署于1999年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项, 每两年评选一次, 至今已举办了三届。

第三届国家期刊奖评选活动于2004-08开始。所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选, 于2004-12-21产生初评入围期刊名单, 并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示, 接受全社会的监督, 最终从推荐参评的976种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊100种。

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国9000余种期刊的优秀代表, 反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果。(世界胃肠病学杂志社 2005-03-10)

电针刺大鼠足三里穴对 LESP 血浆胃泌素和胃动素的影响

牟向东, 谢鹏雁, 刘建湘, 帅晓玮, 李 江

牟向东, 谢鹏雁, 刘建湘, 帅晓玮, 李江, 北京大学第一医院消化内科
北京市 100034

牟向东, 男, 1976-08-21 生, 山东省潍坊市人, 汉族, 2002 年北京大学第一
医院消化内科博士, 主要从事上消化道动力方面研究。

北京市自然科学基金资助项目, No. 7042030

通讯作者: 谢鹏雁, 100034, 北京市西城区西什库大街 8 号, 北京大学第一
医院消化内科。Pengyanx2002@yahoo.com

电话: 010-66551122-2301

收稿日期: 2005-03-06 接受日期: 2005-03-22

Effect of electro-acupuncture at Zusanli acupoint on LESP, plasma gastrin and motilin in rats

Xiang-Dong Mu, Peng-Yan Xie, Jian-Xiang Liu, Xiao-Wei Shuai, Jiang Li

Xiang-Dong Mu, Peng-Yan Xie, Jian-Xiang Liu, Xiao-Wei Shuai, Jiang Li,
Department of Gastroenterology, the First Hospital of Beijing University,
Beijing 100034, China

Supported by Natural Science Foundation of BeiJing, No. 7042030

Correspondence to: Dr. Peng-Yan Xie, 8 Xishiku Street, Department
of Gastroenterology, the First Hospital of Beijing University, Beijing
100034, China. Pengyanx2002@yahoo.com

Received: 2005-03-06 Accepted: 2005-03-22

Abstract

AIM: To investigate the influence of electro-acupuncture (EA) at *Zusanli* acupoint on the pressure of lower esophageal sphincter (LESP), and the plasma levels of gastrin (GAS) and motilin (MTL) in the rats.

METHODS: Forty rats were divided into five groups: control group, non-channel non-collateral acupoint group, *Zusanli* acupoint group, atropine group, and atropine+*Zusanli* group. LESP was recorded by using three-channel perfusion manometric measurement system. Radioimmunoassay was applied to detect the plasma contents of GAS and MTL in the rats.

RESULTS: LESP increased significantly under or after EA at *Zusanli* acupoint in both *Zusanli* group and non-channel non-collateral acupoint group [Increased rate: $62.7 \pm 27.0\%$, $131.0 \pm 36.4\%$ (0-20 min), $122.6 \pm 25.9\%$ (21-40 min), $P < 0.01$]. Furthermore, the variation degrees of LESP in *Zusanli* acupoint group were significantly higher than that of the latter (2.34 ± 0.69 kPa vs 1.94 ± 0.35 kPa, 3.308 ± 0.88 kPa vs 2.30 ± 0.36 kPa, 3.17 ± 0.69 kPa vs 2.22 ± 0.40 kPa, $P < 0.01$). LESP of atropine+*Zusanli* group decreased sig-

nificantly after intraperitoneal injection of atropine, and restored to the basic level under EA or after EA, and the variation degrees were significantly lower than those of *Zusanli* group ($P < 0.01$). GAS and MTL levels in plasma of *Zusanli* group were significantly higher than those of control group ($P < 0.01$). No significant difference was found between non-channel non-collateral acupoint group and control group ($P_1 = 0.492$, $P_2 = 0.104$). GAS and MTL of atropine+*Zusanli* group increased significantly compared with atropine or control group ($P_1 < 0.01$, $P_2 < 0.05$). GAS and MTL levels in plasma were positively correlated with LESP ($P < 0.01$, $r_1 = 0.664$, $r_2 = 0.703$).

CONCLUSION: There might be acupoint and meridian specificity in the regulatory effect of EA on LESP. Cholinergic M receptor blocker partially abolishes the effect of EA on LESP, but EA can restore the decreased LESP in the rats treated with cholinergic M receptor blocker. EA at *Zusanli* acupoint can increase plasma GAS and MTL levels, which are positively correlated with LESP of rats, indicating that some brain-gut peptides may play a role in the effect of EA at *Zusanli* acupoint.

Key Words: Electro-acupuncture; *Zusanli* acupoint(st 36); LESP; Gastrin; Motilin

Mu XD, Xie PY, Liu JX, Shuai XW, Li J. Effect of electro-acupuncture at *Zusanli* acupoint on LESP, plasma gastrin and motilin in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1069-1073

摘要

目的: 观察电针刺足三里穴对大鼠下食管括约肌压力 (LESP) 的影响以及与血浆胃泌素 (GAS) 和胃动素 (MTL) 的关系。

方法: 将 Wistar 大鼠 40 只随机分成 5 组: 对照组、非经非络穴组、足三里穴组、阿托品组和阿托品+足三里穴组。应用三通道微细注水式测压管和荷兰 UPS-2020 型食管测压系统测定大鼠 LESP, 同时放免法测定血浆 GAS 和 MTL 的水平。

结果: 电针刺大鼠足三里穴和非经非络穴及电针刺停止后, LESP 均有明显升高 [升高率: $62.7 \pm 27.0\%$, $131.0 \pm 36.4\%$ (0-20 min), $122.6 \pm 25.9\%$ (21-40 min), $P < 0.01$], 足三里穴组 LESP 升高明显大于非经非络穴组 (2.34 ± 0.69 kPa vs 1.94 ± 0.35 kPa, 3.308 ± 0.88 kPa vs

2.30 ± 0.36 kPa, 3.17 ± 0.69 kPa vs 2.22 ± 0.40 kPa, $P < 0.01$). 大鼠阿托品 ip 后 LESP 明显下降($P < 0.01$);在电针刺激期间及电针刺后 LESP 升至正常, 升高率明显低于足三里穴组($P < 0.01$). 电针刺大鼠足三里穴后血浆 GAS, MTL 水平与对照组相比明显升高($P < 0.01$);非经非络穴组升高不明显($P_1 = 0.492$, $P_2 = 0.104$);阿托品 + 足三里穴组 GAS 和 MTL 比阿托品组明显升高($P_1 < 0.01$, $P_2 < 0.05$);GAS 和 MTL 变化与 LESP 呈明显正相关($r_1 = 0.664$, $r_2 = 0.703$, $P < 0.01$).

结论: 电针刺对 LESP 的调控作用具有一定的经络和穴位特异性;胆碱能M受体阻断可部分减弱电针刺足三里的作用, 电针刺可以使胆碱能神经阻断大鼠降低的 LESP 恢复至正常;胃泌素和胃动素可能参与了电针刺对 LESP 的调控作用.

关键词: 电针刺; 足三里穴; 下食管括约肌压力; 胃泌素; 胃动素

牟向东, 谢鹏雁, 刘建湘, 帅晓玮, 李江. 电针刺大鼠足三里穴对 LESP 血浆胃泌素和胃动素的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1069-1073
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1069.asp>

0 引言

电针刺足三里穴对胃液分泌、消化道运动、神经内分泌等具有良好的调节作用^[1-2]. 胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)在人群中发病率较高^[3-4], 社会负担较重^[5], 探讨电针刺(electroacupuncture, EA)对下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)的影响, 对 GERD 的防治具有重要意义. LES 在抗胃食管反流屏障中起关键作用^[6], GERD 患者往往会出现内源性胆碱能神经功能减弱^[7]和脑肠肽分泌异常^[8-9], 导致下食管括约肌压力(pressure of lower esophageal sphincter, LESP)下降和胃食管反流增加. 我们采用电针刺大鼠双侧足三里穴和胆碱能M受体药物阻断的方法, 同时应用特制的测压管持续测定大鼠的LESP, 并分析血浆中胃泌素(GAS)、胃动素(MTL)等脑肠肽的含量变化, 探讨电针刺足三里穴对大鼠 LESP 的影响及神经体液机制.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 Wistar 大鼠 40 只, 由北京大学第一临床医院动物实验中心提供, 质量 400-450 g, II 级动物室喂养 2 wk, 实验前空腹 24 h. 大鼠随机分为 5 组, 每组 8 只: 对照组、非经非络穴组、足三里穴组、阿托品组和阿托品 + 足三里穴组. 各组均持续监测 LESP, 非经非络穴组和足三里穴组在 21-40 min 予电针刺, 阿托品组和阿托品 + 足三里穴组在 20 min 时予阿托品 2 mg/kg 腹腔注射, 阿托品 + 足三里穴组在 41-60 min 予电针刺. 选用 LH202H 型韩氏(HANS)穴位神经

刺激仪(北京); UPS-2020 型低顺应性毛细管连续水灌注测压系统(荷兰); 三腔微细通道测压管(美国), 外径 1.7 mm, 内径 0.4 mm, 各侧孔之间距离均为 2.0 mm, 水流的速度为 0.2 ml/min/侧孔^[10]; 1470WIZARD γ 射线记数仪(WALLAC, 芬兰). GAS 放免试剂盒(中国原子能科学研究院同位素研究所)、MTL 放免试剂盒(北京海科锐生物技术中心)、氨基甲酸乙酯(北京化学试剂公司)、阿托品(天津金耀氨基酸有限公司).

1.2 方法 足三里穴取大鼠双后肢膝关节外、腓骨小头下约 5 mm 处, 直刺 7 mm^[11], 非经非络穴取足三里穴旁 5 mm, 直刺 5 mm; 电针刺参数为^[12]: 等幅疏密波, 频率 2/15 Hz, 对称双向矩形脉冲波, 脉冲宽度分别为: 0.6、0.4 ms, 强度为 1-3 mA 恒流输出, 电流强度以引起大鼠后肢轻度抖动为宜, 电针刺持续 20 min. 大鼠空腹 24 h, 氨基甲酸乙酯(1.0 g/kg) ip 麻醉, 平卧位固定, 头部抬高 20-30°, 切开腹壁和胃壁, 将一引流管放置在贲门下方收集引流食管测压时滴注的液体; 另一引流管置于盆腔, 用于阿托品腹腔注射. 定点牵拉法(stationary pull-through technique, SPT)确定 LES 位置后, 固定测压管, 应用低顺应性毛细管灌注测压系统监测大鼠 LESP. 采用 MMS database 软件计算各时间段平均 LESP. 在处死大鼠前左心室采集血样 2 mL, 置于含 100 g/L EDTA 二钠 30 μ L 和抑肽酶 30 μ L 塑料试管中混匀, 4°C 离心(3 500 r/min \times 10 min), 取血浆放入 -20°C 冰箱保存备检. 待标本收集完毕, 按放免药盒说明严格操作. 血样测量值的计算是将血样的放射性记数与标准曲线对比后确定(单位 ng/L), 由自动 γ 计数仪预编程序, 直接给出有关参数, 标准曲线及样品浓度.

统计学处理 应用 SPSS11.0 统计软件进行数据处理, 所有数据均以 mean \pm SD 表示. 同一组前后比较采用配对 t 检验, 不同组之间采用两组独立样本的 t 检验, 多组之间采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 相关性采用直线相关检验.

2 结果

2.1 电针刺足三里穴和非经非络穴对 LESP 的影响 对照组健康大鼠在 0-20, 21-40, 41-60, 61-80 min 时 LES 静息压分别为 1.42 \pm 0.29, 1.44 \pm 0.27, 1.46 \pm 0.31 和 1.44 \pm 0.28 kPa, 各时间段基本保持稳定, 差异无显著性($P = 0.99$). 足三里穴组和非经非络穴组在电针刺前 LES 静息压与对照组无显著性差异($P = 0.899$); 在电针刺期间及停止后, LESP 明显升高($P < 0.01$): 足三里穴组电针刺期间 LESP 为 2.34 \pm 0.69 kPa, 升高率为 62.7 \pm 27.0%, 电针刺停止后 0-20, 21-40 min 分为 3.308 \pm 0.88, 3.17 \pm 0.69 kPa,

升高率分别为 $131.0 \pm 36.4\%$, $122.6 \pm 25.9\%$; 非经非络穴组电针刺期间LESP为 1.94 ± 0.35 kPa, 升高率为 $12.2 \pm 45.6\%$, 电针刺停止后0-20, 21-40 min 分别为 2.30 ± 0.36 , 2.22 ± 0.40 kPa, 升高率分别为 35.6 ± 10.3 , $60.6 \pm 36.2\%$; 足三里穴组无论是压力值还是升高率均明显大于非经非络穴组 ($P < 0.01$, 图1). 托品组LESP静息压与对照组无显著性差异 ($P = 0.345$), 腹腔注射阿托品后0-20, 21-40, 41-60 min 时LESP较静息压均明显下降 ($P < 0.01$), 各时间段之间压力差异无显著性 ($P = 0.983$). 阿托品+足三里穴组电针前LESP与阿托品组同期相比均无显著性差异 ($P_1 = 0.746$, $P_2 = 0.813$); 电针刺期间及电针刺后LESP同电针刺前(注射阿托品后)相比明显升高 ($P_1 < 0.01$, $P_2 < 0.05$), 升高率分别为 28.5 ± 19.7 , $31.2 \pm 28.5\%$, 但均低于足三里穴组 ($P < 0.01$); 同静息压相比差异无显著性 ($P_1 = 0.155$, $P_2 = 0.252$, 表1).

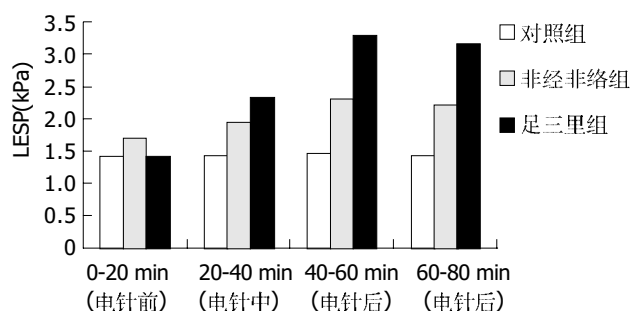


图1 电针刺健康大鼠足三里穴和非经非络穴对LESP的影响.

2.2 电针刺对大鼠血浆GAS和MTL的影响 血浆GAS水平: 足三里穴组为 126.6 ± 18.1 $\mu\text{g/L}$, 与对照组相比明显升高 ($P < 0.01$), 非经非络穴组, 阿托品组和对照组相比无显著性差异 ($P_1 = 0.492$, $P_2 = 0.562$), 阿托品+足三里穴组为 102.7 ± 23.6 $\mu\text{g/L}$, 明显高于阿托品组, 低于足三里穴组 ($P < 0.01$, 表2). 血浆MTL水平: 足三里穴组为 169.1 ± 19.9 $\mu\text{g/L}$, 与对照组相比明显升高 ($P < 0.01$), 非经非络穴组, 阿托品

组与对照组相比均无显著性差异 ($P_1 = 0.104$, $P_2 = 0.673$), 阿托品+足三里穴组为 143.5 ± 18.9 $\mu\text{g/L}$, 明显高于阿托品组, 低于足三里穴组 ($P < 0.01$, 表2). 血浆GAS, MTL水平和各组的LESP呈正相关 ($r_1 = 0.664$, $r_2 = 0.703$, $P < 0.01$).

表2 电针刺对血浆GAS和MTL的影响 ($n = 8$, $\mu\text{g/mL}$)

分组	GAS	MTL
对照组	81.6 ± 13.3	123.0 ± 17.2
非经非络穴组	87.2 ± 18.1	138.5 ± 18.3
足三里穴组	126.6 ± 18.1^b	169.1 ± 19.9^b
阿托品组	79.7 ± 14.1	119.3 ± 16.3
阿托品+足三里穴组	102.7 ± 23.6^d	143.5 ± 18.9^d

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 足三里穴组和阿托品组.

3 讨论

祖国传统医学认为: 十二经脉是运行气血的通路, 他内属脏腑, 外络于肢节, 把机体各部联系成为一个有机的整体; 足阳明胃经为十二经脉中多气, 多血者, 与胃肠功能关系密切; 足三里穴为足阳明胃经之合穴(经气所汇为合), 为临床常用之要穴^[13]. 电针刺足三里穴对胃肠运动有明显的良性双向调理作用, 这取决于机体的原先机能状态及针刺的刺激强度^[14-15]. 针刺前如果胃肠道运动机能处在较低水平, 针刺则使之增强, 相反如果处于机能亢进的状态, 针刺可使之降低. 目前电针刺对下食管括约肌的作用的研究较少, 结论也有所不同. 有人实验发现电针刺能够改善正常人吞咽时的食管蠕动和LES松弛, 并可以使食管的自发性蠕动减少^[16]; 电针刺可以使贲门失弛缓症患者的LESP下降, 吞咽困难缓解^[17]. 也有动物实验发现电针刺猫足三里穴可以增加食管体部的运动和LESP增加^[18]. 本结果表明, 电针刺足三里穴可使健康大鼠LESP明显升高, 抗胃食管反流的能力增强, 该生物学效应在电针刺停止之后仍继续存在; 针刺非经非络穴也可使LESP升高, 但是没有

表1 电针刺足三里穴对胆碱能神经阻断大鼠LESP的影响 ($n = 8$, kPa)

分组	阿托品+足三里穴	阿托品	足三里穴	对照
0-20 min(静息压)	1.66 ± 0.43	1.60 ± 0.37	1.42 ± 0.28	1.42 ± 0.29
21-40 min(阿托品后, 电针刺前)	1.41 ± 0.43^b	1.36 ± 0.39^b	2.34 ± 0.69^b	1.44 ± 0.27
变化率(%) (阿托品后-静息)/静息	-16.0 ± 7.7	-10.2 ± 2.9	$+62.7 \pm 27.0$	$+2.1 \pm 11.3$
41-60 min(电针刺中)	1.77 ± 0.52^d	1.34 ± 0.33^b	3.30 ± 0.88^b	1.46 ± 0.31
变化率(%) (电针刺中-前)/电针刺前	$+28.5 \pm 19.7^f$	$+2.70 \pm 9.4$	$+131.0 \pm 36.4$	$+2.5 \pm 7.2$
61-80 min(电针刺后)	1.84 ± 0.68^c	1.37 ± 0.33^b	3.17 ± 0.69^b	1.44 ± 0.28
变化率(%) (电针刺后-前)/电针刺前	$+31.2 \pm 28.5^f$	$+2.90 \pm 9.8$	$+122.6 \pm 25.9$	$+1.1 \pm 8.2$

^b $P < 0.01$ vs 静息压; ^c $P < 0.05$ vs 电针刺前; ^d $P < 0.01$ vs 电针刺前; ^f $P < 0.01$ vs 足三里穴组.

电针刺足三里穴明显. 这说明电针刺对下食管括约肌压力的调节作用具有一定的穴位和经络特异性.

LES的神经支配主要来自迷走神经. 迷走神经由兴奋性胆碱能和抑制性非肾上腺能非胆碱能(non-adrenergic non-cholinergic, NANC)神经元组成, 形成突触分布介导LES压力的增加和减低^[19], LESP是由兴奋性和抑制性两种因素的平衡决定的. 反流性食管炎患者的内源性胆碱能神经往往会出现功能减弱, 并随着食管炎的严重程度而加重, 导致了LESP下降^[4]; 而LESP低下是导致胃食管反流, 食管炎症加重的一个主要原因^[20], 如此形成恶性循环. 胆碱能M受体阻断可使大鼠LESP下降, 而电针刺足三里穴可以使其恢复至正常水平. 这对反流性食管炎的治疗有重要意义. 电针刺足三里穴对胃肠功能产生影响的机制目前尚未完全明确, 但大多数学者认为其作用的发挥与神经-体液因素有关^[20-23]. 有人在研究电针刺调节狗胃液分泌的实验中发现胆碱能神经阻断后电针刺的效应消失^[24]; 在研究大鼠胃运动的实验中, 迷走神经切断或阿托品阻断可使电针的效应大部分消失^[13, 25], 因此认为针刺足三里穴的传出途径是迷走神经. 本实验发现在阻断胆碱能M受体后, 电针刺增加LESP的作用被明显减弱, 这表明迷走神经中的胆碱能神经是电针刺对食管动力作用的主要途径; 但是胆碱能M受体阻断仅部分减弱电针刺的作用, 电针刺仍可使胆碱能神经阻断大鼠降低的LESP恢复至正常水平. 这说明电针刺兴奋LES的效应除迷走神经中的胆碱能神经这一主要途径外, 还有其他的机制.

近年随免疫学的迅速发展, 发现了大量脑肠肽-激素类物质如GAS和MTL等参与了食管运动和LES压力的调节^[26]. 如果灌注抗GAS血清, 血浆中的GAS浓度会下降80%, 并伴有LES基础压力的下降^[27], 表明GAS生理性调节LES的运动; MTL对禁食的人, 狗和负鼠LES的刺激作用则是众所周知的事情^[28]. 在病理状况下如反流性食管炎, 患者会出现GAS分泌异常^[29]和MTL水平下降^[8]. 许多实验证实了GAS, MTL参与了电针刺对胃运动的调节作用^[30-31], 但是否参与了电针刺对LESP及食管运动的调节, 目前尚没有报道. 本实验发现电针刺大鼠足三里穴可以增加血浆GAS和MTL的水平, 并且GAS和MTL的水平与LESP呈正相关, 这说明电针刺促进了GAS和MTL的分泌和释放, 而GAS和MTL使LESP同步升高; 阿托品腹腔注射降低GAS和MTL在血浆中的含量, 提示胆碱能神经介导了GAS和MTL的分泌. 综上所述, 电针刺大鼠足三里穴可以使LESP增加, 抗胃食管反流的能力增强, 这为电针刺治疗GERD提供了依据; 电针刺足三里穴调节LESP的主要传出途径可能是迷走神经中的胆碱能神经; 胃泌素

和胃动素也参与了电针刺对LESP的调节作用, 具体机制仍需进一步研究.

4 参考文献

- Diehl DL. Acupuncture for gastrointestinal and hepatobiliary disorders. *J Altern Complement Med* 1999;5:27-45
- 赵保民, 黄裕新, 王庆莉, 褚自宏, 赵宁侠. 电针足三里穴对胃酸分泌的影响及与促胃液素, 表皮生长因子的关系. *世界华人消化杂志* 2000;8:276-278
- Shaheen N, Provenzale D. The epidemiology of gastroesophageal reflux disease. *Am J Med Sci* 2003;326:264-273
- 潘国宗, 许国铭, 郭慧平, 柯美云, 韩少梅, 李兆申, 方秀才, 邹多武, 鲁素彩, 刘婧. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查. *中华消化杂志* 1999;19:223-226
- Sandler RS, Everhart JE, Donowitz M, Adams E, Cronin K, Goodman C, Gemmen E, Shah S, Avdic A, Rubin R. The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology* 2002;122:1500-1511
- Orlando RC. Overview of the mechanisms of gastroesophageal reflux. *Am J Med* 2001;111(Suppl 8A):174S-177S
- Cao Y, Xie P, Xing Y. Role of endogenous cholinergic nerve in esophageal dysmotility with reflux esophagitis. *Zhonghua Neike Zazhi* 2001;40:670-672
- 王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣. 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性. *世界华人消化杂志* 2004;12:476-477
- Perdikis G, Wilson P, Hinder RA, Redmond EJ, Wetscher GJ, Saeki S, Adrian TE. Gastroesophageal reflux disease is associated with enteric hormone abnormalities. *Am J Surg* 1994;167:186-191
- Sigala S, Missale G, Raddino R, Cestari R, Lojcono L, Missale C, Spano PF. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in the regulation of lower esophageal sphincter motility in the rat. *Life Sci* 1994;54:1035-1045
- 李忠仁. 实验针灸学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2003:327
- Chou JW, Chang YH, Chang CS, Chen GH. The effect of different frequency electrical acupuncture stimulation on gastric myoelectrical activity in healthy subjects. *Hepatogastroenterology* 2003;50:582-586
- Liu JH, Yan J, Yi SX, Chang XR, Lin YP, Hu JM. Effects of electroacupuncture on gastric myoelectric activity and substance P in the dorsal vagal complex of rats. *Neurosci Lett* 2004;356:99-102
- Tatewaki M, Harris M, Uemura K, Ueno T, Hoshino E, Shiotani A, Pappas TN, Takahashi T. Dual effects of acupuncture on gastric motility in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R862-R872
- Dill SG. Acupuncture for gastrointestinal disorders. *Probl Vet Med* 1992;4:144-154
- Chang FY, Chey WY, Ouyang A. Effect of transcutaneous nerve stimulation on esophageal function in normal subjects-evidence for a somatovisceral reflex. *Am J Chin Med* 1996;24:185-192
- Guelrud M, Rossiter A, Souney PF, Sulbaran M. Transcutaneous electrical nerve stimulation decreases lower esophageal sphincter pressure in patients with achalasia. *Dig Dis Sci* 1991;36:1029-1033
- 张晓艳, 谢鹏雁. 电针足三里穴对猫食管下括约肌功能及食管体动力的影响. *基础医学与临床* 2003;23(增刊):45-46
- Crist J, Gidda JS, Goyal RK. Intramural mechanism of esophageal peristalsis: roles of cholinergic and noncholinergic nerves. *Proc Natl Sci USA* 1984;81:3595-3599
- Smith FW Jr. Neurophysiologic basis of acupuncture. *Probl Vet Med* 1992;4:34-52
- 田庆华, 尹岭, 孙锦平. 针刺足三里穴对脑肠肽及胃肠功能的影响. *中国康复理论与实践* 2003;9:186-188
- 常小荣, 严洁, 易受多, 林亚平, 邓元江, 张泓. 电针"足三里"对大鼠胃电及脑肠肽的影响. *中国针灸* 2004;24:124-126
- 高巍, 黄裕新, 陈洪, 赵宁侠, 孙大勇, 张洪新, 王庆莉. 电针对胃经-脑肠肽-免疫网络的调控机制. *世界华人消化杂志* 2001;9:279-283
- Zhou L, Chey WY. Electric acupuncture stimulates non-parietal cell secretion of the stomach in dog. *Life Sci* 1984;34:2233-2238

- 25 周吕, 王礼建, 云天佑, 王玲. 电针胃经穴对狗胃肠移行性复合运动及脑肠肽释放的作用. 科学通报 2000;45:2419-2426
- 26 Gutierrez JG, Thanik KD, Chey WY, Yajima H. Effect of motilin on the lower esophageal sphincter of the opossum. *Am J Dig Dis* 1977;22:402-405
- 27 周吕, 柯美云. 胃肠动力学基础与临床. 北京: 科学出版社, 1999:625
- 28 陈远方. 胃肠肽类激素基础与临床. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997:328
- 29 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾哲. 胃食管反流病与幽门螺杆菌相关性胃炎及胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:1100-1103
- 30 Uvnas Moberg K, Lundberg T, Bruzelius G, Alster P. Vagally mediated release of gastrin and cholecystokinin following sensory stimulation. *Acta Physiol Scand* 1992;146:349-356
- 31 易受乡, 林亚平, 严洁, 常小荣, 杨昱. 电针对大鼠胃运动, P物质和胃动素的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:284-287

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于 2003-04-15 开通. WJG 包括: 1995-2004 年 1-12 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2004 年第 1-5 期及特刊.

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者). 高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数. 高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文. 一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响大. 投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式.

2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠.

100101, 北京市, 中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会. 方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8次在直升机上的医疗救护演练经验, 2次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案. 结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的ICU全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护. 结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务.

论文目次

目次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014. 功能目次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF.

4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 72, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接.

5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

食管鳞癌 MMP-2 和 CD44v6 表达与侵袭、转移及预后之间的关系

张林, 孟龙, 王磊, 彭忠民, 杜贾军, 王晓航, 刘莹, 陈景寒

张林, 孟龙, 王磊, 彭忠民, 杜贾军, 王晓航, 陈景寒, 山东省立医院微创胸外科肺移植中心 山东省济南市 250021
刘莹, 山东省立医院病理科 山东省济南市 250021
张林, 男, 1970-09-13 生, 山东莘县人, 汉族. 1993 年青岛医学院本科毕业, 2003 年山东大学博士毕业, 2005 年天津医科大学博士后, 主治医师, 主要从事胸外肿瘤的临床基础工作.
通讯作者: 张林, 250021, 山东省济南市经五路 324 号, 山东省立医院微创胸外科肺移植中心. zhanglindocter@163.com.
电话: 0531-5186387 传真: 0531-7938911
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-02-26

Expression of CD44v6 and MMP-2 in esophagus squamous cell carcinoma and their association with invasion, metastasis and prognosis

Lin Zhang, Long Meng, Lei Wang, Zhong-Min Peng, Jia-Jun Du, Xiao-Hang Wang, Ying Liu, Jing-Han Chen

Lin Zhang, Long Meng, Lei Wang, Zhong-Min Peng, Jia-Jun Du, Xiao-Hang Wang, Jing-Han Chen, Center of Thoracic Minimal Invasive Surgery and Lung Transplantation, Shandong Provential Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China
Ying Liu, Department of Pathology, Shandong Provential Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China
Correspondence to: Dr. Lin Zhang, Center of Thoracic Minimal Invasive Surgery and Lung Transplantation, Shandong Provential Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China. zhanglindocter@163.com
Received: 2005-01-06 Accepted: 2005-02-26

Abstract

AIM: To detect the expression of CD44v6 and MMP-2 in esophagus squamous cell carcinoma, and to explore their association with invasion, metastasis and prognosis.

METHODS: A rapid immunohistochemical method (streptavidin-peroxidase, SP) was used to detect CD44v6 and MMP-2 protein in 43 cases of esophagus squamous cell carcinoma-treated without radiotherapy or chemotherapy before operation.

RESULTS: The expression rates of CD44v6 and MMP-2 in esophagus squamous cell carcinoma were 62.7% (27/43) and 65.1% (28/43), respectively. The positive expression of MMP-2 and CD44v6 were significantly correlated with lymph node metastasis, TNM stage and postoperative hematogenous metastasis ($P < 0.05$). The 3-and 5-year survival rates of CD44v6 positive patients were 25.62%

and 6.41%. The 3-and 5-year survival rates of CD44v6 negative patients were 64.71% and 56.82%. There was significant difference for survival time between CD44v6 positive and CD44v6 negative patients ($P = 0.000$). The 3-and 5-year survival rates of MMP-2 positive patients were 18.8% and 8.60%. The 3-and 5-year survival rates of MMP-2 negative patients were 66.30% and 42.82%. There was significant difference between MMP-2 positive and MMP-2 negative groups ($P = 0.0067$). CD44v6 positive expression was significantly correlated with MMP-2 positive expression ($P = 0.007$).

CONCLUSION: CD44v6 and MMP-2 may play a role in esophagus squamous cell carcinoma invasion, lymph node metastasis, and postoperative hematogenous metastasis as well as the prognosis of the patients.

Key Words: CD44v6; MMP-2; Esophagus squamous cell carcinoma; Invasion; Metastasis

Zhang L, Meng L, Wang L, Peng ZM, Du JJ, Wang XH, Liu Y, Chen JH. Expression of CD44v6 and MMP-2 in esophagus squamous cell carcinoma and their association with invasion, metastasis and prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1074-1077

摘要

目的: 探讨 CD44v6 和 MMP-2 在食管癌组织中的表达及其与食管癌侵袭转移和预后的关系。

方法: 回顾性分析 43 例术前未进行化疗和放疗的食管癌的切除标本, 采用免疫组化 S-P 法检测食管癌组织中的 CD44v6 和 MMP-2 的表达。

结果: 食管癌中 CD44v6 的阳性表达率 62.7%(27/43), MMP-2 的阳性表达率为 65.1%(28/43), CD44v6 及 MMP-2 的阳性表达与淋巴结的转移, 食管癌的病理分以及手术后血性转移显著相关($P < 0.05$), 而且, CD44v6 阳性表达者 3 a 生存率为 25.62%, 5 a 生存率为 6.41%, 阴性表达 3 a 生存率为 64.71%, 5 a 生存率为 56.82%, 二者之间差异显著($P = 0.000$); MMP-2 阳性者 3 a 生存率为 18.8%, 5 a 生存率为 8.67%, 阴性表达者 3 a 生存率为 66.30%, 5 a 生存率为 42.66%, 二者之间差异显著($P = 0.0067$); CD44v6 的阳性表达和 MMP-2 的阳性表达显著性相关($P = 0.007$)。

结论: CD44v6 和 MMP-2 对于食管鳞癌的侵袭、淋巴结转移、手术后血性转移以及预后有一定作用。

关键词: CD44v6; MMP-2; 食管鳞癌; 侵袭; 转移

张林, 孟龙, 王磊, 彭忠民, 杜贵军, 王晓航, 刘莹, 陈景寒. 食管鳞癌 MMP-2 和 CD44v6 表达与侵袭、转移及预后之间的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13(9): 1074-1077
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1074.asp>

0 引言

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)能够降解细胞外基质和基底膜成分, 破坏基底膜的完整性为肿瘤的浸润和转移提供了先决条件^[1-14]. 细胞黏附因子(cell adhesion moleculars, CAMs)参与细胞的信号传导与活化, 与肿瘤的生长分化尤其是与肿瘤的浸润转移密切相关. CD44v6 是细胞黏附因子的一种, 目前研究表明 CD44 与肿瘤的关系密切^[15-24]. 我们利用免疫组织化学方法检测食管鳞癌组织 MMP-2 和 CD44v6 的表达情况, 探讨这两种基因之间及其与食管鳞癌生物学行为, 特别是与食管癌浸润、转移、复发和预后之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 我科 1996/1999 年手术切除的食管鳞癌标本 43 例, 所有病例术前未做任何形式的化疗和放疗, 男 25 例, 女 18 例, 年龄 35-72 岁(平均 55 岁), 按照国际标准进行分期 I (I A+ I B) 期 17 例, II (II A+ II B) 期 12 例, III (III A+ III B) 期 14 例. 淋巴结转移情况采用目前的国际分期, 在分期中, N0 代表淋巴结无转移, N1、N2 代表淋巴结转移, 只是转移的部位不同. 所有患者接受了食管癌切除胃食管吻合术和淋巴结清扫, 术后均严格随访, 无失访. 死亡 31 例, 存活 12 例, 5 a 生存率为 27.91%. 死亡的患者中有 21 例发生血性转移, 其中脑转移 3 例, 肝转移 8 例, 骨骼和脊柱转移 6 例, 肾上腺转移 1 例, 肺转移 3 例. 所有标本切取肿瘤标本蜡块. 鼠抗人 MMP-2mAb, 鼠抗人 CD44v6mAb,

即用型 S-P 试剂盒, DAB 二氨基联苯胺显色剂试剂盒, 以上试剂均购自福州迈新公司产品。

1.2 方法 采用 S-P 法. MMP-2 结果判定: MMP-2 阳性结果判定, 低倍镜下见细胞质内出现明确的棕黄色颗粒的细胞为阳性. 合并计算 5 个不同视野染色细胞百分数及染色强度, 作评分, 0 和 1 为阴性表达, 2 和 3 为阳性表达. CD44v6 结果判定 CD44v6 阳性产物分布于细胞膜上, 为粗细一致的棕黄色颗粒. 根据显色强度和阳性细胞数进行分级, 阴性(-)为整张组织切片均无着色; 弱阳性(+)为浅棕色, 阳性细胞计数<10%; 阳性(++)为棕色, 阳性细胞计数在 10-50%; 强阳性(+++)为深棕色, 阳性细胞计数>50%。

统计学处理 采用 χ^2 检验, 精确概率法和 Kaplan-meier 方法及 Log Rank 检验进行生存分析. Spearman 等级相关分析,

2 结果

2.1 MMP-2 的表达(图 1A) 鳞状细胞癌中阳性表达为 65.1%, 无淋巴结转移的患者中, MMP-2 的阳性率为 33.3%, 而 N1+N2 组的 MMP-2 的阳性率为 92.0%, 两组之间差异显著($\chi^2 = 16.404$, $P = 0.000$, 表 1). 说明 MMP-2 和淋巴结转移密切相关. I 期 17 例, 其中 MMP-2 阳性率为 41.2%, II 期 + III 期 26 例, 阳性率为 84.6%, 两组之间差异显著($\chi^2 = 8.833$, $P = 0.003$, 表 1). 说明食管癌临床分期越晚, MMP-2 的阳性表达越高. 转移组中, MMP-2 阳性表达率为 85.71%, 显著高于无转移复发组的(50.0%)差异显著($\chi^2 = 6.241$, $P = 0.012$, 表 1). MMP-2 阳性表达者 5 a 生存率为 6.4%, MMP-2 阴性者 5 a 生存率为 56.8%, 两组之间生存率之间经过 log-rank 检验, 具有显著性差异($P = 0.0067$, 图 2A)。

2.2 CD44v6 的表达(图 1B) 淋巴结无转移者 CD44v6 阳性率为 33.3%, 而 N1+N2 组的 CD44v6 的阳性率为 84.0%, 两组之间差异显著($\chi^2 = 11.499$, $P = 0.001$, 表 1). I 期 17 例, CD44v6 阳性率为 35.3%, II 期 + III 食管

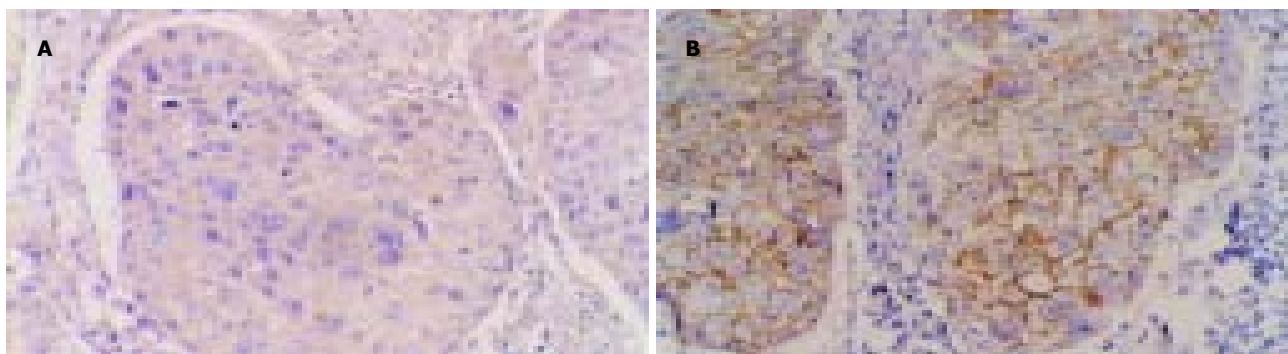


图1 MMP-2 和 CD44v6 在食管鳞癌中的阳性表达(DAB, SP × 200). A: MMP-2; B: CD44v6.

癌26例,阳性率为80.8%,两组之间差异显著($\chi^2 = 13.858$, $P = 0.000$,表1).转移组CD44v6阳性表达率为81.0%显著高于无转移复发组CD44v6的阳性率($\chi^2 = 5.795$, $P = 0.016$,表1)CD44v6阳性表达者5 a生存率为10.7%,CD44v6阴性者5 a生存率为53.5%,二者差异显著($P = 0.000$,图2B).

MMP-2和CD44v6同时阳性的例数为22例,MMP-2表达阳性组CD44v6阳性例数明显高于MMP-2表达阴性组CD44v6阳性例数($P < 0.05$),经过speraman等级相关分析发现食管癌中MMP-2表达与CD44v6表达成正相关($r = 0.785$, $P < 0.01$,表2),二者同时阳性患者生存期较差,3 a生存期为10.53%,5 a生存率为0%(图2C)

表1 食管癌组织MMP-2和CD44v6的表达情况

病理特点	MMP-2 阳性	CD44v6 阳性
N0	6(33.3)	6(33.3)
N1+N2	23(92.0) ^b	21(84.0) ^b
I	7(41.2)	5(28.4)
II + III	22(84.6) ^d	22(84.6) ^d
转移		
阳性(+)	18(85.7)	17(81.0)
阴性(-)	11(50.0) ^a	10(45.4) ^a
合计	28(65.1)	27(62.7)

^a $P < 0.05$ vs 阳性组; ^b $P < 0.01$ vs N0组; ^d $P < 0.01$ vs I期组.

表2 43例食管癌MMP-2表达与CD44v6表达阳性的关系

MMP-2 表达	n	CD44v6 表达阳性
阳性	28	22
阴性	15	5 ^b

^b $P < 0.01$ vs 阳性.

3 讨论

MMP-2能够分解基底膜的主要成分—IV型胶原蛋白,而IV型胶原蛋白又是ECM的主要成分,故称为IV型胶原酶,MMP-2(明胶酶A/72 ku IV胶原酶)能够分解

基底膜的主要成分纤维连接蛋白和层连蛋白.本研究表明,MMP-2在食管癌组织中高表达这与其他研究报告相一致,本组食管鳞癌阳性率为65.1%,MMP-2与食管鳞癌的临床病例特征密切相关,淋巴结无转移的患者MMP-2阳性率为33.3%,而淋巴结转移组的MMP-2的阳性率为92.0%二者之间有显著性差异.说明MMP-2和淋巴结转移密切相关,而且随着分期的升高,食管鳞癌组中MMP-2的阳性表达率明显增高,在I期中阳性率为41.2%,II期和III期中的阳性率为84.6%,两组之间差异显著($P < 0.05$).术后发生转移的21例中有18例为MMP-2阳性,无转移的22例患者中11例阳性,差异显著.MMP-2能够促进肿瘤浸润转移所以影响了患者的预后,我们发现MMP-2阴性组的3、5 a生存率为66.3%和42.8%,明显高于MMP-2阳性组.

细胞黏附因子(cell adhesion molecules)参与细胞的信号传导与活化,细胞的伸展和移动,细胞的生长和分化,肿瘤的转移等一系列重要的生理病理过程,CD44v6为细胞黏附因子的一种,是当前研究的热点,我们发现CD44v6和淋巴结转移有密切关系.本组病例中,I期和II期+III期相比较,阳性率分别为35.3%和80.8%,两组之间差异显著($P < 0.05$),也说明了CD44v6和食管鳞癌的分期相关.本研究证实,CD44v6和血道转移相关,在术后发生血道转移者,CD44v6的阳性表达为81.0%.再次证实了Griffioen *et al*提出的CD44细胞黏附因子参与了血管形成的观点.本组患者中CD44v6阳性的5 a生存率为6.4%,而CD44v6阴性的患者5 a生存率为56.8%,经过Log Rank检验P值为0.000有显著性差别.说明CD44v6是影响患者预后的重要指标.

肿瘤的侵袭和转移包括一系列内在的联系步骤,是多分子参与的高度选择性的非随机过程.在这个复杂过程中,癌细胞之间,癌细胞与基质间,以及癌细胞与宿主细胞间的黏附至关重要.癌细胞转移有步骤,即(1)癌细胞自身黏附性降低,脱离原发部位;(2)降解,癌细胞和宿主细胞分泌多种蛋白酶,水解细胞外基质和基质膜中蛋白成分;(3)移

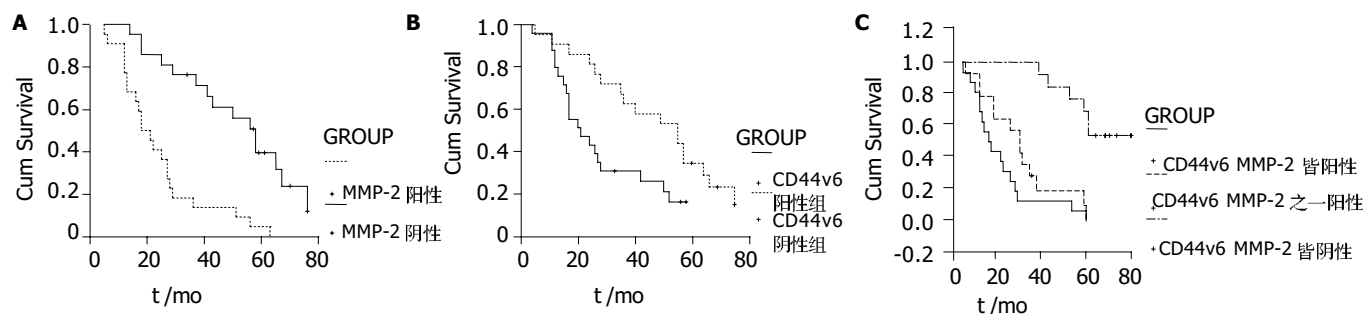


图2 食管鳞癌MMP-2和CD44v6的表达患者生存曲线. A: MMP-2; B: CD44v6; C: CD44v6, MMP-2不同分组.

动, 最后癌细胞进入淋巴管或血管向远处转移, 黏附因子与癌转移过程密切相关; 血管生成是肿瘤生长转移等复杂过程中重要环节, 我们选择 CD44v6 及 MMP-2 因子观察其在食管鳞癌中的表达, 发现 CD44v6 和 MMP-2 在食管癌中的表达是正相关, 如表 2 所示 MMP-2 表达阳性组的 CD44v6 阳性例数明显高于 MMP-2 表达阴性组的 CD44v6 阳性例数, 经过 spearman 等级相关分析发现食管癌中 MMP-2 表达与 CD44v6 表达成正相关 ($r = 0.785$ $P < 0.05$) 我们在生存分析中发现, CD44v6 和 MMP-2 全部阴性的患者 3 a 生存率为 81.82%, 5 a 生存率为 72.73%, 其中一个阳性组的患者的 3 a 生存率 38.46%, 5 a 生存率为 28.85%, 全部阳性组的 3 a 生存率为 10.53%, 5 a 生存率为 0%, 三组之间进行检验有显著性差异 ($P = 0.001$). 表明联合检测 CD44V6 和 MMP-2 在食管鳞癌的表达可以帮助我们判断患者的病程发展及预后, Zhang *et al* 利用肺癌细胞株 QG90 研究证明 CD44S 能够调节 MMP-2 分泌. 对于二者在食管癌中的具体作用机制尚需进一步研究.

4 参考文献

- Ming SH, Sun TY, Xiao W, Xu XM. Matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung cancer invasion and metastasis. *Chin Med J (Engl)* 2005;118:69-72
- Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2004;10:8229-8234
- Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, Wilhelmi M, Schneider SW. Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 2004;64:8924-8931
- Naka T, Boltze C, Kuester D, Schulz TO, Samii A, Herold C, Ostertag H, Roessner A. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-9, cathepsin B, and urokinase plasminogen activator in non-skull base chordoma. *Am J Clin Pathol* 2004;122:926-930
- Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 2004;64:7622-7628
- Drew AF, Blick TJ, Lafleur MA, Tim EL, Robbie MJ, Rice GE, Quinn MA, Thompson EW. Correlation of tumor- and stromal-derived MT1-MMP expression with progression of human ovarian tumors in SCID mice. *Gynecol Oncol* 2004;95:437-448
- Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:7621-7628
- Lin TS, Chiou SH, Wang LS, Huang HH, Chiang SF, Shih AY, Chen YL, Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Chou MC, Kuo SJ, Chow KC. Expression spectra of matrix metalloproteinases in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2004;12:717-723
- Ishibashi Y, Matsumoto T, Niwa M, Suzuki Y, Omura N, Hanyu N, Nakada K, Yanaga K, Yamada K, Ohkawa K, Kawakami M, Urashima M. CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004;101:1994-2000
- Sis B, Sagol O, Kupelioglu A, Sokmen S, Terzi C, Fuzun M, Ozer E, Bishop P. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, cathepsin D, and tenascin-C expression in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract* 2004;200:379-387
- Kerr KM, MacKenzie SJ, Ramasami S, Murray GI, Fyfe N, Chapman AD, Nicolson MC, King G. Expression of Fhit, cell adhesion molecules and matrix metalloproteinases in atypical adenomatous hyperplasia and pulmonary adenocarcinoma. *J Pathol* 2004;203:638-644
- Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology* 2004;63:602-608
- 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 汪爽, 陈建锋. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝细胞癌发生过程中基质金属蛋白酶动态变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:759-762
- Leppa S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:1057-1063
- Koyama S, Maruyama T, Adachi S. Expression of epidermal growth factor receptor and CD44 splicing variants sharing exons 6 and 9 on gastric and esophageal carcinomas: a two-color flow-cytometric analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:47-54
- Böttger TC, Youssef V, Dutkowski P, Maschek H, Brenner W, Junginger T. Expression of CD44 variant proteins in adenocarcinoma of Barrett's esophagus and its relation to prognosis. *Cancer* 1998;83:1074-1080
- 李泽民, 樊剑芳, 方建萍. CD44v6 基因变异体在胃癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊8):21
- Roye GD, Myers RB, Brown D, Poczatek R, Beenken SW, Grizzle WE. CD44 expression in dysplastic epithelium and squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 1996;69:254-258
- Faleiro-Rodrigues C, Lopes C. E-cadherin, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical study. *Pathobiology* 2004;71:329-336
- Bar JK, Grelewski P, Popiela A, Noga L, Rabczynski J. Type IV collagen and CD44v6 expression in benign, malignant primary and metastatic ovarian tumors: correlation with Ki-67 and p53 immunoreactivity. *Gynecol Oncol* 2004;95:23-31
- Vizoso FJ, Fernandez JC, Corte MD, Bongera M, Gava R, Allende MT, Garcia-Muniz JL, Garcia-Moran M. Expression and clinical significance of CD44V5 and CD44V6 in resectable colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:679-686
- Kawano T, Nakamura Y, Yanoma S, Kubota A, Furukawa M, Miyagi Y, Tsukuda M. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004;31:35-41
- Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin, CD44s, and CD44v6 in laryngeal and pharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol* 2003;24:384-389
- Li Y, Zhang JH, Kuang G, Yang JQ, Zhao Q, Wang XL, Jiao ZK, Zhang ZD, Wang LL. Expression of MUC1, CD44v6, nm23 in gastric carcinomas and regional lymph node tissues and their association with invasion, metastasis, and prognosis of the tumor. *Ai Zheng* 2003;22:985-989

胃癌细胞凋亡与增殖的平衡与相关基因的关系

陈金明, 李伟华, 周海波, 冯永东, 王家顿, 谢大兴, 余 源

陈金明, 周海波, 浙江大学医学院附属第二医院外科
浙江省杭州市 310009

李伟华, 福建省立医院外科 福建省福州市 350000

冯永东, 王家顿, 谢大兴, 余源, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030

陈金明, 男, 1969-07-15 生, 新疆维吾尔自治区尼勒科县人, 汉族, 2003 年华中科技大学同济医学院附属同济医院博士, 讲师, 主要从事肿瘤凋亡和增殖方面的研究。

通讯作者: 陈金明, 310009, 浙江省杭州市解放路 88 号, 浙江大学医学院附属第二医院外科, jmcheng.hust.tj@sohu.com

电话: 0571-87783911

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-10

Balance of cell apoptosis and proliferation and its association with related genes in gastric cancer

Jin-Ming Chen, Wei-Hua Li, Hai-Bo Zhou, Yong-Dong Fen, Jia-Dong Wang, Da-Xing Xie, Yuan Yu

Jin-Ming Chen, Hai-Bo Zhou, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China

Wei-Hua Li, Department of Surgery, Fujian Province Hospital, Fuzhou 350000, Fujian Province, China

Yong-Dong Fen, Jia-Dong Wang, Da-Xing Xie, Yuan Yu, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Jin-Ming Chen, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, 88 Jiefang Road, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China. jmcheng.hust.tj@sohu.com

Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-10

Abstract

AIM: To investigate the balance between cell proliferation and apoptosis in gastric cancer and their association with related genes.

METHODS: Sixty-eight surgically resected samples were collected between 2000 and 2001, including 10 normal gastric tissues, 10 para-cancerous tissues, and 48 gastric carcinoma tissues from pathologically confirmed patients (32 males and 16 females, aged 24-74 years with mean age 54.4 years). The patients did not receive chemotherapy or radiotherapy. All of the samples were fixed in 40 g/L formalin, embedded in paraffin, and sliced into 4 μ m-thick sections. The apoptotic cells and proliferative cells were quantitatively analyzed by flow cytometry. Immunohistochemical assay (SP method) was used to detect the expression of survivin, Fas and FasL. The morphology of proliferating cells was identified by confocal microscope.

RESULTS: In the normal, para-cancerous and tumor groups, the ratio of apoptosis and proliferation indexes (AI/PI) were 0.46 ± 0.14 , 0.35 ± 0.12 , and 0.23 ± 0.11 , respectively. The difference was significant ($F = 19.453$, $P < 0.01$). Normal distribution was observed by frequency distribution of AI/PI in gastric carcinoma cells. Tumors exhibited a wide range of AI/PI from 0.05 to 0.46. Overall, the median and mean \pm SD of AI/PI were 0.245 and 0.23 ± 0.11 , respectively. The value of Skewness and Kurtosis were 0.067 and -0.868, respectively. A stepwise decreasing trend in AI/PI was noted in clinicopathological variables, including lymph node metastasis and beyond metastasis ($P < 0.05$ for each). Granular staining was observed in both the cytoplasm and cell membrane of survivin, Fas and FasL positive cells. The expression rates of survivin, Fas and FasL in 48 gastric cancer were 56.2%, 43.8% and 60.4%, respectively. Using the median AI/PI of 0.245, we divided the cells into two groups (greater than and less than the median AI/PI). The expression of survivin and FasL in >0.245 were significantly lower than that of <0.245 . On the contrary, the expression of Fas in >0.245 was significantly higher than that of <0.245 . The high expression of ki-67 in tumor was found by confocal microscope.

CONCLUSION: A stepwise decreasing trend in AI/PI may exist in tumor progression, which might be correlated with the up-regulation of survivin gene and the down-regulation of Fas gene.

Key Words: Apoptosis; Proliferation; Gastric cancer; Survivin; Fas/ FasL gene

Chen JM, Li WH, Zhou HB, Fen YD, Wang JD, Xie DX, Yu Y. Balance of cell apoptosis and proliferation and its association with related genes in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(9):1078- 1081

摘要

目的: 探讨在肿瘤细胞中凋亡与增殖平衡的变化 (apoptotic index/proliferative index, AI/PI) 以及与相关基因的关系。

方法: 取普外科手术切除的标本 68 例, 其中胃正常组 10 例, 癌旁组 10 例, 胃癌标本 48 例。术前均未接受过化疗或放疗。男 32 例, 女 16 例。年龄 24-74 (平均 54.4) 岁。术前内镜活检病检诊断, 术后病理诊断证实。标本均经

中性甲醛(40 g/L)固定, 常规石蜡包埋, 作4 μm 厚连续切片. 应用流式细胞仪, 分别定量分析细胞的凋亡群体和增殖群体; 免疫组化方法检测 survivin, Fas 与 FasL 基因表达的变化; 共聚焦显微镜对细胞增殖进行形态学观察.

结果: 在从胃正常组, 癌旁组到肿瘤组细胞的演进过程中, AI/PI 分别为 0.46 ± 0.14 , 0.35 ± 0.12 , 0.23 ± 0.11 . 胃正常组, 癌旁组和肿瘤组细胞相互之间, 差异有显著性($F = 19.453$, $P = 0.000 < 0.01$). 胃癌细胞的 AI/PI 经频数分布表分析和检验均服从正态分布. 胃癌细胞 AI/PI 范围 0.05–0.46. 中位数和均数 \pm 标准差分别为 0.245 和 0.23 ± 0.11 . Skewness 的值为 0.067, Kurtosis 的值为 -0.868. 胃癌细胞随着恶性进展, AI/PI 总体呈下降的趋势, 与淋巴转移和远处转移相关($P < 0.05$). survivin, Fas 与 FasL 基因表达阳性染色主要定位于肿瘤细胞胞质或胞膜中, 为粗细不一的棕黄色颗粒. 在 48 例胃癌中 survivin, Fas 与 FasL 的阳性表达率分别为 56.2%, 43.8% 和 60.4%. AI/PI 的中位数为 0.245, 将胃癌分为 > 0.245 组和 < 0.245 组. 结果显示相应的两组组织切片中 survivin 阳性表达率增加($\chi^2 = 6.857$, $P < 0.01$), 而 Fas 的阳性表达率降低($\chi^2 = 4.148$, $P < 0.05$) 和 FasL 的阳性表达率增加($\chi^2 = 4.269$, $P < 0.05$). 共聚焦显微镜显示肿瘤组织中 Ki-67 高表达.

结论: AI/PI 总体呈下降的趋势, 可能与 survivin 基因表达上调, Fas 基因表达下调有关.

关键词: 凋亡; 增殖; 胃癌; survivin; Fas/ FasL 基因

陈金明, 李伟华, 周海波, 冯永东, 王家顺, 谢大兴, 余源. 胃癌细胞凋亡与增殖的平衡与相关基因的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13(9): 1078–1081
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1078.asp>

0 引言

在人体的正常组织器官, 特定组织中 AI/PI 维持着动态的平衡状态. 细胞的凋亡与增殖是紧密偶联的, 在高增殖、高分化和更具侵袭性的肿瘤中, 常观察到高的凋亡率. 近年来, 凋亡与增殖和生存状态的关系, 引起人们的密切关注^[1–3]. 凋亡和增殖细胞转换平衡机制的改变将导致组织内环境稳定的紊乱. 失控的增殖和凋亡与各种肿瘤密切相关^[4]. 在幽门螺杆菌引起胃上皮细胞的凋亡研究中发现, 从萎缩性胃炎、肠上皮化生到分化不良的演变中, 细胞凋亡和细胞增殖的平衡机制发生了一系列改变, 但仍能达到新的动态平衡. 而在胃癌中平衡机制被打破^[5]. 我们对胃癌细胞中的凋亡群体与增殖群体同时进行联合分析, 揭示其中发生的凋亡与增殖平衡机制的破坏规律, 并探讨其与相关基因的关系如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2000–09/2001–06 华中科技大学同济医学院

附属同济医院普外科手术切除标本, 其中胃正常组 10 例(同期胃溃疡手术切除标本, 取远离溃疡、临床观察正常的胃黏膜组织), 癌旁组 10 例(取胃癌边缘 5 cm 以内的胃黏膜组织), 胃癌标本 48 例. 胃癌患者术前均未接受过化疗或放疗. 其中男 32 例, 女 16 例. 年龄 24–74 (平均 54.4) 岁. 术前内镜活检病检诊断, 术后病理诊断证实. 标本均经中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 作 4 μm 厚连续切片.

1.2 方法 应用流式细胞仪, 分别定量分析细胞的凋亡群体和增殖群体; 免疫组化方法检测 survivin, Fas 与 FasL 基因表达的变化; 共聚焦显微镜对细胞增殖进行形态学观察.

1.2.1 流式细胞术 手术切除的新鲜标本迅速置于 4℃ 的冷 PBS 液中, 充分清除标本上的坏死组织、黏液和残留血液. 将经过上述处理的标本重新置于清亮的冷 PBS 液中, 用手术刀片轻柔刮削组织直至 PBS 液变混浊, 先用 80 目的尼龙网过滤. 取滤液进一步用 200 目纤维膜过滤, 滤液用 PBS 液洗涤两次 ($800 \text{ r/min} \times 5 \text{ min}$), 弃上清, 细胞用 800 ml/L 的冰乙醇固定, 置于 -20℃ 的冰箱中过夜. 固定细胞用 PBS 洗涤 2 次, 2.5 g/L 的 TritonX-100 处理 5 min, 再用 PBS 洗涤 2 次, 加入用 10 g/L BSA 稀释的鼠抗人 Ki-67mAb (100 μL 含 5×10^5 细胞与 0.25 μg 抗体反应), 在 4℃ 孵育过夜. 次日细胞用 PBS 液洗涤, 加入标有 F-ITC 羊抗鼠 IgG 抗体 (Dako 公司. 用 10 g/L BSA 以 1:40 的比例稀释), 在室温下孵育 30 min, 再次洗涤细胞后, 用 10 mg/L PI 和 1.0 g/L RnaseA 室温避光染色 20 min. 抗体特异性同质对照采用同质特异性抗体鼠抗人 IgG mAb (Dako 公司). 经处理的细胞, 荧光标记成功后, 应用 FACSort 流式细胞仪 (Becton Dickson, 美国) 检测, 经 488 nm 激光激发, 被标记的细胞发射的红色 (PI) 和绿色 (FITC) 荧光同时被 FAC Sort 流式细胞仪的标准透镜接收, 应用 Cellquest 软件 (Becton Dickson, 美国), 对上述所测细胞的双参数荧光强度任一细胞群体的平均荧光强度进行分析. 凋亡群体 (apoptosis population): 应用流式细胞术, 可诱出 Sub G1 峰, 测量凋亡群体. 增殖群体 (proliferation population): Ki-67 可代表大部分增殖细胞, 测 Ki-67 阳性部分.

1.2.2 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学 SP 法. 一抗 survivin 兔抗人多克隆抗体、Fas 兔抗人多克隆抗体、FasL 兔抗人多克隆抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品; SP 试剂盒为美国 Zymed 公司产品, 一抗工作浓度均为 1:50. 实验步骤严格按试剂盒说明书进行. 石蜡切片脱蜡, 以微波枸橼酸盐进行抗原修复, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水, 透明封片, 显微镜下观察, 用已知的阳性切片作为阳性对照, 用磷酸盐

缓冲液代替一抗, 作为阴性对照. 结果判定: 在组织切片中 survivin, Fas, FasL 阳性细胞均表现为胞质或胞膜染为棕黄色. 判定标准: 阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为阴性(-), 阳性细胞数 $>5\%$ 为阳性(+).

1.2.3 共聚焦显微镜观察胃癌细胞增殖的形态学 中性甲醛固定标本, 用LEICA切片机连续制备10 μm 切片. 一抗为鼠抗人Ki-67 mAb, 一抗工作浓度为1:100. 常规免疫组化染色后, 加PI(propidium iodide), 室温避光放置20 min; 经双荧光标记后的组织切片封片后用Confocal (购自Leica公司) 进行扫描, 经488 nm激光激发, 被标记细胞同时发射红色(PI)和绿色(FITC)荧光. 分别被Confocal的不同透镜接收.

统计学处理 采用SPSS11.1统计软件包进行统计学处理. 计量资料采用单因素方差分析, 实验数据以mean \pm SD表示, 当各组均数之间差异有显著性后, 进一步两两比较采用 q 检验. 计数资料采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 胃癌演进过程中 AI/PI 变化规律的研究 胃正常组, 癌旁组到肿瘤组细胞演进过程中, AI/PI 呈逐渐下降的趋势. 胃正常组, 癌旁组和肿瘤组细胞相互之间, 差异有显著性($P<0.01$, 表1).

表1 胃癌演进过程中 AI/PI 变化规律的研究

组别	<i>n</i>	AI/PI(mean \pm SD)
正常组	10	0.46 \pm 0.14 ^b
癌旁组	10	0.35 \pm 0.12 ^b
肿瘤组	48	0.23 \pm 0.11 ^b

^b $P<0.01$.

表2 胃癌细胞 AI/PI 与临床病理的关系

临床病理	<i>n</i>	AI/PI(mean \pm SD)
肿瘤大小		
≤ 4 cm	20	0.25 \pm 0.11
>4 cm	28	0.20 \pm 0.11
分化程度		
高	14	0.27 \pm 0.11
中	18	0.22 \pm 0.09
低	16	0.19 \pm 0.10
浸润		
T1+T2	19	0.26 \pm 0.12
T3+T4	29	0.20 \pm 0.09
淋巴结转移		
N0	12	0.28 \pm 0.12
N1	20	0.23 \pm 0.09
N2-N3	16	0.17 \pm 0.09 ^a
远处转移		
M0	38	0.24 \pm 0.11
M1	10	0.17 \pm 0.07 ^a

^a $P<0.05$.

2.2 胃癌 AI/PI 分布规律与临床病理的关系 胃癌细胞的 AI/PI 经频数分布表分析和检验均服从正态分布. 胃癌细胞 AI/PI 范围0.05-0.46. 中位数和均数 \pm 标准差分别为0.245和0.23 \pm 0.11. Skewness 的值为0.067, Kurtosis 的值为-0.868. 胃癌细胞 AI/PI 与临床病理特征的关系中, AI/PI 在肿瘤的大小、分化程度和浸润深度等病理特征中, AI/PI 呈下降的趋势, 但未见统计学差异. 随着肿瘤细胞的淋巴转移、远处转移, 差异有显著性($P<0.05$, 表2).

2.3 胃癌 AI/PI 与 survivin, Fas 与 FasL 的关系 survivin, Fas 与 FasL 基因表达阳性染色主要定位于肿瘤细胞胞质或胞膜中, 为粗细不一的棕黄色颗粒(图1A-B). 在48例胃癌中 survivin, Fas 与 FasL 的阳性表达率分别为56.2%, 43.8%和60.4%. survivin 蛋白表达阳性的27例癌组织中有15例Fas阳性, 20例FasL阳性. 经Spearman等级相关分析survivin基因与Fas, FasL的表达显著性相关(相关系数分别为 $r = 0.37$ 和 $r = 0.407$, $P<0.01$). 根据AI/PI的中位数值0.245, 将胃癌细胞分为 >0.245 组和 <0.245 组. 结果显示相应的两组组织切片中 survivin 阳性表达率增加($\chi^2 = 6.857$, $P<0.01$), 而Fas的阳性表达率降低($\chi^2 = 4.148$, $P<0.05$)和FasL的阳性表达率增加($\chi^2 = 4.269$, $P<0.05$, 表3).

表3 胃癌细胞 AI/PI 与 survivin, Fas 与 FasL 的关系

AI/PI	<i>n</i>	surviving(+) <i>n</i> (%)	Fas(+) <i>n</i> (%)	FasL(+) <i>n</i> (%)
>0.245	24	9(37.5)	14(58.3)	11(45.8)
<0.245	24	18(75.0) ^b	7(29.2) ^a	18(75.0) ^a

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs >0.245 组.

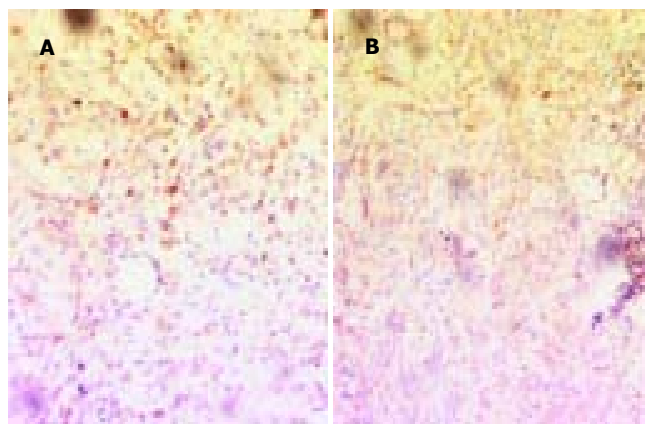


图1 胃癌 survivin, Fas 阳性表达 SP $\times 400$. A: survivin; B: Fas.

另共聚焦显微镜下见肿瘤组织中Ki-67高表达. 由胃腺癌可见, 腺体大小不等, 排列紊乱, 间距减少, 腺体中 Ki-67 高表达(图2).

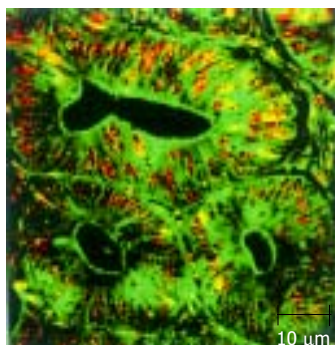


图2 胃癌组织 Ki-67 表达阳性(绿色 FITC)共聚焦显微镜 $\times 1600$.

3 讨论

探讨肿瘤演化进程中细胞凋亡和增殖平衡破坏的机制, 对肿瘤生物学特性的揭示, 具有重要意义. 流式细胞术能迅速而准确地分析大的细胞群体的凋亡率和增殖率. 运用 Sub G1 法分析细胞的凋亡群体, 同时运用双参数法分析 Cyclins 和 DNA 含量或通过增殖相关蛋白区分 G0 期和增殖细胞的方法分析细胞增殖群体^[6-8]. 人类 Ki-67 蛋白的表达严格与细胞增殖有关. Ki-67 核抗原是出现在除 G0 期以外(某些作者认为还包括 G1 早期)所有细胞周期中的特异性非组蛋白, 与细胞合成代谢有关, 是检测细胞增殖的常用和较好的标记物, 但他的功能意义还尚不清楚^[9]. 本结果显示, 胃癌中凋亡的频数分布基本呈降低的趋势, 而增殖却呈逐渐增高的趋势, 二者密切相关. 在肿瘤的临床病理特征中, 随着肿瘤的恶性进展 AI/PI 呈下降的趋势. AI/PI 提示肿瘤细胞群体中净增细胞所占的比例. AI/PI 总体呈下降的趋势表明, 随着肿瘤细胞的恶性进展, 肿瘤细胞群体中净增细胞所占的比例越来越大. 这可能与肿瘤细胞的进化演进中, 由于固定的突变率的存在, 肿瘤细胞逐渐获得异常增殖、减少凋亡、无限复制和易侵犯和转移等能力密切相关. 但是, 肿瘤细胞生长的过程也伴随着一系列潜在的生长抑制的现象, 例如凋亡、分化、衰老、低氧和限制造成细胞的丧失^[4, 10].

特定组织中癌基因诱导的凋亡与增殖平衡的破坏在肿瘤的演化进展中起决定作用^[11]. survivin 是 IAP 家族的一个新成员. 生存素具有强大的抑制细胞凋亡的功能, 能够直接抑制 caspase3 和 caspase7 的活性, 抑制 Fas, Bax, caspase 及多种化疗药物诱导的凋亡, 并在细胞的有丝分裂和胞质分裂中起重要作用^[12-14]. Fas 抗原是细胞膜 I 型跨膜蛋白, FasL 是

Fas 在人体内的天然配体, 为 II 型跨膜蛋白, 他们都属于 TNF 家族. Fas/FasL 结合后可转导凋亡信号, 诱导 Fas 所在细胞的凋亡. 随着肿瘤细胞的恶性进展, 胃癌细胞 AI/PI 的降低可能与肿瘤细胞 survivin 基因表达的上调和 Fas 表达的下调的协同作用有关.

总之, 探讨肿瘤细胞凋亡与增殖的平衡及其与相关基因的关系, 对指导肿瘤的防治具有积极的意义. 如何运用现代分子生物学的手段, 修复和纠正肿瘤相关基因的结构和功能缺陷, 干预肿瘤细胞凋亡与增殖平衡的破坏, 都需进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 Liu S, Edgerton SM, Moore DH 2nd, Thor AD. Measures of cell turnover(proliferation and apoptosis)and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7: 1716-1723
- 2 Michael-Robinson JM, Reid LE, Purdie DM, Biemer-Huttmann AE, Walsh MD, Pandeya N, Simms LA, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Radford-Smith GL. Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:2347-2356
- 3 Stanton KJ, Sidner RA, Miller GA, Cummings OW, Schmidt CM, Howard TJ, Wiebke EA. Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *Am J Surg* 2003;186:486-492
- 4 Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411:342-348
- 5 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection:implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:16-26
- 6 Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:545-550
- 7 Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol* 2001;38: 179-193
- 8 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;218: 314-319
- 9 Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein:from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-322
- 10 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70
- 11 Pelengaris S, Rudolph B, Littlewood T. Action of myc in vivo-proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10: 100-105
- 12 Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002; 21:315-320
- 13 Hay BA. Understanding IAP function and regulation:a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2000;7:1045-1056
- 14 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

原发性肝癌 survivin 基因表达及靶向 survivin 治疗

王颖, 王家驹, 吴亮

王颖, 王家驹, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科
湖北省武汉市 430030
吴亮, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科
湖北省武汉市 430030
通讯作者: 王颖, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. schoolying@sina.com.cn
电话: 027-88237515
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

Expression of survivin gene in hepatocellular carcinoma and survivin gene targeting therapy

Ying Wang, Jia-Long Wang, Liang Wu

Ying Wang, Jia-Long Wang, Department of Gastroenterology, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Liang Wu, Department of Infectious diseases, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Ying Wang, Department of Gastroenterology, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. schoolying@sina.com.cn
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To investigate the role of survivin in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC), and to evaluate the therapeutic effect of antisense oligonucleotide (AS ODN) targeting surviving gene.

METHODS: Forty HCC specimens and their neighboring noncancerous tissues were obtained. Western blot were used to detect survivin protein. Semi-quantitative RT-PCR was used to detect survivin mRNA. TUNEL was employed to examine the apoptosis index (AI). Survivin AS ODN was designed and synthesized. HepG₂ cells were divided into 6 groups: control group, lipofectin group, ODN group, and 200, 400 and 600 nmol/L AS ODN groups. AI was examined by flow cytometry. Rate of inhibition (IR) by chemotherapeutic drugs (5-Fu and DDP) was determined by the colorimetric MTT cell viability/proliferation assay. Orthotopic implant model was developed in BALB/nu/nu nude mouse. Tumor-take nude mice were divided into 3 groups: control group, lipofectin group, and AS ODN group. The size of tumor in situ was examined and the growth index (GI) was calculated.

RESULTS: Survivin protein and mRNA were detected in 2 HCC cell lines and 34 out of 40 patients, but not in nontumor tissues. The positive rate in patients with intrahepatic metastasis was 93.5%, higher than those without intrahepatic metastasis (55.6%, $P<0.05$). The positive rate in the cases with portal vein invasion was 92.8%, higher than those without portal vein invasion (66.7%, $P<0.05$). The levels of survivin mRNA in patients with intrahepatic metastasis (1.105 ± 0.396) or portal vein invasion (1.137 ± 0.404) were significantly higher than those without intrahepatic metastasis (0.572 ± 0.082) or portal vein invasion (0.627 ± 0.122) ($P<0.05$). Survivin expression was significantly associated with reduced apoptosis index ($1.15\pm0.33\%$ vs $4.50\pm0.83\%$, $P<0.05$). Expression of survivin in AS ODN groups was significantly decreased than that in the control group. The AI of AS ODN group was significantly higher than that of other groups. The AI were $10.50\pm0.76\%$, $12.99\pm0.42\%$, and $22.21\pm1.26\%$ ($P<0.05$) in the 200, 400, 600 nmol/L AS ODN group. The IR of chemotherapeutic drugs in AS ODN groups was higher than that of other groups. The IR of 200 nmol/L was $47.7\pm4.6\%$ (5-FU), $59.7\pm3.5\%$ (DDP), 400 nmol/L was $56.8\pm4.0\%$ (5-FU), $68.2\pm2.1\%$ (DDP) and 600 nmol/L was $85.2\pm2.3\%$ (5-FU), $79.9\pm3.7\%$ (DDP) ($P<0.05$). Orthotopic implant model of hepatocellular carcinoma was developed in 23 of 25 nude mice. The GI of AS ODN group was $50.96\pm24.20\%$, higher than that of other groups ($P<0.05$). The AI of AS ODN group was $21.97\pm2.11\%$, higher than those of control and lipofectin groups ($P<0.05$).

CONCLUSION: Survivin may play an important role in HCC carcinogenesis. AS ODN targeting survivin induces apoptosis and sensitizes HCC cells to chemotherapy. In tumor-bearing nude mouse, survivin AS ODN may inhibit the growth of tumor and induce cell apoptosis.

Key Words: Survivin; Hepatocellular carcinoma; Chemotherapy; Antisense oligonucleotide

Wang Y, Wang JL, Wu L. Expression of survivin gene in hepatocellular carcinoma and survivin gene targeting therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1082-1088

摘要

目的: 研究原发性肝癌 survivin 基因表达及治疗靶点作用。

方法: 收集肝癌和癌旁组织 40 例。Western blot 法检测

survivin 蛋白表达, RT-PCR 法检测 survivin mRNA. 原位末端标记法检测组织凋亡指数. 设计合成 survivin 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, AS ODN)转染 hepG₂ 细胞, 设置空白对照组、脂质体组、正义链组和各浓度 AS ODN 组. 流式细胞术检测凋亡指数, MTT 法检测化疗药物对细胞生长抑制率. 建立原位荷肝癌鼠模型并分为 3 组: 反义 survivin 链组、空白对照组及脂质体组. $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积, 以 $V_{\text{治疗后}}/V_{\text{治疗前}} \times 100\%$ 计算生长指数.

结果: 肝癌细胞株和 34/40 例肝癌组织表达 survivin 蛋白及 mRNA, 癌旁组织无 survivin 表达. 肝内转移组(93.5%)和门静脉癌栓组(92.8%)survivin 蛋白表达阳性率显著高于阴性组(55.6%)和无癌栓组(66.7%)($P < 0.05$). 肝内转移组(1.105 ± 0.396)和门静脉癌栓组(1.137 ± 0.404)survivin mRNA 水平显著高于阴性组(0.572 ± 0.082)和无癌栓组(0.627 ± 0.122)($P < 0.05$). Survivin 阳性组织凋亡指数为 $1.15 \pm 0.33\%$, 显著低于阴性组($4.50 \pm 0.83\%$)($P = 0.0002$). AS ODN 组 survivin 表达减弱, 凋亡指数增高, 200 nmol/L 组为 $10.50 \pm 0.76\%$, 400 nmol/L 组为 $12.99 \pm 0.42\%$, 600 nmol/L 组为 $22.21 \pm 1.26\%$, 明显高于对照组($P < 0.05$). 化疗药物对 AS ODN 组生长抑制率增高, 200 nmol/L 组为 $47.7 \pm 4.6\%$ (5-FU)、 $59.7 \pm 3.5\%$ (DDP), 400 nmol/L 组为 $56.8 \pm 4.0\%$ (5-FU)、 $68.2 \pm 2.1\%$ (DDP), 600 nmol/L 组为 $85.2 \pm 2.3\%$ (5-FU)、 $79.9 \pm 3.7\%$ (DDP), 明显高于对照组($P < 0.05$). 23/25 裸鼠成功建立原位荷肝癌动物模型. AS ODN 组肿瘤生长指数为 $51.0 \pm 24.2\%$, 显著低于空白对照组($70.2 \pm 23.4\%$)和脂质体组($168.0 \pm 28.6\%$)($P < 0.05$). AS ODN 组凋亡指数为 $21.97 \pm 2.11\%$, 显著高于空白对照组($3.21 \pm 0.57\%$)和脂质体组($3.07 \pm 0.81\%$)($P < 0.05$).

结论: survivin 在 HCC 发生中有重要作用. survivin AS ODN 转染能下调 survivin 表达, 诱导细胞凋亡, 增加 HCC 细胞对化疗药物敏感性. survivin AS ODN 对荷 HCC 鼠有一定治疗作用.

关键词: Survivin; 肝细胞癌; 化疗; 反义寡核苷酸

王颖, 王家驹, 吴亮. 原发性肝癌 survivin 基因表达及靶向 survivin 治疗. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1082-1088
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1082.asp>

0 引言

细胞凋亡是机体的重要生理过程^[1-4], 细胞凋亡的异常抑制与恶性肿瘤的发生、进展以及耐药性的产生密切相关^[5-10]. IAP(inhibitor of apoptosis proteins, 凋亡抑制蛋白)是一族结构、功能相似的凋亡抑制因子, 在凋亡的负性调控中有重要作用^[11-15]. Survivin 是近年来克隆出的 IAP 家族新成员, 其在正常情况下仅表达于胚胎组织, 在成熟分化的成人组织中表达消失, 但可再表达于多种恶性转化细胞株和恶性肿

瘤组织^[16-18], 目前认为其在恶性肿瘤的发生中有重要作用, 在肿瘤的诊断和治疗上具有一定价值. Survivin 在原发性肝细胞癌中的表达及生物学意义尚不清楚, 我们检测了人 HCC 细胞株和组织标本中 survivin 的表达情况; 并以此为基础合成特异性靶向 survivin 的反义寡核苷酸(survivin AS ODN), 在细胞和动物水平检测其在体外、内的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集 HCC 组织和相应癌旁组织标本 40 例. 所有标本均取自同济医院外科手术切除的肝脏, 均在术后经组织病理学检查证实. 人肝癌细胞株 hepG₂ 和 SMMC-7721 从同济医学院免疫教研室获得, 在含 100 mL/L 牛血清的 DMEM 中培养, 温度为 37℃, CO₂ 浓度为 50 mL/L. 兔抗人 survivin 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品; Gene Jammer 脂质体转染试剂盒为 stratagene 公司产品; ECL 显色试剂盒购自武汉亚法生物工程公司. 合成靶向 survivin mRNA 232-251 序列的反义寡核苷酸链(AS ODN 链), 序列为: 5' CCAGCCTTCCAGCTCCTTG 3', 并同时合成正义链, 均采取全程硫代修饰, AS ODN 链 5' 端以绿色荧光蛋白标记, 均由上海生工公司合成.

1.2 方法 (1)检测 survivin 蛋白表达: 采用 western blot 法提取组织和细胞蛋白质样品, Bradford 法测定浓度, 在 120 g/L SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离后, 电转移法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜. 硝酸纤维素膜在含 50 g/L 脱脂奶粉的 TTBS 缓冲液中 37℃ 封闭 90 min, 依次加入一抗(兔抗人 survivin 抗体, 抗体的稀释度为 1:1 000)4℃ 孵育过夜, 二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 抗体稀释度为 1:1 000)37℃ 作用 40 min, TTBS 充分漂洗(10 min × 3 次)后, 化学荧光法(ECL)显色, 观察结果. (2)RT-PCR 法检测 survivin mRNA 表达: 采用 RT-PCR 法, 上游引物为 5' -GGCATGGGTGCCCCGACGTT-3'; 下游引物为 5' -AGAGGCCTCAATCCATGGCA-3', 以 GAPDH 作为内参照. PCR 反应条件为 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 35 个循环反应. 所得 PCR 产物在含 EB 的 15 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳分离, 在紫外灯下分析结果; 应用分析软件作相对定量分析, 以 survivin mRNA 表达的吸光度值/GAPDH mRNA 表达的吸光度值表示. (3)检测组织标本的凋亡指数: 采用原位末端转移酶标记(TUNEL)法操作步骤按试剂盒说明进行, DAB 显色后, 光学显微镜下分析结果, 以阳性染色细胞数/总细胞数 × 100% 计算凋亡指数(AI). (4)转染细胞凋亡指数: 取对数生长期的 hepG₂ 细胞, 接种于 6 孔板内, 使每孔细胞数为 3×10^5 , 培养 24 h, 细胞融合约 80% 时开始实验. 设置空白对照组、脂质体

转染对照组、正义链转染对照组和不同浓度的反义链转染组即 200、400 和 600 nmol/L AS ODN 转染组, 每组设 3 个复孔. 细胞转染过程按转染试剂盒说明书进行. 收获转染后各组细胞, 制成单细胞悬液, 冰乙醇 -20°C 固定 24 h 后使用; 取固定好的细胞, 碘化丙啶溶液避光染色 30 min 后待用; 采用 Beckon/Dickinson Facssort 型流式细胞仪, 在 488 nm 波长处进行检测. 应用相应程序软件进行资料的处理和分析, 细胞凋亡指数(AI) = 亚二倍峰细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$. (5) 化疗药物对各组细胞的生长抑制率采用 MTT 法, 5-FU 和顺铂(DDP) 浓度根据韩锐(抗癌药物研究与实验技术. 北京: 人民卫生出版社 1997) 设定. 收获转染后各组细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 重悬, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{L}$, 接种于 96 孔板内, 每组细胞均设化疗药物实验孔和空白对照孔. 常规条件下培养 44 h 后, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL ; 继续培养 4 h, 倾尽上清. 每孔加入二甲基亚砜 0.1 mL; 充分溶解后用酶标仪在波长 570 nm 处检测各孔吸光度 A 值, 化疗药物对细胞生长抑制率(IR) = $(1 - \text{化疗药物实验孔 } A / \text{空白对照孔 } A) \times 100\%$. (6) 裸鼠移植瘤: 选用 5 周龄的 BALB/nu/nu 裸鼠 25 只, 均为雄性, 密闭无菌环境下饲养. 收集对数生长期 hepG2 细胞, 制备为浓度 $5 \times 10^{10}/\text{L}$ 的细胞悬液, 以 1 只裸鼠建立皮下移植瘤, 取上述备好的细胞悬液 0.2 mL; 用微量注射器注入到裸鼠颈背部的皮下, 作为供瘤鼠. 当皮下移植瘤长至 1 cm 左右时, 取出肿瘤, 将瘤组织剪切为约 1 mm \times 1 mm \times 2 mm 大小的小瘤块, 用套管针轻柔穿刺并注射入手术开腹的裸鼠肝脏包膜下. 建立模型 2 wk 后, 再次手术开腹, 观察肿瘤生长情况, 并测定肿瘤最大长径(a)和垂直短径(b). 将已证实成功建立模型的动物随机分为 3 组, 即(1)反义 survivin 寡核苷酸治疗组(8 只): ip 脂质体包裹的反义 survivin 寡核苷酸, 剂量 8 ug/kg; (2)空白对照组(8 只): ip 等容积生理盐水; (3)脂质体对照组(7 只): ip 等容积空白脂质体; 均每日 1 次, 共连续 7 d. 治疗结束后, 在第 8 d 处死动物, 以公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积, 以 $V_{\text{治疗后}}/V_{\text{治疗前}} \times 100\%$ 计算肿瘤生长指数. 肿瘤组织的凋亡指数采用流式细胞术检测.

统计学处理 采用 χ^2 检验、 t 检验和方差分析.

2 结果

2.1 Survivin 蛋白表达 hepG₂, SMMC-7721 细胞和 85.0% (34/40) 肝癌组织中 survivin 表达均为阳性, 在 16.5 KD 可见到清晰条带(图 1A-B). 相应 40 例癌旁组织中无 1 例有 survivin 阳性表达(图 2). 肝内转移组

survivin 表达阳性为 93.5%, 显著高于肝内转移阴性组(55.6%, $P = 0.001 < 0.05$); 门静脉癌栓组中 survivin 表达阳性为 92.8%, 显著高于无门静脉癌栓组(66.7%, $P = 0.002 < 0.05$). survivin 的阳性表达在男性(85.7%)与女性患者(80.0%)、年龄大于 60 岁(80.0%)与年龄小于 60 岁患者(86.7%)、肿瘤直径小于 3 cm(87.5%)与肿瘤直径大于 3 cm 患者(83.3%)等组间比较均无显著差异($P = 0.02 > 0.05$). 40 例 HCC 组织平均凋亡指数为 $1.65 \pm 0.36\%$, 其中 34 例 survivin 表达阳性组织的平均凋亡指数为 $1.15 \pm 0.33\%$, 6 例 survivin 表达阴性组织的平均凋亡指数为 $4.50 \pm 0.83\%$, 二者差异显著($P = 0.0002 < 0.05$).

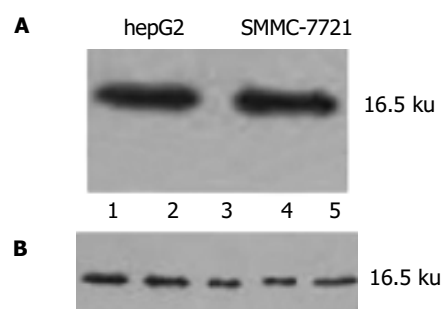


图1 肝癌 survivin 表达(1-5 为 5 例肝癌组织标本). A: 两株肝癌细胞阳性; B: 5 例肝癌组织标本.

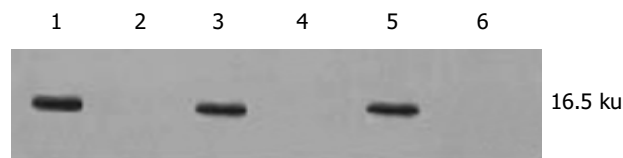


图2 癌旁组织中 survivin 阴性. 1, 3, 5 为肝癌组织, 2, 4, 6 为相应的癌旁组织.

2.2 Survivin mRNA 表达 hepG₂, SMMC-7721 细胞(图 3)和 85.0% (34/40) HCC 组织 survivin mRNA 表达为阳性, 相应的 40 例癌旁组织无 1 例有阳性表达(图 4), 与 Western blot 所检测的 survivin 蛋白水平表达相一致. 并且肝内转移组和门静脉癌栓组中 survivin mRNA 表达显著高于肝内转移阴性组和无门静脉癌栓组($P < 0.05$, 表 1).

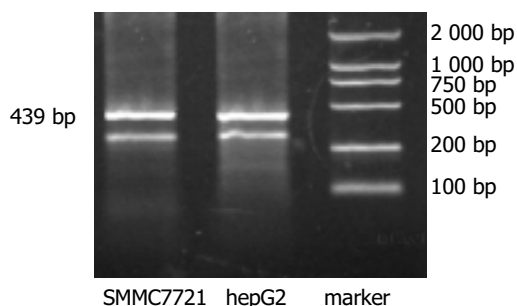


图3 细胞株 survivin mRNA 阳性, 439 bp 处可见清晰条带. 1: Marker; 2, 4: 肝癌组织; 相应癌旁组织.

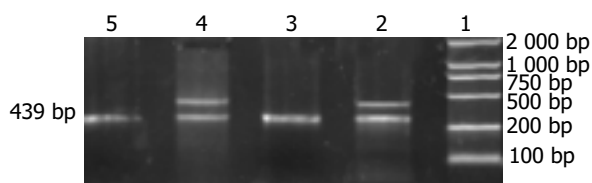


图4 肝癌组织 survivin mRNA 阳性, 癌旁组织阴性. 1: Marker; 2,4: 肝癌组织; 3, 5: 相应癌旁组织.

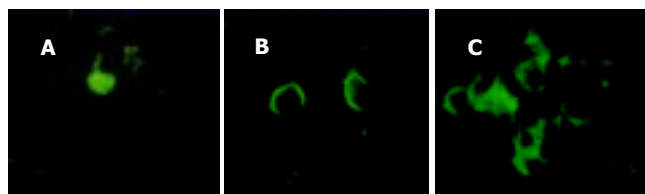


图5 AS ODN 转染的 hepG2 细胞. A: 200 nmol/L AS ODN; B: 400 nmol/L AS ODN; C: 600 nmol/L AS ODN.

2.3 Survivin AS ODN 转染 hepG2 细胞的特征 在各浓度 AS ODN 转染组均可见到转染后细胞内清晰的绿色荧光(图 5A-C). 各浓度 AS ODN 转染组 survivin 蛋白表达有不同程度下调, 以 600 nmol/L 浓度组最明显, 在各对照组内 survivin 蛋白表达无明显改变(图 6). 各浓度 AS ODN 转染组 hepG2 细胞形态有不同程度改变, 表现为细胞体积变小、形态不规则、细胞皱缩、核固缩、胞质粗糙、分裂相少见等改变, 而在各对照组中细胞形态基本正常, 贴壁生长良好(图 7A-B). 各 AS ODN 转染组细胞凋亡指数明显高于各对照组 ($P < 0.05$), 以 600 nmol/L 浓度 AS ODN 转染时凋亡诱导最明显 ($P < 0.05$), 各对照组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$, 表 2). 等浓度化疗药物 5-FU 和 DDP 对各浓度 AS ODN 转染的 hepG2 细胞生长抑制率明显高于各对照组, 但在各对照组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$, 表 2).

2.4 移植瘤的研究 hepG2 细胞接种于裸鼠皮下后, 可见皮下移植瘤逐渐增大, 约 2 wk 后其大小可达到 0.8-1.0 cm 左右. 移植术后 2 wk 上腹部可扪及明显的质地较硬结节. 开腹检查时可见 23/25 例裸鼠的肝脏有明显移植瘤形成, 模型建立的成功率为 92.0%.

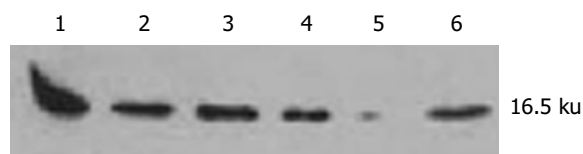


图6 AS ODN 转染组 survivin 表达下调. 1: 空白对照组; 2: 脂质体对照组; 3: 200 nmol/L AS ODN 组; 4: 400 nmol/L AS ODN 组; 5: 600 nmol/L AS ODN 组; 6: ODN 对照组.

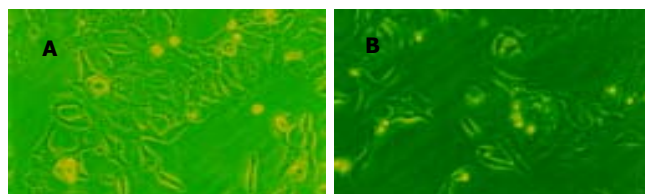


图7 AS ODN 转染后 hepG2 细胞形态. A: 空白对照组; B: 600 nmol/L AS ODN 转染组.

瘤块呈现出不规则结节状, 色灰白, 与周围肝组织分界较清晰, 质硬, 荷瘤鼠瘤结节平均体积为 $20.85 \pm 2.13 \text{ mm}^3$ (图 8A-B). 反义 survivin 寡核苷酸治疗组与空白对照组和脂质体对照组相比, 其肿瘤生长指数显著降低, 生长明显受抑 ($P < 0.05$, 表 3) (图 9A-F). 而在心、肺、肾组织中未见明显的异常(图 10A-C). Survivin AS ODN 治疗组瘤组织凋亡指数显著高于空白对照组和脂质体对照组 ($P < 0.05$).

3 讨论

HCC 临床进展快, 转移早, 预后差^[19-20], 生存期短^[21], 早期诊断尚存在着困难^[22-25], 传统临床治疗的中远期疗效均不理想^[26-28]. Survivin 是近年来发现的 IAP 家族新成员, 其在包括胃肠道^[29]、神经系统^[30]、血液系统^[31]在内的多种组织来源的恶性肿瘤中都具有选择性表达的特性. 我们的研究显示 hepG2 细胞和 85% 的 HCC 组织中 survivin 蛋白和 mRNA 表达为阳性, 并且其在蛋白和 mRNA 水平的表达是完全一致的, 而相应的癌旁组织无 1 例有 survivin 阳性表达, 提示 survivin 基因在 HCC 组织有选择性表达的特性, 其基因转录的异常启动可能是 survivin 再表达的关键机制. 进一步

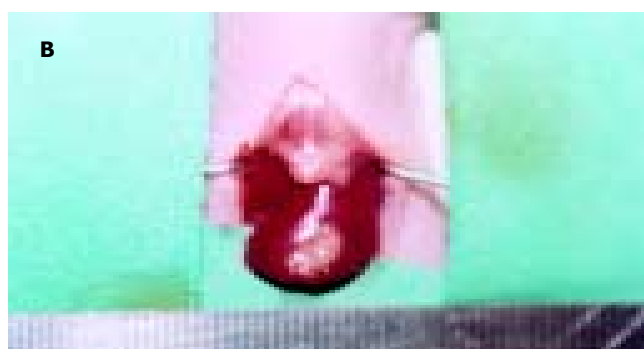


图8 原位移植瘤. A: 移植时原位肿瘤; B: 移植 2 wk 后的原位肿瘤.

表1 Survivin mRNA的表达与HCC肝内转移和门静脉癌栓的关系

HCC		n	survivin mRNA表达
肝内转移	阳性	31	1.105±0.396 ^a
	阴性	9	0.572±0.082
门静脉癌栓	有	28	1.137±0.404 ^b
	无	12	0.627±0.122

^a $P=0.000\ 001<0.05$ vs 肝内转移阴性组; ^b $P=0.000\ 002<0.05$ vs 无门静脉癌栓组。

分析 survivin 表达与 HCC 各临床病理学参数的关系,发现 survivin 表达与肿瘤患者的性别、年龄,肿瘤大小等无显著关系, survivin 的表达在 HCC 发生的早期即可出现,可能是 HCC 发生中的早期事件,这与在结肠癌、胰腺癌等中的研究报道是一致的^[32-33]。但 survivin 表达与肝内转移和门静脉癌栓形成明显相关,对 survivin mRNA 表达做半定量分析显示肝内转移和门静脉癌栓组中 survivin mRNA 表达水平是显著

表2 AS ODN 转染对细胞凋亡的影响生长抑制率

hepG2细胞分组	细胞凋亡指数(AI%)	生长抑制率(IR%)	
		5-FU	DDP
空白对照组	6.04±0.59	37.1±7.0	33.5±6.6
脂质体转染对照组	6.16±0.44	36.1±6.0	34.2±5.7
正义链转染对照组	5.72±0.65	35.8±4.6	33.7±7.0
200 nmol/L AS ODN组	10.50±0.76 ^a	47.7±4.6 ^a	59.7±3.5 ^a
400 nmol/L AS ODN组	12.99±0.42 ^a	56.8±7.0 ^a	68.2±2.1 ^a
600 nmol/L AS ODN组	22.21±1.26 ^{a, c}	85.2±2.3 ^a	79.9±3.7 ^a

^a $P<0.05$ vs 对照组; ^c $P<0.05$ vs 200 nmol/L 和 400 nmol/L AS ODN 组。

高于无肝内转移和门静脉癌栓组,这提示 survivin 表达与 HCC 的恶性生物学行为有关, survivin 持续表达可能进一步参与恶性肿瘤的临床进展。

目前对于 survivin 参与肿瘤发生、发展的机制并不完全清楚,可能涉及到细胞凋亡、增生等多个

表3 各组移植肿瘤的生长、凋亡指数

动物分组	n	原位肿瘤的体积(mm ³)		生长指数 %V _{治疗后} /V _{治疗前}	凋亡指数(AI%)
		V _{治疗前}	V _{治疗后}		
空白对照组	8	21.05±1.63	35.56±3.29	170.2±23.4	3.21±0.57
脂质体对照组	7	20.71±2.79	35.36±2.77	168.0±28.6	3.07±0.81
AS ODN 治疗组	8	20.78±2.20	10.38±4.27	51.0±24.2 ^a	21.97±2.11 ^a

^a $P=0.00\ 001<0.05$ vs 对照组。

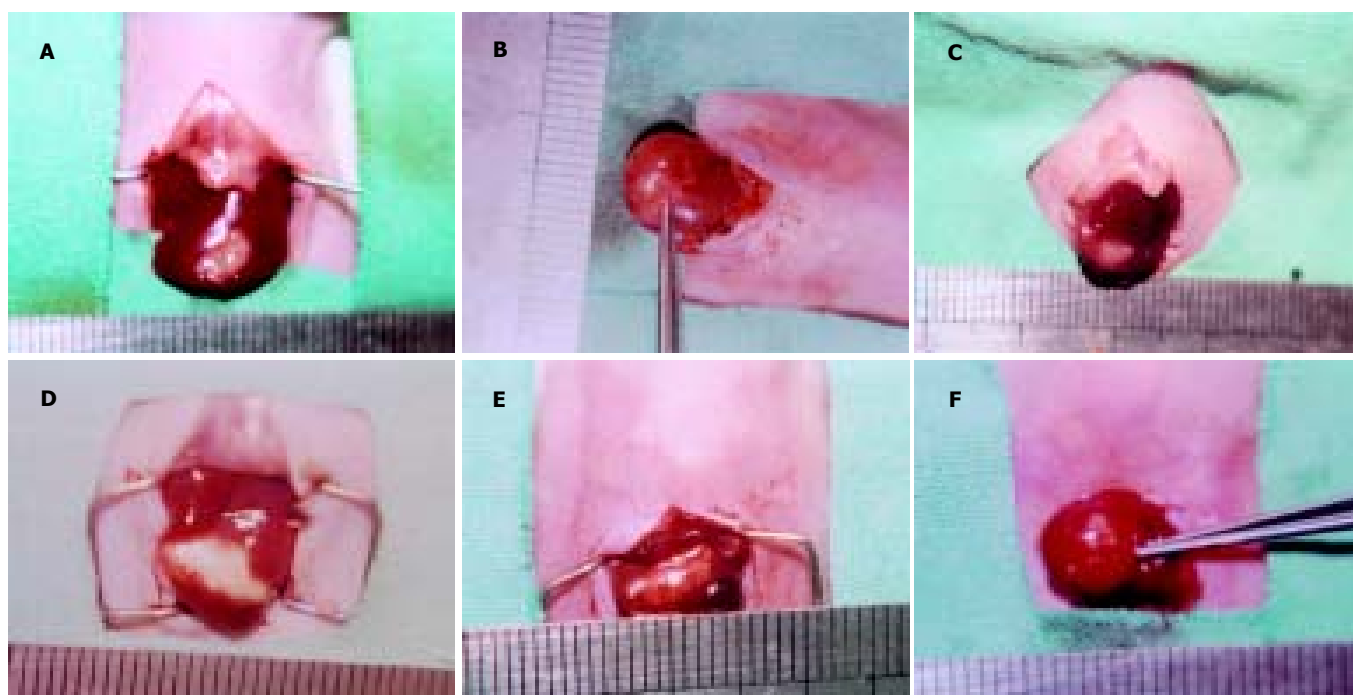


图9 AS ODN 组肿瘤生长受抑。A: 空白对照组治疗前; B: 空白对照组治疗后; C: 脂质体对照组治疗前; D: 脂质体对照组治疗后; E: AS ODN 组治疗前; F: AS ODN 组治疗后。



图10 心、肺、肾组织中未见明显的异常。

方面, 本文结果显示, survivin 表达阳性 HCC 组织凋亡指数显著低于 survivin 表达阴性组织, 提示 survivin 表达可抑制 HCC 细胞凋亡, 这可能是其参与 HCC 发生的机制之一。反义寡核苷酸是一类能够以 Watson-Crick 碱基配对原则与特定的靶 mRNA 互补结合的小分子量的, 可扩散的寡核苷酸序列, 多为人工合成, 它能够从翻译水平, 转录和核酸复制水平高度特异地抑制靶基因的翻译和表达, 选择性地关闭特定的靶基因, 因其具有精确的选择性和高度的特异性, 而成为一项有价值的研究工具和治疗恶性肿瘤的重要的策略。我们在证实了肝细胞癌中 survivin 具有选择性表达特性的基础上, 以 survivin 作为靶点合成高特异性的反义寡核苷酸序列, 将其转染至 survivin 表达阳性的人 HCC 细胞株 hepG2, 我们发现 survivin AS ODN 转染可抑制细胞 survivin 表达, 诱导凋亡, 以 600 nmol/L AS ODN 转染作用最为显著。这与国外研究所报道的在皮肤癌、乳腺癌细胞株中转染 survivin 阴性突变质粒所诱导的细胞凋亡作用是相符的^[34-35], 提示采用基因技术封闭 survivin 表达, 可以解除 survivin 的凋亡抑制作用, 诱导肿瘤细胞凋亡。

我们还发现 AS ODN 转染后的 HCC 细胞对化疗药物 5-FU 和 DDP 的敏感性明显增加, 提示 survivin 表达所引起的 HCC 细胞凋亡机制缺陷, 在一定程度上参与 HCC 细胞化疗耐药性的产生, 而 AS ODN 转染能封闭 survivin 表达, 在一定程度上逆转细胞耐药性。我们还建立了原位荷 HCC 裸鼠模型, 以脂质体作为载体将 survivin AS ODNip 作为治疗手段, 结果显示 AS ODN 治疗组与空白对照组和脂质体对照组相比肿瘤生长明显缓慢, 生长指数显著降低。进一步采用流式细胞术对肿瘤组织的凋亡指数进行检测, 我们发现 AS ODN 治疗组中肿瘤组织的凋亡指数显著高于空白对照组和脂质体对照组, 这表明采用 survivin AS ODNip 可有效诱导 HCC 细胞凋亡, 抑制肿瘤生长而达到治疗目的。本实验中对心、肺以及肾脏等肝外器官组织的观察未见到明显异常改变, 表明 survivin AS ODNip 治疗较为安全。

总之, survivin 基因在 HCC 中具有选择性表达的特性, 其表达与 HCC 的恶性生物学行为及凋亡抑制密切相关; survivin 反义寡核苷酸可在体外诱导 HCC 细胞凋亡, 增加细胞对化疗药物的敏感性, 在体内可抑制荷 HCC 鼠肿瘤的生长, 诱导细胞凋亡, survivin 可作为 HCC 诊断和治疗的有效靶点。

4 参考文献

- Guo F, Sigua C, Tao J, Bali P, George P, Li Y, Wittmann S, Moscinski L, Atadja P, Bhalla K. Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res* 2004;64:2580-2589
- 李均, 汪维伟. 消化管发育中上皮细胞凋亡研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:1606-1608
- 於亮亮, 于皆平, 罗和生, 于红刚. 核因子- κ B 与细胞凋亡关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:1628-1631
- 刘丽娜. 细胞凋亡的分子机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:422-423
- 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11:526-530
- 张卫卫. 细胞凋亡与消化系统疾病. *世界华人消化杂志* 2002;10:422
- 王炳元. 细胞凋亡与肝癌. *世界华人消化杂志* 2002;10:425-427
- Zhou HB, Zhu JR. Paclitaxel induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:442-445
- Chen XP, He SQ, Wang HP, Zhao YZ, Zhang WG. Expression of TNF-related apoptosis-inducing Ligand receptors and antitumor tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing Ligand in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2433-2440
- Fu YG, Qu YJ, Wu KC, Zhai HH, Liu ZG, Fan DM. Apoptosis-inducing effect of recombinant Caspase-3 expressed by constructed eukaryotic vector on gastric cancer cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2003;9:1935-1939
- Gupta S. A role of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in increased lymphocyte apoptosis in aged humans. *Mech Ageing Dev* 2004;125:99-101
- Lotocki G, Keane RW. Inhibitors of apoptosis proteins in injury and disease. *IUBMB Life* 2002;54:231-240
- Martin SJ. Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destruction. *Cell* 2002;109:793-796
- Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401-410
- Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002;7:163-166
- 林连捷, 郑长青. Survivin 与肿瘤. *世界华人消化杂志* 2003;11:2027-2029
- Chang Q, Liu ZR, Wang DY, Kumar M, Chen YB, Qin RY. Survivin expression induced by doxorubicin in

- cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:415-418
- 18 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- 19 宁晓燕, 杨冬华. 原发性肝癌的体内基因治疗研究与进展. 世界华人消化杂志 2000;8:89-90
- 20 黄鼎智, 吴英德, 宋向群, 胡晓桦, 康平. 125I 碘油栓塞照射联合体外局部放射治疗肝癌. 世界华人消化杂志 2001;9:1198-1201
- 21 罗运权, 王义, 陈汉, 吴孟超. 术前肝动脉化疗栓塞对可切除肝癌患者术后生存率的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:468-469
- 22 周康荣, 严福华. 中国微小肝癌的影像学诊断. 世界华人消化杂志 2001;9:733-736
- 23 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 陈建锋, 汪爽. Batimastat 对大鼠原发性肝癌生长侵袭转移的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:546-549
- 24 程天霞. 良性肝病者血清 AFP 升高的临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11:877-879
- 25 蒋业贵, 李兆申. 生物芯片技术及其在消化系统疾病研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:1609-1613
- 26 汤钊猷. 肝癌外科治疗的进展. 世界华人消化杂志 2003;11:249-254
- 27 黄正明, 杨新波, 田文辉. 肝癌的药物疗法. 世界华人消化杂志 2002;10:958-959
- 28 凌昌全, 陈喆, 朱德增, 俞超芹, 黄雪强, 翟笑枫, 万旭英, 李瑾, 陈坚, 沈峰, 杨广顺, 吴孟超. 中西医结合治疗中晚期原发性肝癌 313 例. 世界华人消化杂志 2001;9:114-115
- 29 Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001;91:2026-2032
- 30 Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000;19:617-623
- 31 Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I, Dan K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk Res* 2000;24:965-970
- 32 Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001;62:8664-8667
- 33 Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is volved in the development of human pancreatic duct cell tumor. *Cancer* 2001;92:271-278
- 34 Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001;108:991-999
- 35 Grossman D, Kim PJ, Blanc-Brude OP, Brash DE, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and co-operates with loss of P53. *J Clin Invest* 2001;108:981-990

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次).
编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇. 出版: 科学出版社. 定价: 28 元 + 2 元(邮费). 邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号. 联系人: 刘俐, 程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921. 开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)

人肝癌组织 α -L-岩藻糖苷酶的提取和鉴定

李超, 林菊生, 陈孝平, 易继林, 陶璐薇

李超, 林菊生, 陶璐薇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030

陈孝平, 易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科 湖北省武汉市 430030

李超, 男, 1978-04-13 生, 湖北省丹江口市人, 汉族, 2003 年华中科技大学同济医学院硕士生, 研究方向为肝脏病学。

国家 863 计划课题项目, No. 2002AA2Z2011

通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所。linjusheng2001@163.com

电话: 027-83662578

收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-22

Purification and characterization of α -L-fucosidase from human hepatocellular carcinoma tissue

Chao Li, Ju-Sheng Lin, Xiao-Ping Chen, Ji-Lin Yi, Lu-Wei Tao

Chao Li, Ju-Sheng Lin, Lu-Wei Tao, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Xiao-Ping Chen, Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by the National Key Science and Technology Project 863, No.2002AA2Z2011

Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. linjusheng2001@163.com

Received: 2005-03-01 Accepted: 2005-03-22

Abstract

AIM: To purify and characterize α -L-fucosidase (AFU, EC3.2.1.51) from human hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Ion exchange chromatography on CM-52 and ultrafiltration were used to separate AFU from crude extract of liver cancer tissue. SDS-PAGE was performed to determine the molecular weight of the subunit of AFU. Bradford method was used to measure protein concentration. 4-methylumbelliferyl- α -L-fucopyranoside (4-MUF) was used as a fluorescent substrate to quantify the purified AFU activity in each step. Standard curve of known product of enzyme-substrate reaction was drawn.

RESULTS: Human HCC AFU was purified by 74-fold to apparent homogeneity with 15% yield. SDS-PAGE indicated the presence of one subunit of M_r 55 000. Specific activity of AFU in pooled fraction by chromatography was 10 085 μ kat/g.

CONCLUSION: AFU in human HCC tissue can be purified through ion exchange chromatography, which can be used as an immunogen to generate specific antibody against human hepatocellular carcinoma.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; α -L-fucosidase; Ion exchange chromatography

Li C, Lin JS, Chen XP, Yi JL, Tao LW. Purification and characterization of α -L-fucosidase from human hepatocellular carcinoma tissue. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(9):1089-1093

摘要

目的: 提取人肝癌组织的 α -L-岩藻糖苷酶(α -L-fucosidase, AFU)经纯化和鉴定后, 为制备特异性多克隆抗体提供纯化的抗原。

方法: 运用超滤和离子交换层析等方法提取、纯化人肝癌组织的 AFU, 并经 SDS-PAGE 检测蛋白纯度及相对分子量。根据荧光底物 4-甲基微型酮- α -L-岩藻糖苷(4-methylumbelliferyl- α -L-fucopyranoside, 4-MU-fucoside)和纯化的蛋白在特定条件下反应生成产物 4-甲基微型酮(4-methylumbelliferone, 4-MU)的量来检测酶活性。检测蛋白浓度用 Bradford 方法。

结果: 提纯并纯化的 AFU 经 SDS-PAGE 鉴定有一个亚单位 M_r 55 000。经过一系列纯化步骤后, 肝癌组织的 AFU 可得到 74 倍纯化, 15% 收率。

结论: 肝癌组织的 AFU 可通过离子交换层析法提取和纯化并可用于制备抗体。

关键词: 肝癌; α -L-岩藻糖苷酶; 离子交换层析法

李超, 林菊生, 陈孝平, 易继林, 陶璐薇. 人肝癌组织 α -L-岩藻糖苷酶的提取和鉴定. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1089-1093
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1089.asp>

0 引言

最早在岩藻糖苷酶缺乏症中发现由于 α -L-岩藻糖苷酶缺失可导致岩藻糖苷贮积^[1], 后来发现此酶对某些恶性肿瘤如肝癌^[2-6]、卵巢癌^[9]、结肠癌^[10-11, 29]的诊断颇具一定临床价值。目前临床上可作为甲胎蛋白阴性肝癌患者血清学诊断辅助指标。我们首次采用离子交换层析方法提取人肝癌组织中 AFU 并鉴定其活

性和纯度,为进一步实验打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 从外科手术室获取人肝癌组织经病理活检为原发性肝细胞癌,去除脂肪和结缔组织后,切成小块分装在冻存盒内加入200 mL/L甘油保存在 -70°C 冰箱待用。检测酶活性所需的底物和标准产物购自Sigma公司,检测仪器为F-4500日立荧光光度计。脱盐所用超滤管购自美国Millipore公司。层析柱规格 $2.6\text{ cm} \times 30\text{ cm}$ 购自上海锦华层析设备厂。层析所需的CM-52树脂购自Whatman公司。使用Pharmacia Biotech Gene Quant 仪器检测层析收集液 A_{280} 吸光度值。

1.2 方法 根据参考文献[24]修改而成。 -70°C 冰箱中取出肝癌组织,去除附着脂肪和结缔组织后称取25 g,在冰上用眼科剪和镊子剪碎,在聚丙烯烧杯中按质量/体积(m/V)1:10用冷的50 mmol/L醋酸钠溶液(pH 5.0),240 mL与组织混匀。用20 mL玻璃匀浆器在冰上人工匀浆,充分研磨。收集匀浆液。破细胞:将匀浆液 37°C 水浴中加热1 h,释放酶。匀浆液pH用冰醋酸迅速调至5.0后, 60°C 水浴中加热10 min,在冰浴上冷却至室温。 0°C 高速离心17 000 g,30 min,弃沉淀。上清pH用7.5 mol/L NH_4OH 调至5.0。离心后上清收集于一聚丙烯烧杯中,测得220 mL。查表 0°C 硫酸铵饱和度从0-35%需加入194 g/L固体硫酸铵,缓缓加入42.68 g,边加边轻轻搅拌, 4°C 静置4 h。然后 0°C ,15 500 g,离心30 min,弃沉淀后收集上清,测得232 mL。 0°C 硫酸铵沉淀饱和度从35-50%需加入87 g/L固体硫酸铵,缓缓加入20.18 g,边加边轻轻搅拌, 4°C 静置20 h。 0°C ,15 500 g,离心30 min,沉淀溶于4 mL的0.1 mol/L柠檬酸钠,pH5.0,0.2 g/L NaN_3 , -20°C 保存。上清收集于一聚丙烯烧杯中,测得227 mL。查表 0°C 硫酸铵饱和度从50-60%需加入60 g/L固体硫酸铵,缓缓加入13.62 g,边加边轻轻搅拌, 4°C 静置20 h。然后 0°C ,15 500 g,离心30 min,沉淀溶于2 mL的0.1 mol/L柠檬酸钠,pH5.0,0.2 g/L NaN_3 , -20°C 保存。以上每步离心前后均留取一小等分用于测定蛋白浓度和酶活性。称量70 g CM-52,用初始平衡缓冲液0.011 mol/L柠檬酸-氢氧化钠溶液,pH 4.5,0.2 g/L NaN_3 ,按质量/体积(m/V)1:10混合,搅拌均匀,充分溶胀。用玻棒将混合好的树脂浆引流入层析柱,静置使其完全沉淀到柱下部,吸掉上清,继续加入混合液,重复上述步骤直至树脂全部加入层析柱内。用样品缓冲液平衡层析柱,当流出液体积达750 mL,下端流出液pH与样品缓冲液pH相等即达到平衡目的。使用Millipore超滤离心管(1.5 mL,截流 M_r 10 000)。将35-50%和

50-60%饱和硫酸铵沉淀后组分分别装入超滤管,离心条件5 480 r/min, 4°C ,9 min。收集35-50%上端液体3 mL,50-60%上端液体1 mL分别稀释在初始平衡缓冲液里,从上端加入层析柱内,关闭上下流出端使样品在树脂中平衡约30 min。用0.05,0.10,0.15,0.25 mol/L NaCl缓冲液进行分步洗脱,收集洗脱液,并测定 A_{280} 值及酶活性。合并收集含有目的蛋白的洗脱液。用Bradford法试剂盒测定蛋白浓度,按照使用说明进行操作。酶的活性为: 37°C 每秒生成1 μmol 产物所需酶量为1 μkat 。

参考文献[30]建立标准产物的标准曲线:不同标准产物浓度的标准溶液50,100,150,200 nmol。

参考文献[7,20]修改建立酶活性检测反应体系:0.2 mol/L柠檬酸,pH5.0,150 μL ,样品30 μL ,底物液20 μL , 37°C 水浴30 min,加入0.2 mol/L K_2CO_3 4 mL,pH10.0终止反应。检测酶活性时的激发波长为365 nm,释放波长为460 nm。同时设置空白管,不加样品,其他反应条件不变。

相对分子质量及蛋白纯度测定:SDS-PAGE变性-聚丙烯酰胺凝胶电泳所用试剂均用去离子水按照《蛋白质技术手册》(汪家政,科学技术出版社,2002)配制而成。Bio-Rad Mini Protean-III 电泳系统。分离胶8-10%,堆积胶5%,80V堆积胶,120V分离胶。考马斯亮蓝染色,脱色。

2 结果

2.1 纯化人肝癌组织AFU 采用阳离子交换层析法,经过饱和硫酸铵沉淀和超滤离心脱盐后的35-50%组分及50-60%组分分别得到纯化。35-50%组分经过层析柱洗脱后依次测定收集管内的洗脱液 A_{280} 值,发现当用0.1 mol/L NaCl缓冲液洗脱时,第24-28管内的

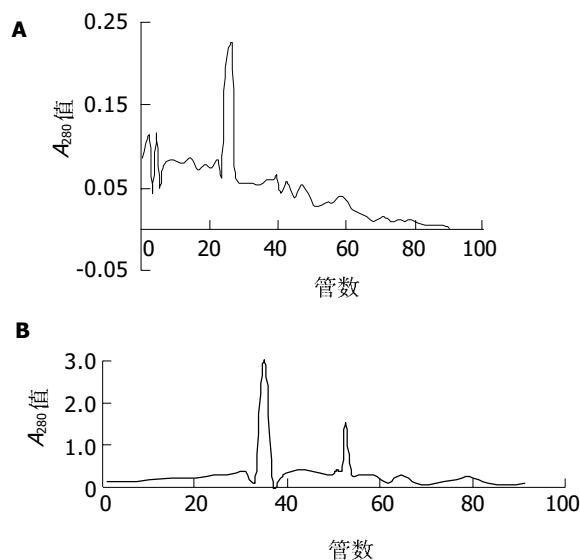


图1 不同组分经CM-52层析柱纯化。A: 35-50%; B: 50-60%。

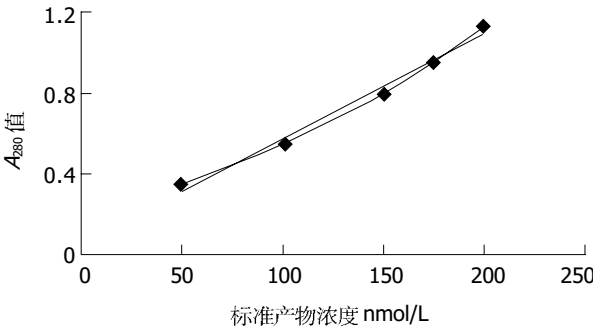


图2 反应产物浓度的标准曲线.实线用 Microsoft excel 生成 A 值曲线,散点实测 A 值曲线.

收集液出现一个明显的洗脱峰,并经电泳证实其纯度,为一条 M_r 55 000 的亚单位,蛋白浓度约 25 mg/L (图 1A, 图 3-带 1). 50-60% 组分经过层析柱洗脱后依次测定收集管内的洗脱液 A_{280} 值,发现当用 0.1 mol/L NaCl 缓冲液洗脱时,第 33-37 管内的收集液出现一个明显的洗脱高峰,蛋白浓度约 180 mg/L,经测定活性证实有大量杂蛋白被洗脱.当用 0.15 mol/L NaCl 缓冲液洗脱时,第 52-54 管内的收集液出现一个相对较低的洗脱峰,并经电泳证实其纯度,为一条 M_r 55 000 的亚单位,蛋白浓度约 90 mg/L. 合并含有洗脱峰的收集液,总蛋白量为 1.82 mg (图 1B, 图 3-带 7). 纯化过程中对每一步的总蛋白,总活力、比活力、纯化倍数以及收得率进行比较发现:随着纯化步骤的深入,总蛋白和总活力呈逐步下降的趋势,而比活力和纯化倍数则逐步升高,收得率有一定的波动,表明杂蛋白含量逐步减少,目的蛋白逐步得到纯化 (表 1, 图 3). 超滤离心后组分包括 35-50% 组分和 50-60% 组分,与层析后合并的收集液对比可以看出前者的杂蛋白含量较高,分别为 22.00 mg, 5.60 mg, 比活力则分别为 2 122 μ kat/g, 1 221 μ kat/g, 在电泳图中表现为杂蛋白条带较多 (表 1, 图 3-带 2, 带 5). 电泳图中高速离心后的上清中几乎未见蛋白,表明饱和硫酸铵沉淀这一步浓缩,分离蛋白的效果较为理想 (图 3-带 6). 层析后合并的收集液内总蛋白仅为 1.82 mg, 其比活力却为 10 085 μ kat/g, 纯化倍数为 74, 表明此纯化方案具有一定的可行性 (表 1).

表1 离子交换层析法纯化人肝癌组织 AFU

步骤	总蛋白 /mg	总活力 / μ kat	比活力 /(μ kat/g)	纯化倍数	收得率 (%)
37℃孵育后匀浆	878.40	120 024	137		
35-50% 组分	126.55	95 352	753	5	79
50-60% 组分	46.55	16 420	353	3	14
超滤离心后组分					
35-50% 组分	22.00	46 676	2 122	16	39
50-60% 组分	5.60	6 835	1 221	9	6
CM-52 层析收液	1.82	18 354	10 085	74	15

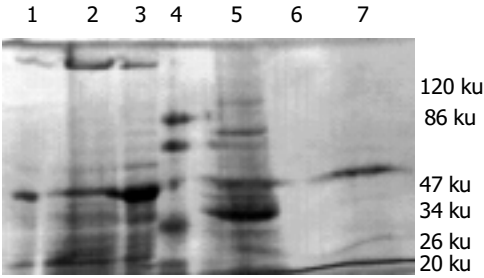


图3 SDS-PAGE 电泳图. 1: 层析收集液(35-50% 组分); 2: 超滤后 50-60% 硫酸铵组分; 3: 匀浆后样品(离心前); 4: 蛋白 Marker; 5: 超滤后 35-50% 硫酸铵组分; 6: 离心后上清; 7: 层析收集液(50-60% 组分).

2.2 建立反应标准产物的浓度曲线 发现标准产物浓度在 50-200 nmol/L 之间, 其对应的 A_{280} 值可近似为线性关系, 与 Microsoft excel 生成的趋势线接近一致 (图 2).

3 讨论

AFU (E. C. 3. 2. 1. 51) 是一种岩藻糖聚合物, 可水解岩藻糖苷成为水和 L-岩藻糖. 正常情况下在肝脏中含量很低, 疾病状态下由肝细胞释放入血液中, 导致血清中的活性升高, 目前导致此酶升高的确切机制尚不清楚, 可能是伴随肿瘤细胞中 AFP 出现, AFU 合成和分泌增加并引起岩藻糖胺含量的转换^[4], 因为血清 AFU 水平被认为与 AFU 表型的种族差异性也有关系^[5]. 然而有研究认为, 与非肝癌组织相比, 一些肝癌组织中 AFU 水平明显降低^[6]. 人 AFU 相关基础研究仅限于在胎盘^[7], 血清^[4, 8-12], 脾^[13], 细胞表面 (造血细胞, 上皮细胞, 间叶细胞)^[14], 脑^[15] 等方面, 在肝脏方面多是关于岩藻糖苷酶缺乏症患者及正常肝脏的研究^[14, 16-21], 而对于肝癌患者 AFU 的研究目前尚无报道. 我们采用离子交换层析方法提取人肝癌组织 AFU 并鉴定其纯度, 为下一步制备特异性抗体打下基础. 在检测所有样本中 AFU 活性之前, 必须建立体外测定 AFU 的最优条件^[10]. AFU 在 pH 3.5-7.0 之间显示高活性水平, 这与报道的 AFU 在人血清中最佳 pH 值一致. 我们采用 pH 5.0 缓冲液作为体外检测条件, AFU 活性在 4℃ 体外控制和 37℃ 孵育条件中均可在此 pH 值时保持稳定.

样品溶液上柱前首先要通过离心分离或者用0.45 μm 孔径滤纸过滤成为无色澄清溶液. 溶解蛋白的样品缓冲液离子强度最好低于50 mmol/L. 层析过程中主要有两大难点: (1) 酶在低于离子强度0.05时不稳定. (2) AFU在pH值5-7范围以外活性不稳定, 因此在实验中有必要严格将层析pH值控制在5.0-6.0之间达到AFU的最佳复性条件. 尽管柱反应对条件改变相当敏感, 但当摸索到合适条件时, 层析分步解离的方法简单且具有重复性^[24]. 有人认为人肝AFU是一种由4个相同亚基构成的四聚体^[16], SDS-PAGE显示仅有一条 M_r 50 000亚单位. 而一些研究文献报道^[28-29] AFU经过SDS-PAGE可有两条带, 两个亚基 M_r 大约51 000和56 000, 均为糖基化, 而且仅56 000亚单位含有唾液酸残基. 纯化后精浆AFU仅出现含有多种酸性异构体的唾液酸化56 000亚单位, 精子AFU则仅见含有中性异构体的51 000亚单位^[31-32]. 有人发现人结肠组织AFU经Western blot显示有两条带, 59 000和50 000^[29]. 在本实验中AFU经过SDS-PAGE有一条带, M_r 55 000. 人不同组织AFU虽然在免疫化学方面的差别尽管有多肽链上的差异, 但可能主要与酶的各种翻译后修饰活动有关^[22]. SDS-PAGE可分离出1-2条相距很近的50 000-60 000蛋白条带. 而有人用淀粉凝胶电泳和等电聚焦方法发现AFU可有5-6条带, 二者之间关系尚不明确, 有人提出条带数量与AFU中所含的唾液酸残基含量有关^[8]. 每步纯化后的目的蛋白比活性逐步升高, 最终可达到10 085 $\mu\text{kat/g}$, 用DEAE阴离子交换层析柱分离人胎盘AFU得到的比活性3 534 $\mu\text{kat/g}$ ^[7], 分离大鼠附睾AFU比活性213 $\mu\text{kat/g}$ ^[26], 表明这一分离方案是切实可行的.

由于本实验中纯化得到的AFU量较少, 限制了进一步进行酶动力学, 底物特异性以及最适pH方面的研究, 因此关键是寻找如何制备大量具有生物活性AFU的途径. 有研究报道^[23], 将带有人AFU全长序列的cDNA插入到原核表达载体pGEX-2T, 经IPTG诱导后在大肠杆菌细胞内可检测到高表达的GST融合蛋白. 然而GST-AFU蛋白多以包涵体的形式存在, 一些优化表达可溶性蛋白的尝试也不甚理想. 总之, 获取纯化的人肝癌组织AFU有助于制备特异性抗体以用于建立高灵敏度的临床诊断方法, 本实验为下一阶段的抗体制备打下基础.

致谢: 感谢华中科技大学同济医学院免疫学系朱慧芬老师在实验过程中给予的技术支持.

4 参考文献

- Seo HC, Willems PJ, Kretz KA, Martin BM, O'Brien JS. Fucosidosis: four new mutations and a new polymorphism. *Hum Mol Genet* 1993;2:423-429
- Giardina MG, Matarazzo M, Varriale A, Morante R, Napoli MD, Martino R. Serum alpha-L-fucosidase. A useful marker in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1992;70:1044-1048
- Giardina MG, Matarazzo M, Morante R, Lucariello A, Varriale A, Guardasole V, De Marco G. Serum alpha-L-fucosidase activity and early detection of hepatocellular carcinoma: a prospective study of patients with cirrhosis. *Cancer* 1998;83:2468-2474
- Deugnier Y, David V, Brissot P, Mabo P, Delamaire D, Messner M, Bourel M, Legall JY. Serum alpha-L-fucosidase: A new marker for the diagnosis of primary hepatic carcinoma? *Hepatology* 1984;4:889-892
- Bukvfer S, Stass PM, Kew MC, de Beer M, Groeneveld HT. Alpha-L-fucosidase as a serum marker of hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *Br J Cancer* 1989;59:417-420
- Leray G, Deugnier Y, Jouanolle AM, Lehry D, Bretagne JF, Campion JP, Brissot P, Le Treut A. Biochemical aspects of alpha-L-fucosidase in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1989;9:249-252
- Di Matteo G, Orfeo MA, Romeo G. Human alpha-L-fucosidase purification and properties. *Biochim Biophys Acta* 1976;429:527-537
- Alhadeff JA, Janowky AJ. Human serum alpha-L-fucosidase. *Clin Chim Acta* 1978;82:133-140
- Abdel-Aleem H, Ahmed A, Sabra AM, Zakhari M, Soliman M, Hamed H. Serum alpha-L-fucosidase enzyme activity in ovarian and other female genital tract tumors. *Int J Gynecol Obstetrics* 1996;55:273-279
- Ayude D, Fernández-Rodríguez J, Rodríguez-Berrocal FJ, Martínez-Zorzano VS, de Carlos A, Gil E, de la Cadena MP. Value of the serum alpha-L-fucosidase activity in the diagnosis of colorectal cancer. *Oncology* 2000;59:310-316
- Ayude D, de la Cadena MP, Martínez-Zorzano VS, Fernández-Briera A, Rodríguez-Berrocal FJ. Preoperative serum alpha-L-fucosidase activity as a prognostic marker in colorectal cancer. *Oncology* 2003;64:36-45
- DiCioccio RA, Barlow JJ, Matta KL. Substrate specificity and other properties of α -L-fucosidase from human serum. *J Biol Chem* 1982;257:714-718
- Chien SF, Dawson G. Purification and properties of two forms of human alpha-L-fucosidase. *Biochim Biophys Acta* 1980;614:476-488
- Cordero OJ, Merino A, Paez de la Cadena M, Bugia B, Nogueira M, Vinuela JE, Martinez-Zorzano VS, de Carlos A, Rodriguez-Berrocal FJ. Cell surface human alpha-L-fucosidase. *Eur J Biochem* 2001;268:3321-3331
- Hopfer RL, Johnson SW, Masserini M, Giuliani A, Alhadeff JA. Hydrolysis of fucosyl-GM1 ganglioside by purified pellet-associated human brain and human liver alpha-L-fucosidases without activator proteins or detergents. *Biochem J* 1990;266:491-496
- Alhadeff JA, Miller AL, Wenaas H, Vedvick T, O'Brien JS. Human liver alpha-L-fucosidase. purification, characterization, and immunochemical studies. *J Biol Chem* 1975;250:7106-7113
- Robinson D, Thorpe R. Human liver alpha-L-fucosidase. *Clin Chim Acta* 1973;47:403-407
- Wiederschain GY, Kolibaba LG, Rosenfeld EL. Human α -L-fucosidase. *Clin Chim Acta* 1973;46:305-310
- Robinson D, Thorpe R. Affinity chromatography of human liver α -L-fucosidase. *FEBS Lett* 1974;45:191-193
- Alhadeff JA, Miller AL, Wenger DA, O'Brien JS. Electrophoretic forms of human liver α -L-fucosidase and their relationships to fucosidosis (mucopolysaccharidosis F). *Clin Chim Acta* 1974;57:307-313
- Thorpe R, Robinson D. Isoelectric focusing of isoenzymes of human liver α -L-fucosidase. *FEBS Letters* 1975;54:89-92
- Alhadeff JA. Structure and function of mammalian alpha-L-fucosidase. *Trends Comparative Biochem Physiol* 1998;4:105-118

- 23 de Carlos A, Montenegro D, Alonso- Rodriguez A, Paez de la Cadena M, Rodriguez-Berrocal FJ, Martinez-Zorzano VS. Purification of human α -L-fucosidase precursor expressed in *Escherichia coli* as a glutathione S-transferase fusion protein. *J Chromatography* 2003;786:7-15
- 24 Carlsen RB, Pierce JG. Purification and properties of an α -L-fucosidase from rat epididymis. *J Biol Chem* 1972;247:23-32
- 25 Wang JJ, Cao EH. Rapid kinetic rate assay of the serum α -L-fucosidase in patients with hepatocellular carcinoma by using a novel substrate. *Clin Chim Acta* 2004;347:103-109
- 26 Opheim DJ, Touster O. The purification and characterization of rat liver lysosomal α -L-fucosidase. *J Biol Chem* 1977;252:739-743
- 27 杨庆华, 孙宏训. α -L-岩藻糖苷酶的研究进展. 国外医学消化分册 1989;3:8-12
- 28 Johnson SW, Piesecki S, Wang RF, Damjanov I, Alhadeff JA. Analysis of purified human liver α -L-fucosidase by western-blotting with lectins and polyclonal and monoclonal antibodies. *Biochem J* 1992;282(Pt 3):829-834
- 29 Fernández J, Rodriguez-Berrocal FJ, de Carlos A, de Castro G, de la Cadena MP. Nonradioactive immunoquantification of α -L-fucosidase protein in human colon tissues. *J Biochem Biophys Methods* 1996;31:39-47
- 30 A TD-700 Laboratory Fluorometer Method for b-Galactosidase. Turner Biosystems, Inc. Available from:URL: <http://www.turnerdesigns.com/>
- 31 Khunsook S, Alhadeff JA, Bean BS. Purification and characterization of human seminal plasma α -L-fucosidase. *Mol Hum Reprod* 2002;8:221-227
- 32 Khunsook S, Bean BS, McGowan SR, Alhadeff JA. Purification and characterization of plasma membrane-associated human sperm α -L-fucosidase. *Biol Reprod* 2003;68:709-716

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版)。本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”。该书定于2004-07由北京大学出版社出版。

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新一版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况。本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种。本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目。该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书。

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究。(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)

病毒性肝炎肝组织 TNF- α 和 NF- κ BmRNA 的表达与肝细胞凋亡

袁淑芳, 单鑫, 张跃新, 刘存

袁淑芳, 单鑫, 新疆医科大学第五附属医院消化科
新疆维吾尔自治区 830011

张跃新, 新疆医科大学肝病专科医院 新疆维吾尔自治区 830054

刘存, 新疆医科大学病理教研室 新疆维吾尔自治区 830054

袁淑芳, 女, 1972-06-20 生, 四川省简阳县人, 汉族, 1995 年河北医科大学临床医学系毕业, 2004 年新疆医科大学硕士研究生毕业, 医师, 主要从事肝脏疾病的病理研究。

通讯作者: 袁淑芳, 830011, 新疆维吾尔自治区, 新疆医科大学第五附属医院消化科。

电话: 0991-8273145

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-16

Expression of TNF- α antigen and NF- κ BmRNA in liver tissue and its effect on hepatocyte apoptosis

Shu-Fang Yuan, Xin Shan, Yue-Xin Zhang, Cun Liu

Shu-Fang Yuan, Xin Shan, Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yue-Xin Zhang, Hospital for Liver Disease, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Cun Liu, Department of Pathology, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Shu-Fang Yuan, Department of Gastroenterology, the fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China.

Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-16

Abstract

AIM: To explore the expression of TNF- α antigen and NF- κ BmRNA in liver tissues of hepatitis patients and its effect on hepatocyte apoptosis.

METHODS: Sixty-five paraffin sections from patients with viral hepatitis were studied, while ten cases of normal liver tissues were selected as control. Immunohistochemistry was employed to determine the expression of TNF- α antigen. NF- κ BmRNA was measured by *in situ* hybridization. Apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL).

RESULTS: The expression of TNF- α antigen and NF- κ BmRNA in patients with viral hepatitis were 76.9% and 70.3% respectively, which were significantly increased as compared with those (20.0% and 10.0%) in control ($P < 0.01$). The expression of TNF- α antigen, NF- κ BmRNA were significantly correlated with the apoptosis of hepatocytes ($r_s =$

0.267 and $r_s = 0.362$, $P < 0.05$). There was also a significant relationship between TNF- α antigen and NF- κ BmRNA expression in liver tissue of hepatitis ($r_s = 0.385$, $P < 0.05$). With the development of viral hepatitis, the expression of NF- κ BmRNA was markedly increased ($P < 0.05$).

CONCLUSION: TNF- α antigen and NF- κ BmRNA are positively related to the occurrence, development of viral hepatitis as well as hepatocyte apoptosis.

Key Words: Viral hepatitis; TNF- α ; NF- κ BmRNA; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization; Apoptosis

Yuan SF, Shan X, Zhang YX, Liu C. Expression of TNF- α antigen and NF- κ BmRNA in liver tissue and its effect on hepatocyte apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1094-1097

摘要

目的: 检测 TNF- α , NF- κ BmRNA 在病毒性肝炎中的表达以及与肝细胞凋亡的关系。

方法: 采用免疫组织化学方法、原位杂交技术以及原位末端标记技术(TUNEL 实验)检测 65 例病毒性肝炎患者和 10 例非肝病对照者肝组织中 TNF- α , NF- κ BmRNA 的表达和肝细胞凋亡的情况。

结果: 病毒性肝炎患者肝组织中 TNF- α , NF- κ BmRNA 阳性表达率分别为 76.9% 和 70.3%, 明显高于对照组的 20.0% 和 10.0% ($P < 0.01$); TNF- α 和 NF- κ BmRNA 的表达与肝细胞凋亡密切相关 ($r_s = 0.267$ 和 $r_s = 0.362$, $P < 0.05$); 病毒性肝炎患者肝组织中 TNF- α , NF- κ BmRNA 的表达存在明显的相关性 ($r_s = 0.385$, $P < 0.05$)。随着慢性肝炎病理损伤的程度的加重, NF- κ BmRNA 的阳性表达率增高 ($P < 0.05$)。

结论: TNF- α , NF- κ BmRNA 的表达在病毒性肝炎的发病及肝细胞凋亡的发生中存在相关性。TNF- α , NF- κ BmRNA 的表达随着病变程度的加重而增高。

关键词: 病毒性肝炎; TNF- α ; NF- κ BmRNA; 免疫组织化学方法; 原位杂交技术; 凋亡

袁淑芳, 单鑫, 张跃新, 刘存. 病毒性肝炎肝组织 TNF- α 和 NF- κ BmRNA 的表达与肝细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1094-1097
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1094.asp>

0 引言

病毒性肝炎是我国肝硬化最常见的病因, 主要为乙型、丙型或乙型加丁型重叠感染。其中 HBV 感染, 不仅可引起急性、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌 (HCC) 的发生、发展密切相关。全世界大约有 20 亿人感染过 HBV, 其中约 4 亿人为 HBV 携带者。全球每年约有 100 万人死于 HBV 感染相关疾病, 占疾病死因的第 9 位^[1-3]。我国病毒性肝炎的发病居世界首位, 现有 HBV 患者 3 000 万。由于肝炎病毒、细胞分子、凋亡相关基因、自身免疫等多种因素参与, 至今病毒性肝炎的治疗仍是当今世界面临的一个难题。近年来研究证实肝纤维化可以逆转, 但目前尚缺乏高效、无明显副作用的药物。目前的热点和难点是彻底弄清激活肝细胞变化的调控机制, 而凋亡作为一种可能的调控机制日益受到重视。我们研究 TNF- α , NF- κ B mRNA 在病毒性肝炎中的表达与肝组织炎症活动度、肝纤维化、肝细胞凋亡的情况, 来寻找一种抑制肝纤维化向肝硬变转变的新措施, 为临床肝病的诊断及治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 乙型肝炎 58 例, 丙型肝炎 7 例。男 34 例, 女 31 例, 年龄 13~59 (平均 34.1) 岁。汉族 45 例, 维族 19 例。血清学证实 HBsAg 或抗-HCV 阳性, 并采用免疫组化检测肝组织中病毒标志物。取非肝脏疾病死亡的正常肝组织 10 例作对照。肝活检标本均常规用 40 g/L 中性甲醛固定, 石蜡包埋。兔抗人多克隆抗体 TNF- α , NF- κ B 原位杂交检测试剂盒均购自博士德生物工程有限公司, 细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 方法 石蜡切片常规脱蜡、水化后, 过氧化物酶阻断、孵育, 加 TNF- α 多克隆抗体 (工作浓度分别 1:80), 再加生物素标记的第 2 抗体及链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液, 室温孵育, 经 DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片。石蜡切片常规脱蜡至水, 过氧化物酶阻断, 加胃蛋白酶消化液暴露核酸片段 30 min, 余按 NF- κ B mRNA 原位杂交检测试剂盒说明书逐步进行。石蜡切片常规脱蜡、水化后, PBS 漂

洗, 3 ml/L H₂O₂ 甲醇封闭内源性过氧化物酶活性, 加通透性液 (1 g/L TritonX-100 溶解于 0.1% 柠檬酸钠) 和 TUNEL 反应混合液、Converter POD, DAB 显色, 显微镜下观察肝细胞凋亡。阳性对照为 1 例已知阳性的重型肝炎肝组织。阴性对照: 用正常肝组织按以上方法分别检测 TNF- α , NF- κ B mRNA 和细胞凋亡。并用缓冲液分别代替 TNF- α 多克隆抗体, NF- κ B mRNA 探针及 TDT (末端脱氧核酸转移酶) 进行对照检测。TNF- α 阳性结果为细胞膜和 (或) 细胞质内出现棕黄色颗粒。NF- κ B mRNA 阳性结果为细胞核内出现棕黄色颗粒。原位凋亡的阳性细胞为细胞核内出现棕黄色颗粒。

统计学处理 采用 SPSS11.0 统计分析软件进行 χ^2 检验、四格表确切概率法、Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 肝组织中 TNF- α , NF- κ B mRNA 检测 在 10 例正常肝组织中 TNF- α , NF- κ B mRNA 仅有少量的表达, 而在病毒性肝炎组织中的阳性表达率均明显高于正常肝组织 ($P < 0.01$, 表 1)。TNF- α 在肝细胞核及细胞质均有不同程度的表达, 呈弥漫型、灶型、片簇状分布于肝小叶内, 少部分在胆管上皮细胞内表达, 不少尚伴炎细胞浸润和肝细胞坏死。NF- κ B mRNA 活化后在细胞核表达, 阳性细胞主要在肝小叶内、汇管区, 呈点状分布。连续切片发现部分病例 TNF- α , NF- κ B mRNA 在肝细胞同一区域表达, 这些部位的肝细胞损害多较重。但 TNF- α 阳性肝细胞分布比 NF- κ B mRNA 阳性肝细胞分布更广泛、弥漫、阳性程度稍强 (图 1, 2)。

表 1 病毒性肝炎肝组织中 TNF- α , NF- κ B mRNA 的表达 n (%)

肝组织学	n	TNF- α 阳性		NF- κ B mRNA 阳性	
		n	%	n	%
慢性肝炎	65	50	76.9 ^b	46	70.3 ^b
正常肝	10	2	20.0	1	10.0

^b $P < 0.01$ vs 正常肝。

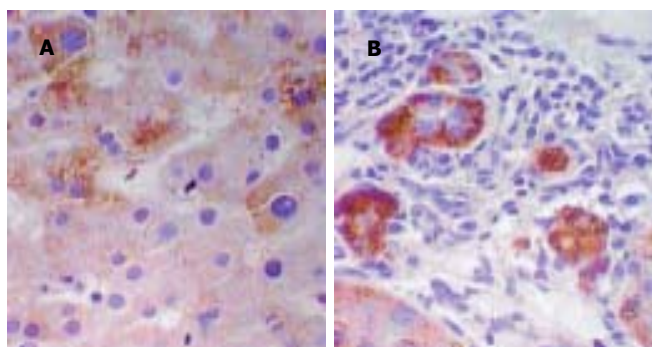


图 1 TNF- α 在肝组织中的表达 (SP $\times 400$)。A: 正常; B: 慢性肝炎。

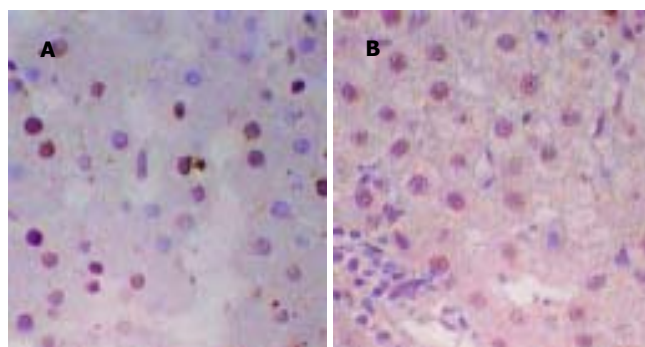


图 2 NF- κ B mRNA 在肝组织中的表达 (原位杂交 $\times 400$)。A: 正常; B: 慢性肝炎。

表2 TNF- α 、NF- κ BmRNA 表达与肝细胞凋亡的关系

TUNEL	n	TNF- α 阳性 ¹				NF- κ BmRNA 阳性 ²			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
-	22	9	2	7	4	10	4	2	6
+	15	1	3	5	6	4	4	5	0
++	16	2	1	6	7	5	5	5	4
+++	12	3	0	4	5	0	0	5	7
合计	65	15	6	22	22	19	13	17	17

¹ $r_s = 0.267$, ^a $P < 0.05$; ² $r_s = 0.362$, ^c $P < 0.05$.

2.2 肝细胞凋亡与 TNF- α 、NF- κ BmRNA 表达的关系如表 2 TNF- α 、NF- κ BmRNA 表达均与肝细胞凋亡密切相关(^a $P < 0.05$). 在 43 例肝细胞凋亡患者中, 同时伴单纯 TNF- α 、NF- κ BmRNA 阳性者分别为 37 例(86.0%)、34 例(79.1%). 在正常的肝组织中可见少量发生凋亡的细胞. 各种不同类型肝炎肝细胞均有不同程度凋亡. 凋亡的细胞表现为胞膜完整、核改变, 见核固缩及染色质边聚. 凋亡细胞多位于坏死区周边, 变性坏死区内可见凋亡小体, 凋亡小体也呈阳性着色, 肝小叶内也有散在分布(图 3).

表3 TNF- α 、NF- κ BmRNA 的表达与炎症和纤维化的关系(n, %)

		<i>n</i>	TNF-α 阳性		NF-κBmRNA 阳性 ^a	
			<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
炎症:	G ₁	42	29	69.0	24	54.8
	G ₂	21	19	90.5	20	95.2
	G ₃	2	2	100	2	100
纤维化: S ₀	S ₀	38	25	65.8	20	50.5
	S ₁	16	14	87.5	15	93.4
	S ₂	3	3	100	3	100
	S ₃	4	4	100	4	100
	S ₄	4	4	100	4	100

^a $P < 0.05$.

2.3 TNF- α 、NF- κ BmRNA 表达程度与炎症、纤维化的关系 如表3所示: TNF- α 的阳性表达程度随着炎症活

动度、肝纤维化程度的加重而增高, 并与炎症坏死区和纤维化分布区域相一致, 但经统计分析无显著差异. NF- κ BmRNA 表达程度随炎症活动度、纤维化程度的加重而增高, 经统计分析各组之间有显著差异($P < 0.05$). 2.4 TNF- α 、NF- κ BmRNA 在病毒性肝炎中的表达关系 TNF- α 、NF- κ BmRNA 之间均有明显的相关性($P < 0.05$, 表 4).

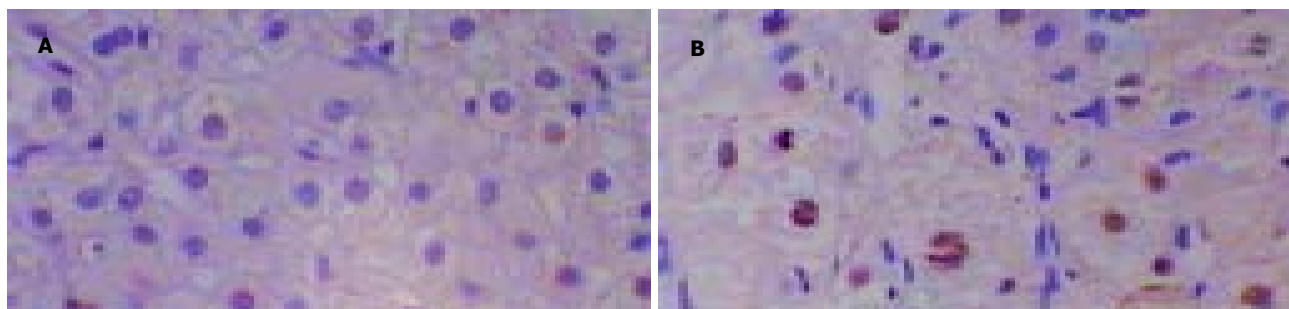
表4 TNF- α 、NF- κ BmRNA 在病毒性肝炎中的表达关系

NF- κ BmRNA 表达	TNF- α 表达情况		合计
	阳性	阴性	
阳性	39	7	46
阴性	11	8	19
合计	50	15	65

$P < 0.05$.

3 讨论

TNF- α 是由单核巨噬细胞产生的内源性细胞因子, 其生物学效应是通过其受体 TNFR1 而产生^[4], 其产生的信号传导途径有 2 条^[5]: (1) 是 fas 相关蛋白死亡域(FADD)介导的细胞凋亡; (2) 通过 TNF 受体相关死亡域-TNF 受体相关因子(TRAF2)激活核转录因子 NF- κ B 抑制凋亡, TNFR2 则通过不同于 TNFR1 但在某些环节可发生交叉反应的信号传导途径激活 NF- κ B, 使细胞

图3 肝凋亡细胞 TUNEL $\times 400$. A: 正常肝组织; B: 慢性肝炎.

增殖分化^[6]. 本结果显示, 在病毒性肝炎肝组织中, TNF- α , NF- κ B mRNA 的表达明显高于正常肝组织, 且表达程度随炎症活动度、肝纤维化程度加重而增高, 尤其在汇管区周围、肝小叶内碎屑、桥接、灶状坏死区更明显, 这与张启华 *et al*^[7] 的发现一致. 我们还发现, TNF- α , NF- κ B mRNA 在组织炎症、坏死区域分布基本一致, 这些部位的肝细胞损害多较重, 并且二者的表达呈显著相关性. 提示慢性肝病中由于多种炎症因子的诱导作用, 使 NF- κ B 的活性持续存在, 且在肝炎病毒等因素的诱导下, TNF- α 与其相应的配体结合后, 在诱发细胞凋亡的同时激活细胞内 NF- κ B, 从而参与肝脏的急慢性炎症或纤维化过程. 本研究显示: TNF- α 的表达虽与炎症活动度、纤维化程度无统计学意义, 却反映出了表达的特点, 说明 TNF- α 可作为急性期反应因子参与病毒性肝炎免疫病理及炎症过程, 直接造成肝损伤, 在肝纤维化的发生、发展中占重要地位.

在病毒感染所造成的肝损害机制中, 肝细胞的异常凋亡是主要机制之一. 本资料显示, 在肝细胞凋亡较强的部位多有 TNF- α , NF- κ B mRNA 的表达, 且随肝细胞凋亡表达的增高而增加. 经原位凋亡检测发现, 凋亡细胞多位于坏死区周边, 变性坏死区内可见凋亡小体, 肝小叶内也有散在的分布, 并有大量炎细胞浸润. 并且病变早期以肝细胞凋亡为主, 病程中后期肝细胞凋亡和坏死共存. 说明肝细胞凋亡发生时常伴有肝细胞坏死, 二者均可以引起肝损伤. 正常情况下凋亡细胞的清除不伴随炎症反应. 本资料显示, 在慢性肝炎的肝组织中, 肝细胞炎症活动度越强, 凋亡细胞也越多. 提示炎症反应和凋亡并不是孤立的, 说明如果凋亡足够抗拒被清除的过程, 肝细胞凋亡可激发炎症和/或坏死. Leist *et al*^[8-9] 认为 TNF- α 诱导肝细胞凋亡可能是肝组织损伤的重要启动因素, 当大量凋亡的肝细胞不能为吞噬细胞清除时, 中性粒细胞受到内源性递质 TNF- α 的吸引而移动至肝脏, 并受到没有被迅速清除的凋亡细胞的激活, 中性粒细胞的激活可能是引起肝细胞坏死的最后过程. 另一方面可能是由于 TNF- α 介导的肝细胞凋亡尚有其他因素影响, 如 NF- κ B 因子等. 但 TNF- α 如何启动对细胞凋亡的促进或抑制的机制尚不清楚.

在转基因动物模型的研究中发现, TNF- α 可抑制 HBV DNA 的复制和核心蛋白的表达, 诱导肝细胞凋亡, 用抗 TNF- α 单抗可以阻断其凋亡^[10]. Lang *et al*^[11-12] 研究 TNF- α 对已激活的 HSC 可产生凋亡诱导, 此作用能被下游效应物 NF- κ B 所阻断. 加强 TNF- α 介导的 HSC 细胞凋亡机制的研究, 阻断 TNF- α 诱导的凋亡信号

的传导, 可防止肝细胞凋亡和坏死, 有助于指导未来抗纤维化的治疗方案.

目前认为 NF- κ B 主要通过以下三条途径来抑制细胞凋亡: (1) NF- κ B 通过调控 IL-6、IL-8、TNF- α 这些炎症因子的基因表达而间接抑制自身及其他细胞凋亡; (2) NF- κ B^[13] 通过诱导或上调抗凋亡基因抑制凋亡. Wang *et al*^[14] 发现 NF- κ B 能够激活 Bcl-2 家族中的 A1/Bfl1 而抑制由 TNF- α 引起的细胞凋亡. 其机制主要是 NF- κ B 作用于 Caspase-3 和线粒体的上游, 并能阻止细胞色素 C 从线粒体中释放. 细胞色素 C 是 Caspase-3 激活的促发因素, 是凋亡调控中的关键环节; (3) NF- κ B 通过诱导 TRAF 和 IAP 抑制凋亡^[15]. 依据 NF- κ B 抑制凋亡的理论并以之作为靶点, 导入其抑制性基因 IKBs, 通过抑制 NF- κ B 活性而增加 HSC 凋亡, 将成为今后病毒性肝炎、肝纤维化治疗的新途径.

4 参考文献

- 1 施红, 王福生. 影响 HBV 感染慢性化的宿主因素及其在乙型肝炎防治中的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:66-69
- 2 McMahon BJ, Bulkow L, Harpster A, Snowball M, Lanier A, Sacco F, Dunaway E, Williams J. Screening for hepatocellular carcinoma in Alaska natives infected with chronic hepatitis B: a 16-year population-based study. *Hepatology* 2000;32(4 Pt 1):842-846
- 3 Pisani P, Parkin DM, Bary F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *INT J Cancer* 1999;83:18-29
- 4 赵明才, 唐恩洁, 朱道银. 与病毒感染相关的细胞凋亡分子. 国外医学病毒学分册 2001;8:25-29
- 5 刘小芳, 邹声泉. 丙肝病毒感染与细胞凋亡. 国外医学外科学分册 2001;28:193-194
- 6 梁卫江, 张万岱. 肿瘤坏死因子诱导细胞凋亡的信号传导机制. 世界华人消化杂志 2000;8:329-331
- 7 张启华, 许正锯, 程莉. 病毒性乙型肝炎患者血清 sFAS、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的检测及临床意义. 细胞与分子免疫学杂志 2001;17:445-446
- 8 Leist M, Gantner F, Bohlinger I. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis liver failure in experimental murine shock models. *Am J pathol* 1995;146:1220-1234
- 9 藏国庆, 周霞秋, 王朝夫, 姚敏, 俞红, 谢青. 肿瘤坏死因子- α 介导凋亡肝细胞内胱蛋白酶-3 的表达. 中华传染病杂志 2001;19:232-235
- 10 甘华山, 陈友琴. 细胞凋亡与病毒性肝炎. 世界华人消化杂志 2001;9:579-581
- 11 Lang A, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor KAPPA B induced resistance to tumor necrosis factor alpha mediated in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998;28(Pt 2):437A
- 12 李丹, 王小众. 肝纤维化与 TNF- α 、IL-6 及 IL-10. 世界华人消化杂志 2001;9:808-810
- 13 朱波, 罗成基. 核转录因子- κ B 与细胞凋亡. 国外医学临床生物化学与检验学分册 2001;22:18-19
- 14 Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW. NF-kappa B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19:5923-5929
- 15 Wang CY, Mayo MW, Komeluk RG. NF-kappa B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1999;281:1680-2483

水蓼衣提取物对 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用

冯大明, 王双, 唐雅玲, 杨永宗, 朱刚直, 颜迪忠

冯大明, 王双, 唐雅玲, 杨永宗, 朱刚直, 颜迪忠, 南华大学病理生理学教研室、分子生物学研究中心 湖南省衡阳市 421001

冯大明, 女, 1951-01-25 生, 湖南省湘潭市人, 汉族, 1975 年毕业于衡阳医学院, 病理生理学副教授。

通讯作者: 颜迪忠, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学病理生理学教研室、分子生物学研究中心。 yzyanghy@163.com

电话: 0734-8281288 传真: 0734-8281288

收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-02-02

Protective effect of extraction from *Hygrophila salicifolia* on mice acute hepatic injury

Da-Ming Feng, Shuang Wang, Ya-Lin Tang, Yong-Zong Yang, Gang-Zhi Zhu, Di-Zhong Yan

Da-Ming Feng, Shuang Wang, Ya-Lin Tang, Yong-Zong Yang, Gang-Zhi Zhu, Di-Zhong Yan, Department of Pathophysiology and Center of Molecular Biology Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Di-Zhong Yan, Center of Molecular Biology Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. yzyanghy@163.com

Received: 2005-01-17 Accepted: 2005-02-02

Abstract

AIM: To investigate the hepatoprotective effect of the extraction from *Hygrophila salicifolia*.

METHODS: Forty male Kunming mice were divided equally into the normal control group, the CCl₄ injury group, the low-dose (45 g/kg) *Hygrophila salicifolia* group, the high-dose (90 g/kg) *Hygrophila salicifolia* group, and the Bifendate (150 mg/kg) group. All the mice except for those in the normal control group had acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) 10 mL/kg injected intraperitoneally. The animals were killed 16 h after CCl₄ administration. The activities of serum ALT and AST, as well as the pathological changes of the liver were determined in all groups.

RESULTS: In comparison to the normal control group, the activities of serum ALT and AST in mice with CCl₄ injury were increased significantly ($P < 0.01$). The liver histology showed mild to serious necrosis and degeneration. Serum ALT and AST in both *Hygrophila salicifolia* groups were significantly lower than those in CCl₄ injury group (ALT: 1 485 ± 755, 1 211 ± 528, 3 179 ± 106; AST: 2 045 ± 293, 2 052 ± 386, 2 583 ± 116, in low-dose, high-dose *Hygrophila*

salicifolia, and CCl₄ injury group, respectively, all $P < 0.01$). The liver necrosis and degeneration induced by CCl₄ were also improved significantly after *Hygrophila salicifolia* administration. The effect of high-dose *Hygrophila salicifolia* was superior to that of Bifendate.

CONCLUSION: The extraction from *Hygrophila salicifolia* can protect the liver from damage induced by CCl₄ in a dose-dependent manner. The effect of high-dose *Hygrophila salicifolia* is better than that of Bifendate.

Key Words: CCl₄; Acute hepatic injury; *Hygrophila salicifolia*; Extraction; Mice

Feng DM, Wang S, Tang YL, Yang YZ, Zhu GZ, Yan DZ. Protective effect of extraction from *Hygrophila salicifolia* on mice acute hepatic injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1098-1101

摘要

目的: 探讨水蓼衣提取物对肝脏的保护作用。

方法: 40 只雄性昆明种小鼠, 随机分为对照组、CCl₄ 损伤对照组、低剂量水蓼衣(45 g/kg)组、高剂量水蓼衣(90 g/kg)组和联苯双酯(150 mg/kg)组。除正常对照组外, 其余动物均采用 ip CCl₄ 复制急性肝损伤小鼠模型, CCl₄ 注射后 16 h 处死动物, 测定各组小鼠血清 ALT、AST 的活性以及检查肝组织的病理改变, 观察不同剂量水蓼衣对肝脏的保护作用。

结果: 与正常对照组相比, CCl₄ 损伤对照组动物血清 ALT 和 AST 活性显著升高 ($P < 0.01$)。肝脏出现轻度、中度和重度坏死及变性, 低剂量水蓼衣组、高剂量水蓼衣组血清 ALT 和 AST 明显低于 CCl₄ 损伤对照组 (ALT: 1 485 ± 755, 1 211 ± 528 vs 3 179 ± 106; AST: 2 045 ± 293, 2 052 ± 386 vs 2 583 ± 116, $P < 0.01$), 与联苯双酯组相比无显著差异。水蓼衣能明显减轻 CCl₄ 引起的肝脏结构损害, 高剂量水蓼衣的作用尤为突出, 其作用优于联苯双酯。

结论: 水蓼衣呈剂量依赖性地减轻 CCl₄ 引起的肝损害, 其作用优于联苯双酯。

关键词: 四氯化碳; 急性肝损伤; 水蓼衣; 提取物; 小鼠

冯大明, 王双, 唐雅玲, 杨永宗, 朱刚直, 颜迪忠. 水蓼衣提取物对 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1098-1101
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1098.asp>

0 引言

水蓼衣(hygrophila salicifolia)为爵床科水蓼衣属植物,性甘、微苦,凉,常用于咽喉炎,乳腺炎,吐血,衄血和百日咳的治疗^[1].我们在临床实践中观察到水蓼衣提取物治疗病毒性肝炎有较好疗效,为进一步证实水蓼衣对肝脏的保护作用,探讨水蓼衣防治病毒性肝炎的作用机制,为临床治疗提供实验依据,我们从肝功能和病理形态学两个方面观察水蓼衣对CCl₄所致小鼠急性肝损伤的防治作用.

1 材料和方法

1.1 材料 水蓼衣提取物由南华大学附属南华医院药剂科制备.流程如下:晾干草药水蓼衣1 600 g切片,浸泡于700 mL/L乙醇10 L中,在60-70℃条件下循环蒸馏2 h,反复2次后收集蒸馏液,离心30 min(2 000 r/min),过滤,最后收集药液2 000 mL.实验前将175 mL药液再次浓缩成15 mL,即每毫升药液中含生药9 g,4℃保存备用.联苯双酯,浙江万邦药业有限公司生产,蒸馏水溶解配制成15 g/L的溶液,供灌胃用.四氯化碳(CCl₄),分析纯,上海长江化工厂生产,稀释成1.5 mL/L的橄榄油乳剂,供ip用.血清ALT及AST测定试剂盒(赖氏法)均购自上海荣盛生物技术有限公司.

1.2 方法 雄性昆明种小鼠40只,体质量18-30 g,由南岳制药厂提供.随机分为5组,每组8只;在ip CCl₄前24,12,1 h,正常对照组及CCl₄损伤对照组均每次以10 mL/kg蒸馏水灌胃;低剂量水蓼衣组和高剂量水蓼衣组分别按5 mL/kg、10 mL/kg水蓼衣提取物灌胃;联苯双酯组按10 mL/kg联苯双酯灌胃.除正常对照组外,其余4组末次灌胃后1 h用1.5 mL/L CCl₄橄榄油乳剂10 mL/kg给小鼠腹腔注射.禁食过夜,16 h后摘眼球取血,分离血清,用诊断试剂盒测定血清ALT,AST活性(均严格按照试剂盒说明书操作),并剖腹切取肝脏右叶,用40 g/L的甲醛溶液固定,常规石蜡包埋切片,HE染色,光镜观察肝

脏组织病理学变化.

统计学处理 运用SPSS8.0统计软件,计量资料用均数±标准差(mean±SD)表示,两组比较用t检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学显著性.

2 结果

2.1 水蓼衣对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠血清ALT及AST活性的影响 给小鼠ip 1.5 mL/L CCl₄橄榄油乳剂后,小鼠血清ALT活性由1 041 ± 97 nkat/L上升至3 179 ± 106 nkat/L($P<0.01$),血清AST活性由1 923 ± 300 nkat/L上升至2 583 ± 116 nkat/L($P<0.01$),显示CCl₄引起小鼠急性肝损伤.与CCl₄对照组比,低剂量水蓼衣组与高剂量水蓼衣组的血清ALT和AST活性均显著降低(ALT:1 485 ± 755, 1 211 ± 528 vs 3 179 ± 106;AST:2 045 ± 293, 2 052 ± 386 vs 2 583 ± 116, $P<0.01$),与联苯双酯组无明显差异.说明水蓼衣对CCl₄所致小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用(表1).

表1 水蓼衣对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠血清ALT及AST活性的影响(mean±SD, $n = 8$)

分组	血清ALT(nkat/L)	血清AST(nkat/L)
正常对照	1 041 ± 97 ^b	1 923 ± 300 ^b
CCl ₄ 损伤对照	3 179 ± 106	2 583 ± 116
低剂量水蓼衣	1 485 ± 755 ^b	2 045 ± 293 ^b
高剂量水蓼衣	1 211 ± 528 ^b	2 052 ± 386 ^b
联苯双酯	1 182 ± 567 ^b	2 087 ± 462 ^b

^b $P<0.01$ vs CCl₄对照组.

2.2 肝组织学检查 肉眼可见CCl₄对照组小鼠的肝脏肿大,淤血明显,肝脏表面有点状出血,低剂量水蓼衣组与高剂量水蓼衣组小鼠的肝脏均为轻度肿大、淤血,无点状出血.CCl₄引起的肝组织损伤主要表现为肝细胞坏死和肝细胞变性.肝细胞坏死表现为碎片状坏死、灶性坏死并伴有中性粒细胞和单核/巨噬细

表2 水蓼衣对CCl₄诱导的小鼠肝病理变化的影响($n = 8$)

分组	肝细胞坏死				肝细胞变性			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常对照	8	0	0	0	8	0	0	0
CCl ₄ 损伤对照	0	1	2	5	0	1	2	5
水蓼衣低剂量	0	2	4	2	0	2	4	2
水蓼衣高剂量	1	3	4	0 ^a	0	3	5	0 ^a
联苯双酯	0	2	3	3	0	2	3	3

+:坏死<1/4或轻度肝细胞变性,++:+与+++之间,+++坏死>1/3或重度肝细胞变性.^a $P<0.05$ vs CCl₄组.

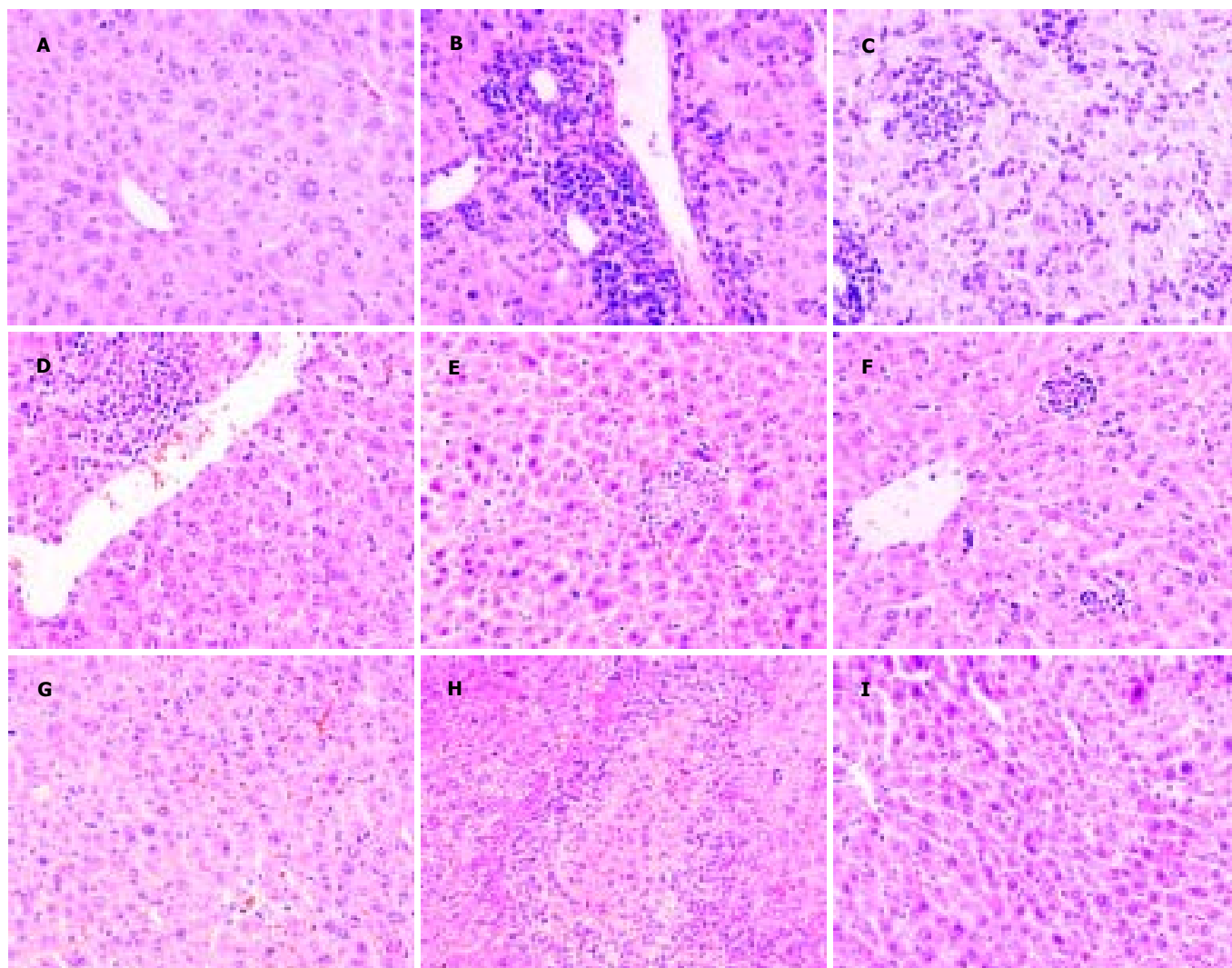


图1 肝组织学HE × 40. A: 正常; B, C: CCl₄ 损伤; D, E: 低剂量水蓼衣; F, G: 高剂量水蓼衣; H, I: 联苯双酯.

胞浸润, 碎片状坏死主要分布在门管区; 肝细胞变性主要表现为不同程度的水变性和嗜酸性变(图1A-C). 动物给予联苯双酯后再给予CCl₄, 其肝脏仍有亚大块坏死, 较多灶性坏死和嗜酸性变, 但较CCl₄组为轻(图1H-I). 预先给予水蓼衣能明显减轻CCl₄引起的肝细胞变性及坏死, 突出表现为肝细胞重度坏死和变性的例数明显减少, 其中高剂量水蓼衣的作用尤为显著($P < 0.05$), 且其作用明显优于阳性对照的联苯双酯(表2, 图1D-G). 说明水蓼衣对CCl₄引起的急性肝损伤有较好的保护作用.

3 讨论

CCl₄肝损伤动物模型是研究护肝药物最常用的病理模型之一. CCl₄引起肝损伤的机制为CCl₄在肝微粒体细胞色素P-450激活下生成三氯甲基自由基, 这些自由基可与肝细胞内大分子发生共价结合, 也可攻击膜不饱和脂质, 引起脂质过氧化, 使肝细胞损伤, 转氨酶从受损的肝细胞内溢出, 使血清中转氨酶活性升高^[2-5]. 小鼠ipCCl₄后ALT, AST值明显高于正常对

照组, 病理学检查证实有肝细胞碎片状坏死、亚大块坏死、灶性坏死伴有中性粒细胞和单核/巨噬细胞浸润, 并出现不同程度的肝细胞变性, 这些与文献[4, 7]报道的大致相同. 已知联苯双酯对多种肝损伤动物模型及乙肝患者的肝脏有保护作用^[5-6], 我们以联苯双酯作为CCl₄中毒护肝的阳性对照. 研究表明, 联苯双酯组血清ALT和AST活性显著低于CCl₄组, 但防护肝脏结构受损的作用不如水蓼衣显著, 肝脏仍有亚大块坏死, 较多灶性坏死及嗜酸性变. 给予水蓼衣后, 各剂量组ALT、AST值较CCl₄对照组有明显降低, 差异有显著性, 并且明显减轻小鼠肝脏的病理损伤, 其中高剂量水蓼衣较低剂量水蓼衣的作用更为显著, 显示出一定的剂量依赖性, 表明水蓼衣能够减轻CCl₄对肝细胞的急性损害, 对肝脏具有保护作用. 而且其减轻CCl₄所致肝脏结构损害方面优于联苯双酯. 水蓼衣抗肝损伤的作用是否与抗脂质过氧化有联系, 药物是促进毒性代谢产物的解毒, 还是直接保护肝细胞免受损伤, 有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 杨成梓, 凌伟坚, 陈建斌. 两种仙桃草的本草考证. 中药材 2003; 26:818-819
- 2 张建平, 魏红山, 刘顺爱, 郭晶晶, 张黔英, 石小红, 张四平, 刘志英, 冯鑫, 吕洪波. 依那普利对 CCl₄ 急性肝损伤大鼠抗氧化功能的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:2638-2641
- 3 Liu SL, Degli Esposti S, Yao T, Diehl AM, Zern MA. Vitamin E therapy of acute CCl₄-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. Hepatology 1995;22:1474-1481
- 4 Jose SL, Daniel MF, Pablo MDT. Protective effect of carnosol on CCl₄-induced acute liver damage in rats. Europ J Gastroenterol Hepatol 2002;14:1001-1006
- 5 张学武, 赵莲芳, 全吉叔, 沈明花. 珍珠梅水提取物对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用. 中南药学 2003;1:207-209
- 6 崔速南, 汪明明, 范桂玲. 大剂量联苯双酯抗乙型肝炎病毒疗效的临床观察. 中华医学杂志 2002;82:538-540
- 7 徐玉芳, 黄向春, 温子龙, 罗左阳, 黄常青, 雷元金. 克肝胶囊对小鼠实验性急性肝损伤的影响. 中西医结合肝病杂志 2000;10: 23-25

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5) 的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34) 的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985) 表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义(P<0.05). 结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985) 在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

二甲双胍对实验性大鼠脂肪肝的治疗作用

李岩, 阚志超, 商国强, 邵宏

李岩, 阚志超, 天津市第三中心医院肝内科 天津市 300170
商国强, 天津市第三中心医院病理科 天津市 300170
邵宏, 天津市第三中心医院急诊科 天津市 300170
李岩, 男, 1973-01-09 生, 天津市人, 汉族, 1996 年天津医科大学临床医学本科毕业, 现为天津医科大学 2002 级消化内科研究生, 主要从事肝病方面研究。
通讯作者: 阚志超, 300170, 天津市第三中心医院肝内科。
li_yan629@yahoo.com.cn
电话: 022-84112181
收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-06

Therapeutic effects of metformin on rats with fatty liver

Yan Li, Zhi-Chao Kan, Guo-Qiang Shang, Hong Shao

Yan Li, Zhi-Chao Kan, Department of Gastroenterology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Guo-Qiang Shang, Department of Pathology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Hong Shao, Department of Emergency Management, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Correspondence to: Zhi-Chao Kan, Department of Gastroenterology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China. li_yan629@yahoo.com.cn
Received: 2005-04-26 Accepted: 2005-05-06

Abstract

AIM: To investigate the changes of the liver function, histology, fatty metabolism and contents of insulin and leptin after treated with metformin in rats with fatty liver.

METHODS: Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into three groups: control group ($n = 10$), model group ($n = 11$) and metformin group ($n = 11$). During the whole experiment, the rats in control group were fed with normal food, and the rats in the other two groups were fed with a high caloric laboratory chow. Then the rats in the metformin group were given metformin 170 mg/(kg·qd) while the ones in the other groups were given distilled water of the same volume by stomach irrigation for eight weeks. Then all the animals were sacrificed. Liver index (liver/body weight ratio), Activities of serum liver-associated enzymes, blood lipids, free fatty acids (FFA), leptin, fasting blood glucose (FBG), fasting plasma insulin (FPI), HOMA insulin resistance index (HOMA-IR), liver triglycerides, liver cholesterol, liver tissue malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and the liver histology of rats in all the groups were detected and analyzed.

RESULTS: Significant insulin resistance, disorder of fatty

metabolism and liver function and increased expression of leptin were detected in rats of model group. FBG and FPI showed an increasing tendency, but there was no significant difference among the three groups. The liver histology in the model group showed moderate to severe steatosis. After treated with metformin, the levels of serum ALT ($1\ 184.40 \pm 244.38$ vs 819.83 ± 143.86 nkat/L, $P < 0.05$), AST ($3\ 802.76 \pm 1\ 532.81$ vs $2\ 959.26 \pm 540.44$ nkat/L, $P < 0.05$), TG (2.28 ± 0.50 vs 1.17 ± 0.36 mmol/L, $P < 0.05$) were decreased significantly. HOMA-IR (15.20 ± 7.96 vs 13.10 ± 5.22 , $P < 0.05$) in the metformin group were significantly lower, and the levels of serum leptin (2.47 ± 0.21 vs 2.19 ± 0.20 μ g/L, $P < 0.05$) decreased markedly. The liver histology in the metformin group was improved significantly.

CONCLUSION: Metformin is effective in the treatment of rats with fatty liver induced by high fat feeding.

Key Words: Metformin; Rat; Leptin; Fatty liver; Insulin resistance

Li Y, Kan ZC, Shang GQ, Shao H. Therapeutic effects of metformin on rats with fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1102-1105

摘要

目的: 观察二甲双胍治疗脂肪肝大鼠在生化、病理、脂肪代谢、胰岛素及瘦素各方面指标的变化。

方法: 雄性 Wistar 大鼠 32 只, 按体重层次随机分为 3 组, 对照组(A)10 只、模型组(B)11 只、二甲双胍组(C)11 只, 对照组饲以普通鼠饲料, 其余两组均饲以高脂饲料。饲养 8 wk 后病理证实脂肪肝已形成。随后进行灌胃治疗, C 组 170 mg/(kg·d) 每天 1 次 5 mL 灌胃, A 组及 B 组大鼠灌服等量蒸馏水, 各组按原饲料进行饲养。8 wk 后, 全部处死, 取血及肝组织, 测定血中 ALT、AST、TG、CHO、INS、FBS、FFA、Leptin。肝组织匀浆测定肝组织 TC、TG、SOD、MDA。观察肝脏组织学变化。

结果: 脂肪肝大鼠存在明显脂肪代谢紊乱, 肝功能异常, 胰岛素抵抗及 leptin 表达增高; 二甲双胍能显著改善肝功能, ALT($1\ 184.40 \pm 244.38$ vs 819.83 ± 143.86 nkat/L, $P < 0.05$), AST($3\ 802.76 \pm 1\ 532.81$ vs $2\ 959.26 \pm 540.44$ nkat/L, $P < 0.05$)、降低血甘油三酯(2.28 ± 0.50 vs 1.17 ± 0.36 mmol/L, $P < 0.05$), 降低 leptin 高表达(2.47 ± 0.21 vs 2.19 ± 0.20 μ g/L, $P < 0.05$)、改善胰岛素抵抗($15.20 \pm$

7.96 vs 13.10 ± 5.22, $P < 0.05$), 并改善肝组织学.

结论:二甲双胍对实验性大鼠脂肪肝有一定治疗效果.

关键词:二甲双胍; 大鼠; 脂肪肝; 胰岛素抵抗; 瘦素

李岩, 阎志超, 高国强, 邵宏. 二甲双胍对实验性大鼠脂肪肝的治疗作用. 世界华人消化杂志. 2005;13(9):1102-1105
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1102.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝 (NAFLD), 是一种肝组织学改变与酒精性肝病相类似, 但无过量饮酒史的临床病理综合征. NAFLD 主要与肥胖、糖尿病及高脂血症有关, 提示脂肪肝与代谢综合征密切相关^[1]. Sanyal 和 Marchesini *et al*^[2-3]用高胰岛素正常葡萄糖钳夹实验研究显示, NAFLD 存在胰岛素抵抗. 瘦素和胰岛素之间相互作用, 出现高瘦素、高胰岛素水平, 从而诱发胰岛素抵抗. 瘦素还通过促进胰岛素抵抗改变肝细胞的胰岛素信号, 增加肝细胞内脂肪酸含量, 在脂肪肝发病中起到重要作用^[4]. 国内外均有使用二甲双胍治疗脂肪肝的报道^[5-6], 我们进一步研究二甲双胍在实验性脂肪肝大鼠中对胰岛素抵抗、脂质过氧化及瘦素方面的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 Wistar 大鼠 32 只, 体重 245-340 g, 平均 279.65 ± 16.44 g. 由天津军事医学研究所实验动物中心提供. 胆固醇购自北京鼎国生物技术发展公司; 猪油为市售; FFA、MDA、SOD 测试试剂盒: 南京建成生物工程公司; ALT、AST 试剂盒: 上海荣盛生物有限公司; Leptin、INS 试剂盒: 北京北方生物技术研究; 盐酸二甲双胍: 上海施贵宝公司生产. 研成粉末, 双蒸水溶解配成 17.0 g/L 混悬液, 其余试剂均为分析纯品. 甘油三酯测试试剂盒: 南京建成生物工程公司; 胆固醇测试试剂盒: 南京建成生物工程公司. 分光光度计 (BioPhotometer) - 德国 Eppendorf 公司; Sigma 冷冻离心机 - 德国 Sigma 公司; -80℃ 超低温冰箱 - 美国 Forma 公司; 120 型全自动生化分析仪 - 日本东芝公司.

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立 32 只大鼠在动物房内适应性喂养 1 wk 后, 随机分为两组: 模型组 22 只, 正常对照组 (A) 10 只. 模型组饲以高脂饲料, 高脂饲料配方为: 普通饲料 + 1% 胆固醇 + 14% 猪油 (质量比), 由天津市华容实验动物中心饲料厂配制; 正常对照组饲以普通饲料, 实验动物自由饮水和进食. 8 wk 后随机抽取模型组中 2 只大鼠脱颈处死, 病理证实脂肪肝已形成. 再将模型组 20 只大鼠按体重层次随机分为 2 组: 模型对照组 (B): 10 只; 二甲双胍组 (C): 10 只. 二甲双胍

组给 170 mg/(kg · d) (按成人剂量 1.5 g/d 折算) 溶于 5 mL 蒸馏水中灌胃; 正常对照组、模型对照组给以同量蒸馏水灌胃, 各组按原饲料进行饲养. 8 wk 后, 称重, 全部脱颈处死, 处死前夜禁食水, 取血及肝组织待测.

1.2.2 观察指标及检测方法 (1) 观察大鼠食欲、体重、毛发、状态及死亡情况. 实验结束测体重及肝重. (2) 血清指标测定: 测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、甘油三酯 (TG)、胆固醇 (CHO)、空腹血糖 (FBS)、游离脂肪酸 (FFA); 放免法测定空腹胰岛素 (FINS)、瘦素 (leptin). 胰岛素抵抗指数计算: 胰岛素抵抗指数 (HOME-IR) = (FBS × FINS) / 22.5^[7]. (3) 肝组织匀浆的制备及保存: 自肝右叶取新鲜肝组织 0.15 g 在 4℃ 下制成 10% 的肝匀浆, 12 000 g 离心 15 min 后取上清保存于 -20℃, 以备测肝丙二醇 (MDA), 超氧化物歧化酶 (SOD). 再取新鲜肝组织 0.1 g 用氯仿: 甲醇 (1:1, V/V) 混合液在 4℃ 下制成 100 g/L 的肝匀浆, 静置抽提 48 h, 12 000 g, 离心 15 min, 然后取上清液可溶部分用酶法测定肝组织胆固醇, 甘油三酯.

1.2.3 组织病理学标本的制备 取肝左叶用 40 g/L 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, HE 染色, 光镜下观察组织学改变.

统计学处理 数据采用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 使用 SPSS11.5 进行单因素方差分析和 q 检验.

2 结果

2.1 一般情况 实验中, 高脂饮食大鼠较 A 组体重增加迅速, 且皮毛发黄, 蓬乱不顺滑. 与 A 组相比, B 组、C 组大鼠体重明显高于 A 组 ($P < 0.05$). C 组大鼠较 B 组体重有所减轻, 但无显著性差异 ($P > 0.05$). A 组与 C 组肝指数 (肝重 / 体重 × 100%) 均小于模型对照组, 差别均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1).

表1 脂肪肝大鼠体重及肝指数的变化

组别	<i>n</i> (只)	体重(g)	肝指数
正常对照组(A):	10	309.97 ± 19.70	3.76 ± 0.39
模型对照组(B):	10	372.07 ± 23.01 ^a	4.12 ± 0.30 ^a
二甲双胍组(C):	10	359.09 ± 36.27 ^a	3.76 ± 0.14 ^c

^a $P < 0.05$ vs A 组; ^c $P < 0.05$ vs B 组.

2.2 各组转氨酶结果 A 组、C 组 ALT、AST 值均低于 B 组 ($P < 0.05$), 提示 B 组大鼠出现脂肪性肝炎, 使用二甲双胍能降低 ALT、AST, 有统计学意义 ($P < 0.05$), B 组、C 组 CHO 含量均较 A 组高 ($P < 0.05$), C 组 CHO 含量较 B 组偏低, 但无显著性差异 ($P > 0.05$). B 组 TG 含量高于其他两组 ($P < 0.05$). B 组 FFA 含量高于其他两组 ($P < 0.05$), 治疗后 C 组 FFA 含量虽较 B 组明

表2 脂肪肝大鼠转氨酶、FFA及血脂的变化

组别	n	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	CHO(mmol/L)	TG(mmol/L)	FFA(mmol/L)
正常对照组(A)	10	683.47 ± 83.52	2 775.39 ± 419.92	1.78 ± 0.16	1.27 ± 0.34	306.65 ± 34.62
模型对照组(B)	10	1 184.40 ± 244.38 ^a	3 802.76 ± 1532.81 ^a	2.26 ± 0.33 ^a	2.28 ± 0.50 ^a	567.73 ± 25.41 ^a
二甲双胍组(C)	10	819.83 ± 143.86 ^c	2 959.26 ± 540.44 ^a	2.20 ± 0.26 ^a	1.17 ± 0.36 ^c	401.85 ± 22.13 ^c

^a*P*<0.05 vs A组; ^c*P*<0.05 vs B组.

表3 脂肪肝大鼠肝脂的变化

组别	n	TC(mg/dl)	TG(mg/dl)	MDA(nmol/mgprot)	SOD(nmol/mgprot)
正常对照组(A)	10	35.59 ± 3.66	54.44 ± 10.27	2.79 ± 0.13	78.65 ± 3.49
模型对照组(B)	10	96.91 ± 7.85 ^a	96.26 ± 12.20 ^a	3.85 ± 0.20 ^a	36.84 ± 3.94 ^a
二甲双胍组(C)	10	90.03 ± 4.55 ^{ac}	70.90 ± 19.06 ^{ac}	3.39 ± 0.12 ^{ac}	78.34 ± 3.30 ^c

^a*P*<0.05 vs A组; ^c*P*<0.05 vs B组.

显下降,但与A组相比仍明显升高(表2).

2.3 各组肝脂、肝组织中MDA和SOD结果 TC、TG含量顺序为B组>C组>A组,且均有统计学意义(*P*<0.05). MDA含量B组>C组>A组,且均有统计学意义(*P*<0.05). 而B组SOD活力较另外两组降低,差别有统计学意义(*P*<0.05,表3).

2.4 血糖、胰岛素、胰岛素抵抗指数及瘦素 空腹血糖各组之间无显著性差异,但B组最高,然后依次是C组及A组.各组的胰岛素水平结果与血糖结果类似.但使用胰岛素抵抗指数计算后发现,B组高于A组,且有显著性差异(*P*<0.05),C组胰岛素抵抗指数低于B组高于A组,但无统计学意义.血清瘦素结果B组>C组>A组,且有显著性差异(*P*<0.05,表4).

表4 脂肪肝大鼠FBS、FINS、INS抵抗指数及瘦素的变化

组别	n	FBS(mmol/L)	INS(μu/L)	INS抵抗指数	瘦素(μg/L)
正常对照组(A)	10	6.66 ± 1.58	31.13 ± 8.57	8.89 ± 2.04	1.79 ± 0.23
模型对照组(B)	10	8.39 ± 2.38	39.30 ± 11.93	15.20 ± 7.96 ^a	2.47 ± 0.21 ^a
二甲双胍组(C)	10	7.90 ± 2.55	36.75 ± 11.12	13.10 ± 5.22	2.19 ± 0.20 ^{ac}

^a*P*<0.05 vs A组; ^c*P*<0.05 vs B组.

2.5 病理学变化 A组和C组的大鼠肝脏肉眼观察呈鲜红色,边缘锐利,表面光滑. B组的大鼠肝脏体积增大,边缘变钝,颜色呈黄褐色,可见表面白色斑点,切面油腻感. A组大鼠肝小叶完整,肝细胞呈多边形,围绕中央静脉呈放射状,偶见肝细胞脂肪变性,未见炎性细胞浸润. 肝窦清晰可见,肝索排列整齐,肝小叶汇管区基本结构包括小叶间胆管、小叶间动脉、小叶间静脉清晰可见(图1A). B组大鼠肝细胞弥漫性脂肪变性,肝细胞轻度肿胀. 汇管区、小叶内有炎细胞浸润,炎症细胞以单核细胞、淋巴细胞为主. 部分出现点状坏死、灶性坏死,未见纤维化(图1B). C组肝细胞趋于正常,仅见少量局灶性轻度肝细胞脂肪变性,未见炎性细胞浸润及纤维化(图1C).

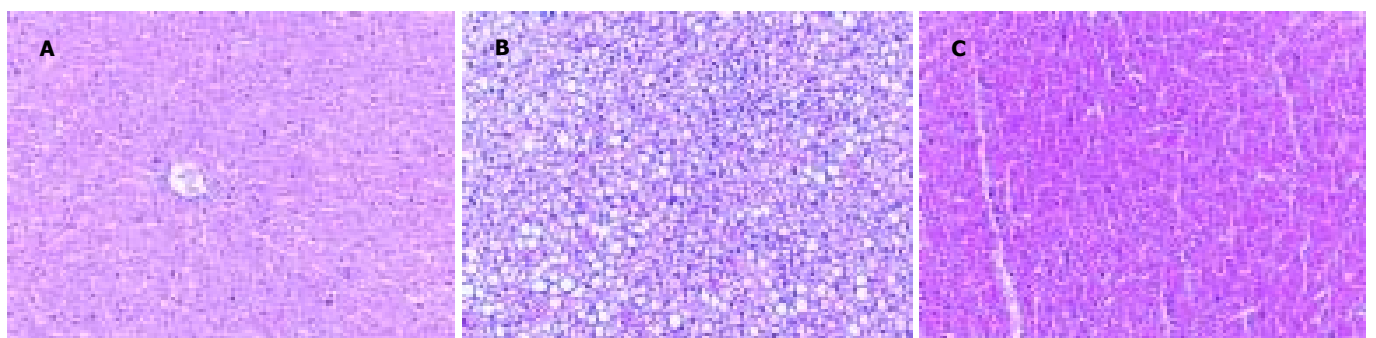


图1 实验大鼠肝组织病理变化, ×100. A: 正常对照组; B: 模型组; C: 二甲双胍组.

3 讨论

瘦素(leptin)是由Ob基因编码,脂肪组织分泌的肽类激素.1998年由Potter *et al*^[8]在活化的肝星状细胞中发现leptin的mRNA和蛋白.瘦素的主要作用是调节机体脂肪的稳定,还可以调节胰岛素、肾上腺素、生长激素、甲状腺素的分泌,促进生殖、造血、免疫及血管增生,并且具有排钠利尿作用^[9].Tobe *et al*^[10]在研究血浆leptin水平与脂肪肝关系实验中发现,脂肪肝患者血浆leptin水平明显高于对照组,而且与转氨酶的升高平行.

我们通过高脂饮食成功复制出大鼠脂肪肝模型,模型组动物转氨酶水平、血脂、肝脂、胰岛素抵抗指数、血清MDA、leptin均明显升高.这与国内外文献报道相一致.血糖及胰岛素水平未见明显差别可能与喂养时间较短有关.

二甲双胍是双胍类降糖药物,通过改善胰岛素敏感程度,促进外周组织摄取葡萄糖而起到降糖作用.本实验中脂肪肝大鼠模型,虽然血糖及胰岛素水平升高,但无显著性差异.经过计算胰岛素抵抗指数较正常组明显升高且有统计学意义,提示其已存在胰岛素抵抗.通过二甲双胍治疗,转氨酶下降,血脂、肝脂、胰岛素抵抗指数下降,与治疗前有明显差异,肝组织学基本恢复正常,提示二甲双胍对实验性大鼠脂肪肝有效.而血清胆固醇无明显下降可能与用药时间较短有关.治疗后,大鼠肝组织MDA下降,SOD升高($P<0.05$),提示肝内脂质过氧化程度减轻,抗氧化物质增多.

近年来研究表明,与脂肪肝发病及胰岛素抵抗密切相关.肥胖时,leptin水平升高,有效生物学作用明显下降,胰岛素水平亦明显升高,出现胰岛素抵抗.leptin抵抗可能参与了肝脏脂肪变性的形成^[11-12].我们发现模型组动物体重增加,leptin明显升高,提示有leptin抵抗.Kieffer *et al*^[13]通过突变鼠体外培养胰岛 β 细胞试验,发现了leptin对突变鼠胰岛 β 细胞的胰岛素抑制不足,可导致高胰岛素血症、胰岛素抵抗.Seufert *et al*^[14]认为在脂肪组织与胰岛之间可能存在“脂肪—胰岛内分泌轴”,脂肪组织与胰岛之间通过瘦素与胰岛素形成一个双向反馈环.但在病理状态下,胰岛素对leptin的敏感性下降,由于leptin和胰岛素之间相互作用,出现高leptin、高

胰岛素水平.与肥胖有关的高循环leptin水平可能是通过两个步骤引起肝脏脂肪变性:(1)促进胰岛素抵抗,提高胰岛素水平;(2)改变肝细胞的胰岛素信号,增加肝细胞内脂肪酸含量^[4].经过二甲双胍治疗后,leptin降低,其机理可能与胰岛素抵抗改善、血脂降低等多方面因素有关.但二甲双胍治疗与leptin之间的具体关系尚需要进一步研究.

4 参考文献

- 1 Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira AG, De Moura MC. Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 1999;18:353-358
- 2 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterlin RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steato hepatitis: Association of Insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- 3 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tommasetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850
- 4 Kaplan LM. Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology* 1998;115:997-1001
- 5 Nair S, Diehi AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:23-28
- 6 高志强, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富, 邹欣. 二甲双胍干预高脂饲养所致大鼠脂肪肝的研究. *中华肝脏病杂志* 2005;13:101-104
- 7 Kanauchi M. A new index of insulin sensitivity obtained from the oral glucose tolerance test applicable to advanced type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1891-1892
- 8 Potter JJ, Womak L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:178-182
- 9 Collins S, Kuhn CM, Petro AE, Swick AG, Chrnyk BA, Surwit RS. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 1996;380:677
- 10 Tobe K, Ogura T, Tsukamoto C, Imai A, Matsuura K, Iwasaki Y, Shimomura H, Higashi T, Tsuji T. Relationship between serum leptin and fatty liver in Japanese male adolescent university students. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3328-3335
- 11 Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity. *Hepatology* 2002;36:403-409
- 12 Campillo B, Sherman E, Richardet JP, Bories PN. Serum leptin levels in alcoholic liver cirrhosis: relationship with gender, nutritional status, liver function and energy metabolism. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:980-988
- 13 Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF. Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β cells. *Diabetes* 1997;46:1087-1093
- 14 Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: Implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:670

大鼠免疫性肝纤维化形成中 MMP-1 和 TIMP-1 表达的动态变化

段志军, 胡 祥, 高志红, 谭 晨, 袁 宏, 李士军

段志军, 高志红, 谭晨, 大连医科大学附属第一医院消化内科
辽宁省大连市 116011

胡祥, 大连医科大学附属第一医院普外科 辽宁省大连市 116011

袁宏, 李士军, 大连医科大学附属第一医院检验中心

辽宁省大连市 116011

段志军, 女, 1965-11-15 生, 辽宁省大连市人, 2003 年大连医科大学医学博士学位, 日本大阪大学医学部第二分子机制内科肝病研究室研究员, 现为大连医科大学附属第一医院消化内科主任医师、教授、硕士生导师, 大连理工大学研究生院联合博士生导师。

通讯作者: 段志军, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路 222 号, 大连医科大学附属第一医院消化内科. cathydoctor@hotmail.com

电话: 0411-83635963-3081 传真: 0411-83632383

收稿日期: 2005-02-28 接受日期: 2005-03-22

Dynamic change of MMP-1/TIMP-1 expression in experimental immune hepatic fibrosis

Zhi-Jun Duan, Xiang Hu, Zhi-Hong Gao, Chen Tan, Hong Yuan, Shi-Jun Li

Zhi-Jun Duan, Zhi-Hong Gao, Chen Tan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Xiang Hu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Hong Yuan, Shi-Jun Li, Testing Center, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. cathydoctor@hotmail.com

Received: 2005-02-28 Accepted: 2005-03-22

Abstract

AIM: To evaluate the roles of matrix metalloproteinase-1/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (MMP-1/TIMP-1) in the course of formation and progression of liver fibrosis.

METHODS: Forty-eight female SD rats, 120-150 g in weight, were divided randomly into 2 groups, 8 rats in normal control group and 40 rats in fibrosis group. The fibrotic animal model was established according to the method of Blackwell with some modifications. Human serum albumin (HSA)-sensitized rats were further attacked by i.v. injection of HSA through the coccygeal vein. Liver tissues were obtained 0, 2, 4, 6, and 8 weeks after the attack. Liver hydroxyproline (HYP) content was determined, and HE, argentophilic as well as Van Gieson's (VG) stainings were performed to monitor the process of fibroproliferation. The protein and RNA of MMP-1/TIMP-1 were analyzed using

ELISA and semi-quantitative RT-PCR, respectively.

RESULTS: Gradual formation of hepatic fibrosis was detected in the rats, which indicated an ideal model to study the process of generation and development of fibrosis. MMP-1 protein was present in the normal liver, with no significant change in fibrosis and cirrhosis ($P>0.05$). In contrast, TIMP-1 protein was increased progressively ($P<0.01$, after 4 weeks), reaching the peak in the stage of cirrhosis (the value after 8 wks was increased by 4 folds). In consistence with the changes of the proteins, MMP-1 mRNA expression did not alter significantly during the fibrosis process ($P>0.05$), while TIMP-1 mRNA expression was increased gradually ($P<0.01$, after 4 weeks). MMP-1/TIMP-1 ratio tended to decrease in this process. The change was more profound after 4 weeks ($P<0.01$). Moreover, the extent of the increase of TIMP-1 and the decrease of MMP-1/TIMP-1 ratio was well correlated with the extent of fibrosis, as revealed by the study of rats in different groups with different grades of fibroproliferation.

CONCLUSION: The main cause responsible for the deposition of extracellular matrix (ECM) during fibrosis might not be a gradual decrease in MMP-1 level, but a progressing increase in TIMP-1 level, which suppresses the activity of MMP-1 so as to diminish matrix degradation. A gradual decrease of MMP-1/TIMP-1 ratio during this process indicates a progressing disproportion between MMP-1 and TIMP-1, which accelerates the fibrosis process. TIMP-1 expression and MMP-1/TIMP-1 ratio are two useful indexes to reflect the fibrotic extent.

Key Words: Immunity; Hepatic fibrosis; Matrix metalloproteinase-1; Matrix metalloproteinase-1; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Rats

Duan ZJ, Hu X, Gao ZH, Tan C, Yuan H, Li SJ. Dynamic change of MMP-1/TIMP-1 expression in experimental immune hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1106-1110

摘要

目的: 研究 MMP-1, TIMP-1 在肝纤维化发生发展中的作用。

方法: ♀ SD 大鼠 48 只, 体质量 120–150 g, 随机分成正常对照组 8 只和肝纤维化组 40 只。肝纤维化动物模型制备按 Blackwell 方法稍加改进, 予 HSA 致敏大鼠后再予尾静脉攻击注射。在攻击注射 0, 2, 4, 6, 8 wk 后取肝, 应用肝组织羟脯氨酸(HYP)的测定和 HE, 嗜银及 VG 染色监测肝纤维组织增生情况, ELISA 方法测定 MMP-1, TIMP-1 的蛋白表达, 半定量 RT-PCR 方法测定 MMP-1, TIMP-1 基因表达。

结果: HYP 随着 HSA 的不断注射逐渐升高, 纤维组织增生逐渐加重, 显示 HSA 所致的免疫性肝纤维化逐步形成。正常肝组织有 MMP-1 蛋白表达, 在肝纤维化发展过程中以及肝硬化阶段, 其蛋白表达没有显著性变化($P>0.05$); 而 TIMP-1 蛋白表达水平逐渐增加(4 wk 后, 与 0 wk 比较有统计学差别: $P<0.01$), 到肝硬化阶段达到高峰(8 wk 时接近 0 wk 的 4 倍)。在肝纤维化形成的进展中, MMP-1 mRNA 表达无明显变化($P>0.05$), 而 TIMP-1 mRNA 表达随着时间的推移而逐渐增高(4 wk 后与 0 wk 比较, $P<0.01$)。在肝纤维化发生发展中, MMP-1/TIMP-1 蛋白表达比值逐渐降低, 尤其是 4 wk 以后, 分别与 0 wk 比较有显著差异($P<0.01$)。按肝纤维化增生程度分组, 随着肝纤维化程度的加重, TIMP-1 的表达逐渐升高, MMP-1/TIMP-1 比值逐渐减小。

结论: 在大鼠免疫性肝纤维化进程中, TIMP-1 进行性升高, 使 MMP-1 活性受到抑制。MMP-1 及 TIMP-1 比例逐渐失调并持续存在, 加速了肝纤维化的进程。

关键词: 免疫性; 肝纤维化; 基质金属蛋白酶-1; 基质金属蛋白酶抑制因子-1; 大鼠

段志军, 胡祥, 高志红, 谭晨, 袁宏, 李士军. 大鼠免疫性肝纤维化形成中 MMP-1 和 TIMP-1 表达的动态变化. 世界华人消化杂志. 2005;13(9):1106–1110 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1106.asp>

0 引言

肝纤维化的发生不仅是由于肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成过多, 而且与 ECM 降解水平的变化有着密切关系^[1]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可降解多种 ECM 成分。正常情况下, 肝脏 ECM 合成和降解维持着动态平衡, MMPs 和金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)在调节这种平衡中起重要作用^[2]。慢性肝损伤时 MMPs/TIMPs 比值发生变化, 导致 ECM 合成增多, 降解减少, 最终沉积形成肝纤维化。参与肝纤维化形成的主要胶原是 I, III 型胶原, 参与降解 I, III 型胶原的基质金属蛋白酶主要是 MMP-1^[3], 他的抑制因子为 TIMP-1^[4–5], 当 MMP-1 和 TIMP-1 比例失调时, I, III 型胶原降解减少而沉积。我们以人血清白蛋白所致的大鼠免疫性肝纤维化模型为基础, 在肝纤维化形成的不同时期同步测

定肝组织 MMP-1, TIMP-1 蛋白和基因水平的表达, 旨在进一步了解 MMP-1/TIMP-1 在肝纤维化发生发展中的作用及其与肝纤维化程度的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 ♀ Sprague-Dawley 大鼠 48 只, 体质量 120–150 g, 由大连医科大学实验动物中心提供, 随机分成正常对照组 8 只和肝纤维化组 40 只(死亡动物未计算在内)。200 g/L 人血清白蛋白(human serum albumin, HSA); 大鼠 MMP-1 及 TIMP-1 测定(ELISA)试剂盒; RT-PCR 扩增试剂盒, 引物序列来自文献[6–8]。

1.2 方法 大鼠免疫性肝纤维化动物模型的制备按 Blackwell 方法^[9]稍加改进。末次致敏后 10 d 予尾静脉攻击注射 HSA, 每次 0.3–0.5 mL (2.5–4 mg, 逐渐增加), 2 次/wk, 共 8 wk。正常对照组, 予相应量的生理盐水注射。在 HSA 攻击注射前(0 wk)以及攻击 2, 4, 6, 8 wk 末分别取 8 只大鼠去头取肝, 一部分迅速投入液氮, 之后转入 -70°C 保存, 再用生理盐水制备 100 g/L 肝匀浆, 或提取总 RNA (每组任取 3 只鼠肝组织), 均置于 -20°C 保存。另一部分置入 10 g/L 中性甲醛中固定, 制备病理切片。肝组织羟脯氨酸(HYP)的测定: 离心取上清液加浓盐酸在高温中水解, 再与对二甲氨基苯甲醛呈色反应测定含量。HE 染色观察肝纤维组织增生程度与分布情况: “–” – “+++”; 嗜银染色观察 III 型胶原增生程度: “–” – “+++”; VG 染色观察 I 型胶原增生程度: “–” – “+++”^[10]。MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达的测定: ELISA 方法, 分别根据试剂盒说明测定并计算出二者蛋白表达数值。MMP-1, TIMP-1 基因表达的测定: RT-PCR 方法, 按照扩增试剂盒操作。取 HSA 攻击 0, 2, 4, 6, 8 wk 末的肝组织称质量后匀浆, 采用异硫氰酸胍法并参照 Chomczynski *et al* 方法提取总 RNA, 判定 RNA 的质量和浓度, 通过逆转录反应及 PCR 反应后, 取扩增产物加入 2% 的琼脂糖凝胶孔中, TAE 缓冲液, 50 V 电压, 电泳 1 h, 照相记录结果经扫描, 通过计算机 QuantiScan 分析软件处理, 与内参照(GAPDH)对比, 以 % 代表目的基因的相对表达值。

统计学处理 等级资料用秩和检验, 计量资料用方差分析。

2 结果

2.1 大鼠肝脏病理学变化 HSA 攻击 0, 2, 4, 6, 8 wk 大鼠肝脏, 0–2 wk 大多数基本正常, 表面光亮, 边缘规整, 触之质软, 切割易碎; 6–8 wk 肝脏光亮度明显下降, 颜色变暗, 边缘不规整, 肝表面粗糙, 布满针尖大小的颗粒, 分布均匀紧密, 触之质较硬, 易切割, 不易碎; 4 wk 鼠肝基本介于上述

二者之间. 随着注射次数的增加及时间的推移, 肝纤维化逐渐形成, 而且肝纤维化程度逐渐加重(表1), 至4 wk以后, 肝纤维组织增生明显, 6-8 wk明显有假小叶形成, 提示大鼠免疫性肝纤维化模型是很好观察肝纤维化形成过程的模型(4 wk后与0 wk比较 $P<0.01$). 随着HSA的不断注射, 肝组织HYP含量逐渐增多, 2 wk时与0 wk比较虽未显示显著变化($P>0.05$), 但4 wk以后, 分别与0 wk比较均有统计学差异($P<0.01$). 提示免疫性肝纤维化逐步形成的过程(图1A).

表1 大鼠免疫性肝纤维化的程度(HE染色)

肝纤维化程度	0 wk	2 wk	4 wk ^b	6 wk ^b	8 wk ^b
-	8	4	1	0	0
+	0	4	1	1	0
++	0	0	5	3	2
+++	0	0	1	4	6

^b $P<0.01$ vs 0 wk.

2.2 肝组织 MMP-1, TIMP-1 表达的变化 随着HSA的不断注射及肝纤维化的逐渐形成, 肝组织MMP-1的蛋白表达虽在2 wk时似有升高趋势, 但2 wk后趋于平稳, 各个时间点的表达分别与0 wk时的表达比较无统计学意义($P>0.05$, 图1B). 可以看出, 随着HSA的攻击注射和纤维化的逐渐形成, 肝组织TIMP-1的蛋白表达持续升高(图1C), 自4 wk始, 与0 wk比较有明显统计学差别($P<0.01$), 至8 wk时, 其升高接近0 wk的4倍. 半定量RT-PCR结果显示, 在大鼠免疫性肝纤维化形成的进展中, 在HSA攻击0, 2, 4, 6及8 wk末所检测的MMP-1mRNA表达无明显变化($P>0.05$), 而同步检测的TIMP-1mRNA表达随着时间的推移而逐渐增高, 2 wk与0 wk比较虽未显示出统计学意义($P>0.05$), 4、6和8 wk分别与0 wk比较, 却有显著差别($P<0.01$, 图2). 在大鼠免疫性肝纤维化发生发展中, MMP-1/TIMP-1蛋白表达比值逐渐降低, 尤其是4 wk以后, 分别与0 wk比较有显著差异($P<0.01$, 图3).

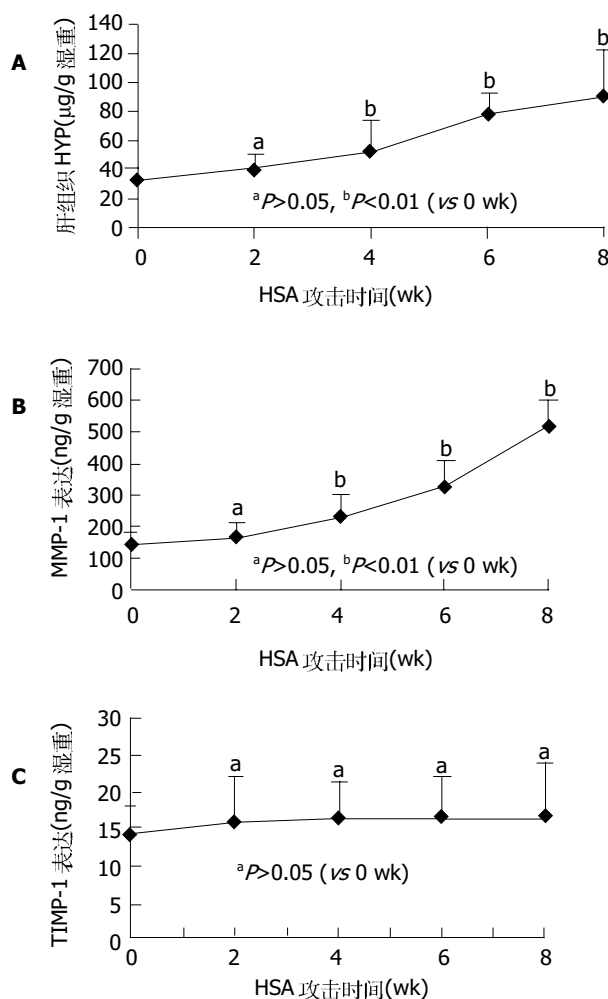


图1 免疫性肝纤维化形成过程中肝组织 HYP、MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达. A: HYP; B: MMP-1; C: TIMP-1.

2.3 肝组织 TIMP-1 表达, MMP-1/TIMP-1 比值与肝纤维化的关系 把0-8 wk 5组TIMP-1蛋白表达数值另按各大鼠的纤维化程度的不同重新分组:“-”组($n=13$), “+”组($n=6$), “++”组($n=10$), “+++”组($n=11$). 可以看出, 肝纤维化程度越重, 肝组织TIMP-1的蛋白表达也越高(图4). 把0-8 wk 5组MMP-1/TIMP-1比值也按各大鼠的纤维化程度的不同重新分组比较, 我们可以清楚地看到, 肝组织MMP-1/TIMP-1蛋白表达比值随着肝纤维化程度的加重反而逐渐减小(图5).

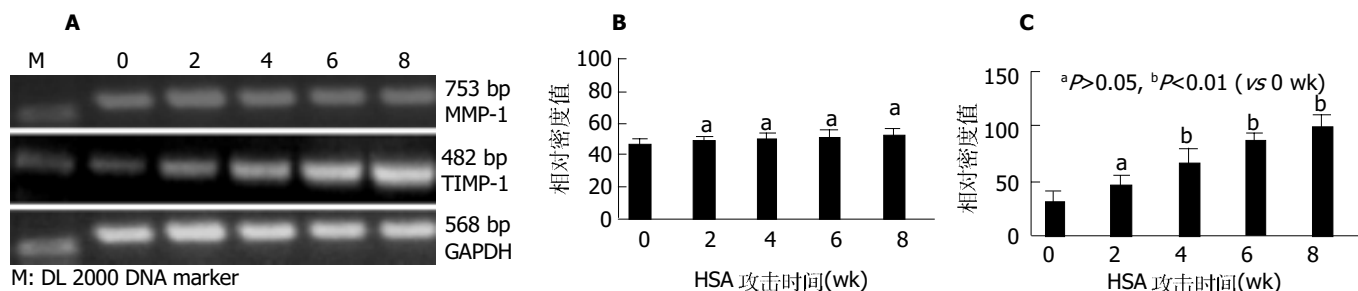


图2 免疫性肝纤维化形成过程中 MMP-1 和 TIMP-1 mRNA 的表达(半定量 RT-PCR, $n=3$). A: 凝胶电泳结果; B: MMP-1; C: TIMP-1.

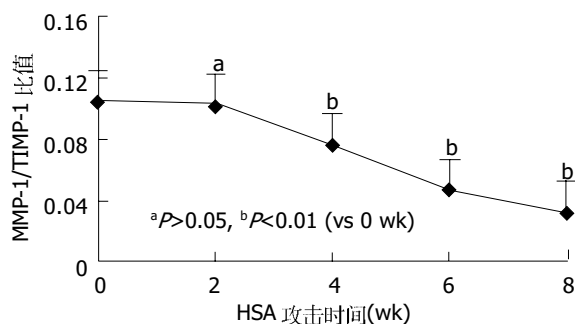


图3 免疫性肝纤维化形成过程中MMP-1/TIMP-1的比值.

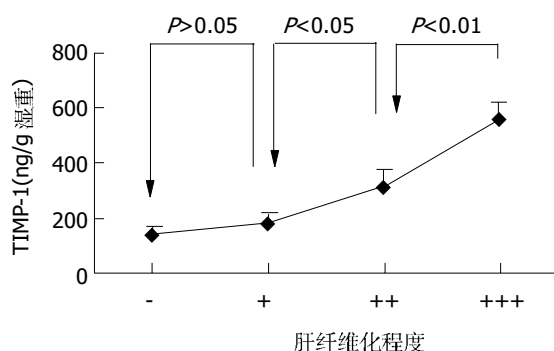


图4 肝组织TIMP-1蛋白表达与肝纤维化程度的关系.

3 讨论

在肝纤维化形成过程中, ECM 大量沉积, 尤以 I 型和 III 型胶原增生为主, 而正常肝组织中, 胶原纤维合成和溶解维持动态平衡, 只有当平衡失调时, 大量 ECM 沉积形成肝纤维化. MMP-1 是肝脏中分解 I 型及 III 型胶原的主要胶原酶, TIMP-1 是 MMP-1 的抑制因子, 通过与活化的 MMP-1 发生不可逆结合而发挥作用. 因此 MMP-1 和 TIMP-1 失衡, 在肝纤维化形成中起着重要的作用^[11-12]. 我们用大鼠免疫性肝纤维化模型, 通过 3 种染色观察成纤维细胞、I 型及 III 型胶原增生情况, 而肝组织羟脯氨酸含量测定被认为是判定肝纤维化程度的良好指标, 在通过上述检查密切监测以证实人血清白蛋白攻击所致免疫性肝纤维化进展过程的同时, 分别用 ELISA 和 RT-PCR 方法监测肝纤维化形成不同时期肝组织 MMP-1 及 TIMP-1 的蛋白表达和基因表达的动态变化. 结果表明, MMP-1 在正常肝组织有表达, 在肝纤维化发生、发展过程中(攻击后 2-6 wk)及肝硬化阶段(6-8 wk), 其蛋白表达和基因表达水平没有显著性变化;而在此过程中 TIMP-1 蛋白表达和基因表达水平逐渐增加, 到肝硬化阶段到达高峰. 这一结果与 Benyon *et al* 结果相似^[13-15], 但这些学者未进一步观察他们的动态改变. 由此看来, 导致大鼠免疫性肝纤维化形成的主要原因可能并不是因为 MMP-1 的表达逐渐减少, 而是由于 TIMP-1 进行性升高, 使 MMP-1 活性受到抑制. 因此,

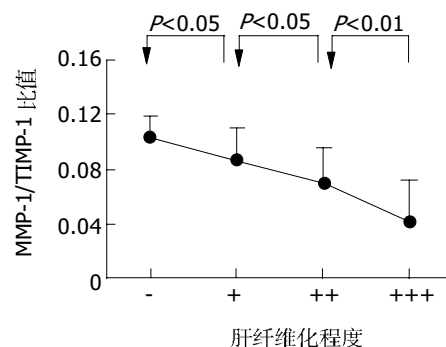


图5 肝组织MMP-1/TIMP-1比值与肝纤维化程度的关系.

可以推测在肝纤维化形成过程中, 是 TIMP-1 在起主要调节作用.

TIMP-1 是一种糖蛋白, 可抑制大部分 MMPs, 尤其是 MMP-1 活性. TIMPs 是特异性地与 MMPs 催化活性中心的锌离子结合, 封闭其催化活性, 而对 MMPs 起抑制作用. 许多细胞因子参与调节 TIMP-1 的合成与分泌^[16-17]. 一些调节 MMPs 的细胞因子也同样调节 TIMPs 的合成^[18]. Kordula *et al*^[19] 体外实验表明, 转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF- β), 血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF), 白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等均可以促进 TIMP-1 的合成, 可能为肝纤维化时 TIMP-1 水平升高的原因之一. 此外, 大量实验表明, HSC 的活化与增多可能为 TIMP-1 在肝纤维化形成时升高的又一原因^[20]. 活化的 HSC 不但产生大量的 ECM, 还通过分泌 MMPs 及 TIMPs 参与调节 ECM 的合成和降解. MMP-1/TIMP-1 比值的变化更能反映 ECM 合成和降解的平衡或失衡^[21-22]. 本结果显示, 在肝纤维化发生发展中 MMP-1/TIMP-1 比值逐渐下降, 说明基质合成和降解的平衡随着肝纤维化的进展逐渐失调而且加速了肝纤维化形成的进程. 此外, TIMP-1 蛋白表达与肝纤维化程度具有相关性, 随着肝纤维化程度的加重, 肝组织 TIMP-1 的蛋白表达也是增加的;而且, MMP-1/TIMP-1 比值与肝纤维化的程度呈负相关, 比值越小, 肝纤维化程度越重, 因此, 肝组织 TIMP-1 的蛋白表达和 MMP-1/TIMP-1 比值, 可以作为反映肝纤维化程度的指标. 以上结果表明, MMP-1/TIMP-1 在大鼠免疫性肝纤维化形成过程中所起的作用, 可能并不是因为 MMP-1 本身的变化而导致了胶原降解减少, 而是因为 TIMP-1 增多而抑制了 MMP-1 的作用, 二者比例的失调, 使纤维组织降解减少而沉积, 且这一作用持续存在, 促使纤维化的不断形成及加重, 最终导致肝硬化. 另外, 肝组织 TIMP-1 蛋白表达及 MMP-1/TIMP-1 蛋白表达比值分别与肝纤维化轻重程度具有相关性, 其他学者的研究提示血清中 MMP-1/TIMP-1 的含量比也与肝纤维化程度有密切关系^[23-27], 这为临床医生处理慢性肝

病提供了又一诊断、疗效判断和预后判断的手段^[28-31]。

4 参考文献

- Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-125
- Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992;14:455-463
- Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:43-54
- Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kitamura Y, Kawasaki H. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the liver of patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1997;26:1213-1219
- 杨长青, 王吉耀, 郭津生, 刘建军, 张弛. 大鼠基质金属蛋白酶-1 表达质粒对实验性肝纤维化的影响. *中华消化杂志* 2000;20:297-300
- Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- Akahoshi T, Hashizume M, Tanoue K, Shimabukuro R, Gotoh N, Tomikawa M, Sugimachi K. Role of the spleen in liver fibrosis in rats may be mediated by transforming growth factor β -1. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:59-65
- Blackwell JB. Cirrhosis resulting from repeated injection of antigen. *J Pathol Bacteriol* 1965;90:245-257
- 段志军, 李吉彦, 谭晨, 周仕壮, 王冬梅, 马晓凯, 杨洪涛, 白长川, 胡祥. 益气软肝方与肝刺激因子对大鼠免疫性肝纤维化保护作用的对照研究. *中医杂志* 2003;44:374-376
- Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human liver. *Hepatology* 1997;26:1521-1529
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabro A, Ciancio G, Stefanini F. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1994;144:528-537
- 杨长青, 胡国龄, 谭德明, 张铮. 基质金属蛋白酶-1、反义金属蛋白酶组织抑制因子-1 表达质粒对大鼠肝纤维化的影响. *中华传染病杂志* 2000;18:29-32
- Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996;110:821-831
- 杨长青, 胡国龄, 谭德明, 张铮. 实验性肝纤维化时 MMP-1、TIMP-1 的表达与 I、III 型胶原含量变化的关系. *临床肝胆病杂志* 2000;16:222-224
- Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 1991;266:14064-14071
- Roeb E, Graeve L, Hoffmann R, Decker K, Edwards DR, Heinrich PC. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by cytokines and dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures. *Hepatology* 1993;18:1437-1442
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-122
- Kordula T, Guttgemann I, Rose-John S, Roeb E, Osthus A, Tschesche H, Koj A, Heinrich PC, Graeve L. Synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human hepatoma cells (HepG2). Up-regulation by interleukin-6 and transforming growth factor beta1. *Febs Lett* 1992;313:144-147
- Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549
- Arthur MJ. Collagenases and liver fibrosis. *J Hepatol* 1995;22(2 Suppl):43-48
- Arthur M J, Mann DA, Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13(Suppl):S33-38
- Iredale JP, Goddard S, Murphy G, Benyon RC, Arthur MJ. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Lond)* 1995;89:75-81
- Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KH. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2000;46:183-192
- Holoman J, Glasa J, Galbavy S, Danis D, Molnarova A, Kazar J, Bednarova A, Misianik J. Serum markers of liver fibrogenesis, and liver histology findings in patients with chronic liver diseases. *Bratisl Lek Listy* 2002;103:70-75
- Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002;316:71-81
- Murawaki Y, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1. *Clin Chim Acta* 1999;281:109-120
- Zhang BB, Cai WM, Weng HL, Hu ZR, Lu J, Zheng M, Liu RH. Diagnosis value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood mononuclear cells for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2490-2496
- Flisiak R, Al-Kadasi H, Jaroszewicz J, Prokopowicz D, Flisiak I. Effect of lamivudine treatment on plasma levels of transforming growth factor beta1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and metalloproteinase-1 in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004;10:2661-2665
- Cai WM, Zhang BB, Weng HL, Hu ZR, Lv J, Zheng M, Liu RH. The diagnosis value of eight serum indices for liver fibrosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:219-222
- Luo YJ, Yu JP, Shi ZH, Wang L. Ginkgo biloba extract reverses CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:1037-1042

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

肝素酶表达鉴别良、恶性腹水无价值

蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 陈 陵, 王东旭

蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 陈陵, 王东旭, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038
蔡永国, 男, 1970-11-11 生, 山东沂水人, 汉族. 博士研究生, 发表论文 8 篇, 主要从事消化道肿瘤的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30200123

通讯作者: 杨仕明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心. shimingyang@yahoo.com
电话: 023-68754000-73057

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-10

Expression of heparanase mRNA is not a good predictive marker in differential diagnosis of ascites

Yong-Guo Cai, Dian-Chun Fang, Shi-Ming Yang, Yuan-Hui Luo, Ling Chen, Dong-Xu Wang

Yong-Guo Cai, Dian-Chun Fang, Shi-Ming Yang, Yuan-Hui Luo, Ling Chen, Dong-Xu Wang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30200123

Correspondence to: Dr. Shi-Ming Yang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. shimingyang@yahoo.com
Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-10

Abstract

AIM: To investigate the expression of human heparanase in the peritoneal membrane autopsy specimen and the exfoliative cells of ascites, and to assess its value in the differential diagnosis of malignant and benign ascites.

METHODS: Expression of heparanase mRNA in ascites was detected by RT-PCR in forty-seven patients. Heparanase protein expression in 37 biopsies of peritoneum was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: There was no difference in the expression of heparanase mRNA between benign and malignant ascites ($P>0.05$). Heparanase protein was expressed not only in tumor cells, but also in activated lymphocytes, epithelioid cells, and Langhans giant cells in tuberculosis peritonitis, as well as the heterotopic endometrium and interstitial cells in endometriosis. In those 36 cases detected by immunohistochemistry, no significant difference was found between benign and malignant ascites ($P>0.05$).

CONCLUSION: High expression of heparanase mRNA in some benign ascites may be due to the increase of

inflammatory cells in the peritoneum. Expression of heparanase mRNA in sedimentation of ascites is not a good predictive marker for the differential diagnosis of benign and malignant ascites.

Key Words: Heparanase mRNA; Ascites; Differential diagnosis

Cai YG, Fang DC, Yang SM, Luo YH, Chen L, Wang DX. Expression of heparanase mRNA is not a good predictive marker in differential diagnosis of ascites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1111-1114

摘要

目的: 研究腹水脱落细胞及腹膜活检标本中肝素酶的表达, 探讨肝素酶用于鉴别良、恶性腹水的可行性。

方法: 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 47 例腹水脱落细胞中肝素酶 mRNA 的表达, 同时利用免疫组织化学法检测肝素酶蛋白在 36 例腹膜活检标本中的表达, 与相关的临床资料进行分析。

结果: 肝素酶 mRNA 在良、恶性腹水脱落细胞中的表达无明显差异($P>0.05$)。在腹膜活检标本中, 肝素酶蛋白不仅存在于腹膜癌细胞中, 在结核性腹膜炎上皮样细胞、郎格罕巨细胞、淋巴细胞中及异位的子宫内膜细胞及其间质细胞中均有表达;免疫组织化学法检测腹膜组织中, 良、恶性腹水组之间的肝素酶阳性率亦无显著性差异($P>0.05$)。

结论: 肝素酶在良性腹水中的高表达可能与腹水脱落细胞中的炎性细胞增高有关。腹水脱落细胞中肝素酶 mRNA 的表达不能用于良恶性腹水的鉴别。

关键词: 肝素酶; 腹水; 鉴别诊断

蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 陈陵, 王东旭. 肝素酶表达鉴别良、恶性腹水无价值. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1111-1114
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1111.asp>

0 引言

肝素酶是近年来发现的能够降解基底膜及细胞外基质的关键酶, 具有促进肿瘤细胞向周围组织的间隙侵袭, 能促进多种类型肿瘤的浸润与转移。我们以往的研究表明, 肝素酶在胃癌组织中高表达, 能够促进胃癌血管的生成, 促进胃癌的浸润与转移, 是胃癌

患者预后不良的一个指标,但在邻近的正常组织中仅有较低的表达^[1].在腹水脱落细胞中肝素酶是否表达,能否用于鉴别腹水的性质尚未见报道,我们采用RT-PCR法检测肝素酶在腹水脱落细胞中的表达,探讨肝素酶在良、恶性腹水鉴别诊断中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-6/2003-12 腹水患者 47 例,男 13 例,女 34 例.年龄 17-77 (51 ± 14) 岁.其中 36 例患者经腹腔镜检查并病理组织学确诊.良性腹水 20 例,其中肝硬化腹水 7 例,结核性腹膜炎 9 例,心源性腹水 2 例,肾源性腹水 1 例,子宫内膜异位症 1 例.恶性腹水 27 例,其中转移性腺癌 25 例,腹膜间皮瘤 1 例,其他 1 例.取腹水 20-50 mL,离心取腹水脱落细胞,放入经二乙基焦碳酸酯 (DEPC) 处理过的 Ep 管内,置 -70℃ 低温冰箱保存备用.腹膜活检标本 36 例用 40 g/L 甲醇固定后,常规石蜡包埋切片. TriPure 分离试剂 (美国 Roche 公司); RT-PCR 试剂盒 (美国 Promega 公司); 肝素酶引物及 GAPDH 引物 (上海生物工程公司); PCR Marker (DGL-2000, 北京鼎国公司). 紫外分光光度计 (DU-6400 型, 美国 Bio-Rad 公司), PCR 扩增仪 (2400 型, 美国 PE 公司). XF-90 型暗箱式紫外透射仪 (美国 Sigma 公司), 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司).

1.2 方法

1.2.1 腹水细胞总 RNA 定量及肝素酶 mRNA 的 RT-PCR 检测 腹水 20-50 mL 经 1 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 收集离心后的沉淀, 采用 TriPure 抽提 mRNA. 操作方法按试剂说明进行. 将提取的总 RNA 用 DEPC 处理过的去离子水重悬 RNA 颗粒, 紫外分光光度计下进行核酸定量. RT-PCR 检测腹水脱落细胞中肝素酶 mRNA 的表达采用一步法. 肝素酶引物上游序列为: 5' TTC GAT CCC AAG AAG GAA TCA AC3'; 下游序列为: 5' GTA GTG ATG CCA TGT AAC TGA ATC3'. 以 GAPDH 为内参, 其上游引物序列为: 5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA 3'; 下游引物序列为: 5' TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC AC3'. RT-PCR 的操作步骤参照试剂盒说明进行. 扩增体积为 25 μL. 反应条件参照文献并加以优化: 48℃ 逆转录 45 min, 94℃ 变性 2 min, 53℃ 退火 1 min, 68℃ 延伸 2 min, 40 个循环; 68℃ 最终延伸 7 min. 反应产物加入溴酚蓝溶液 5 μL, 取 8 μL 在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察结果. 剩余反应物储存于 -20℃. 观察并照相.

1.2.2 腹膜组织肝素酶免疫组化染色 采用链霉菌素-生物素免疫组织化学染色 (SP) 法. 组织标本采用常规石蜡包埋, 制成 4 μm 厚切片; 二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、微波抗原修复; 30 mL/L H₂O₂ 去除内源性过

氧化物酶; 50 mL/L 羊血清封闭非特异性抗原; 加入一抗为兔抗人肝素酶 pAb, 1:50 稀释, 4℃ 过夜; 加入二抗为生物素化羊抗兔 mAb, 1:200 稀释, 室温 30 min; 加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (1:150 稀释); DAB 反应显色; 苏木素复染, 中性树胶封片. 以 PBS 代替一抗为阴性对照, 以已知肝素酶阳性的胃癌标本为阳性对照. 阳性染色的肿瘤细胞小于 30% 同类病变细胞为阴性, 大于 30% 为阳性, 其中 30-50% 为 (+), 50-80% 为 (++), >80% 为 (+++).

统计学处理 采用 SPSS 10.0 for windows 软件进行 χ^2 检验.

2 结果

2.1 不同类型腹水中肝素酶 mRNA 的表达 肝素酶阳性病例经 RT-PCR 扩增后呈 538 bp 的条带, GAPDH 扩增后为 598 bp 的条带. 47 患者中有 36 例肝素酶 mRNA 阳性表达, 总阳性率为 76.6%. 良性腹水共 20 例, 其中肝素酶阳性者 15 例 (75%), 良性腹水中, 肝硬化 7 例, 其中肝素酶阳性者 5 例, 均为肝炎后肝硬化, 另 2 例阴性者均为酒精性肝硬化, 结核性腹膜炎 9 例, 其中 8 例阳性, 心源性腹水 2 例, 其中 1 例为阳性, 肾源性腹水 1 例, 为阴性. 子宫内膜异位症 1 例为阳性. 恶性腹水 27 例中有 21 例阳性 (78%). 经统计学分析良性腹水与恶性腹水肝素酶的表达率不具有统计学差异 (75% vs 78%, $P > 0.05$, 表 1, 图 1).

表1 腹水脱落细胞肝素酶的表达

腹水类型	n	肝素酶	
		(+)	(-)
良性:结核性腹膜炎	9	8	1
肝硬化	7	5	2
心源性腹水	2	1	1
肾性腹水	1	0	1
子宫内膜异位症	1	1	0
恶性:转移性腺癌	25	19	6
腹膜间皮瘤	1	1	0
其他	1	1	0

$P > 0.05$.

2.2 腹膜活检标本中肝素酶蛋白的表达 (图 2) 肝素酶蛋白位于相应细胞的胞质中, 呈棕黄色, 细颗粒状着色. 在转移性腹膜腺癌的癌细胞、腹膜间皮瘤细胞、异位子宫内膜细胞及其间质细胞, 结核性腹膜炎的上皮样细胞、郎罕巨细胞、淋巴细胞尤其位于结核结节附近处染色明显增强. 腹腔镜腹膜活检标本

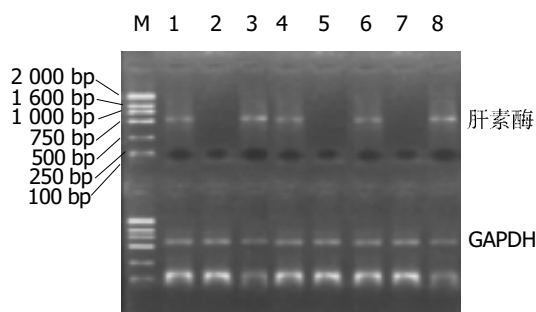


图1 腹水脱落细胞中肝素酶 mRNA 的表达. M: DGL2000 DNA Marker; 1-4: 恶性腹水, 5: 肾源性腹水, 6-8: 结核性腹水.

36 例的病例中, 腹膜癌 19 例(包括 1 例腹膜间皮瘤), 肝素酶阳性 18 例, 阳性率为 94.7%, 腹膜良性病变 17 例(其中腹膜结核 16 例, 子宫内腹异位症 1 例), 肝素酶阳性 14 例(包括 1 例子宫内腹异位症), 阳性率为 76.5%, 二者相比无显著差异($P>0.05$).

3 讨论

腹水是一种临床常见症状, 病因众多^[2], 很多恶性腹水的原发病灶常不明确, 腹水脱落细胞学检查常阴性, 临床对于良、恶性腹水的鉴别诊断有时较为困难, 经常需要联合多项腹水化验指标进行综合分析判断^[3-6]. 研究可用于腹水鉴别诊断的新指标具有非常重要的临床意义. 利用 RT-PCR 这一敏感的检测技术检测腹水脱落细胞中某些肿瘤相关基因可以提高恶性腹水的诊断率^[7]. 肝素酶基因是近年来发现的新的肿瘤相关基因, 其产物是参与细胞外基质及基底膜降解而促进癌细胞在人体内转移扩散的关键酶^[8-9]. 研究发现肝素酶在人

类多种肿瘤组织中均有表达, 能促进肿瘤的浸润与转移, 与肿瘤患者的不良预后相关^[10-15]. 我们发现肝素酶在胃癌组织中的阳性率为 74.5%, 而在癌旁组织中仅为 19.1%^[11]. 肝素酶在人肿瘤细胞高表达而在相应的正常组织中低表达为肝素酶有可能用于良、恶性腹水的鉴别提供了理论依据. 但亦有研究发现在人的炎细胞、免疫活性细胞以及 NK 细胞中均有肝素酶的表达, 在活化状态下的表达量可能会更高^[8], 因此, 肝素酶能否作为良、恶性腹水的鉴别指标有进一步研究的价值.

我们采用 RT-PCR 技术检测了腹水脱落细胞中肝素酶的表达, 发现恶性腹水脱落细胞中肝素酶的表达率为 78%, 提示肝素酶阳性可能与恶性肿瘤的转移有关, 但另一方面, 我们亦发现在良性腹水中肝素酶表达率为 75%, 二者相比无显著差异($P>0.05$). 我们进一步采用免疫组织化学法对 36 例腹膜活检标本中肝素酶蛋白的表达进行了检测, 发现肝素酶蛋白不仅表达于腹膜转移癌或者腹膜间皮瘤中, 而且在异位的生长的子宫内膜细胞及其间质细胞、结核结节附近的淋巴细胞及上皮样细胞、郎罕氏巨细胞中, 亦发现有肝素酶蛋白的表达, 统计学显示肝素酶在腹膜结核与腹膜癌之间的表达率不具有差异性($P>0.05$). 在子宫内膜及异位子宫内膜中均有肝素酶的表达, 多认为是一种子宫内膜的功能性变化, 亦有作者认为在子宫内膜异位症时有可能增加异位内膜的血管生成能力及转移能力^[16-18]. 本组 20 例良性腹水中, 肝素酶 mRNA 阳性为 15 例, 这些肝素酶阳性的良性腹水, 除 1 例子宫内膜异位症

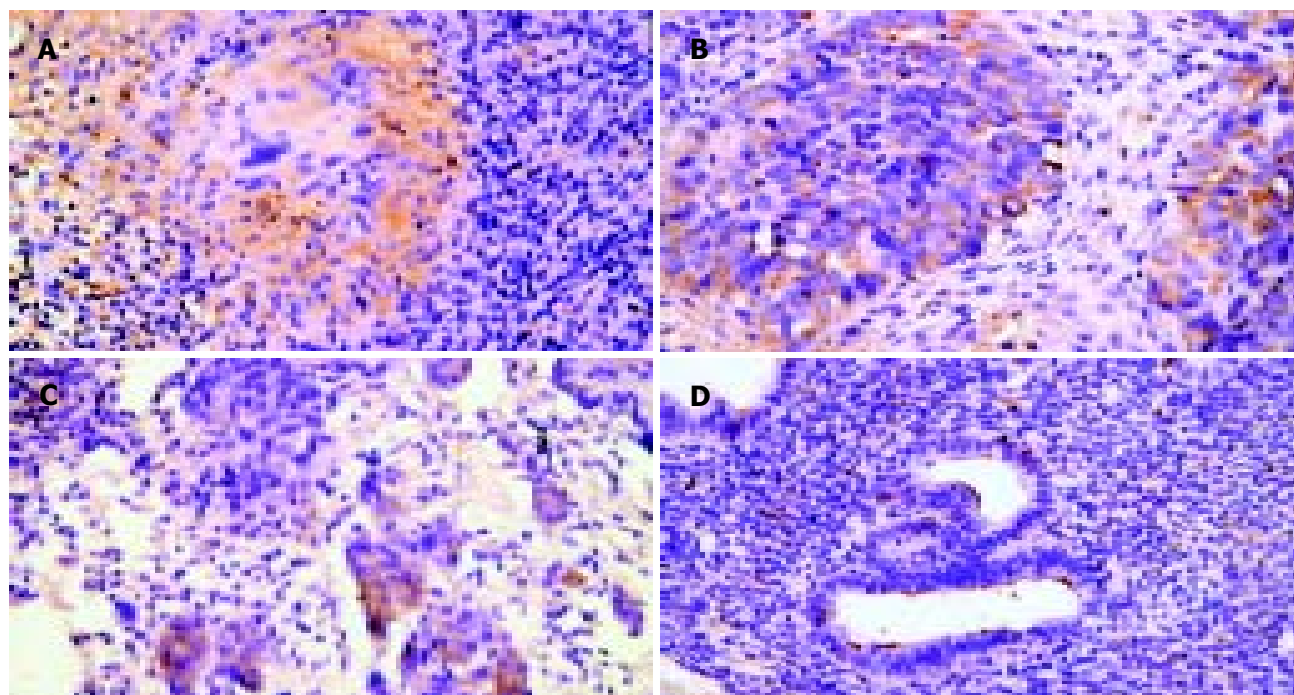


图2 腹膜活检标本中肝素酶蛋白的表达 SP × 200. A: 腹膜结核; B: 腹膜间皮瘤; C: 腹膜腺癌; D: 子宫内膜异位症.

患者外,其腹水常规检查都为渗出液(包括肝硬化者多合并有自发性腹膜炎),腹水中白细胞计数都超过 $0.5 \times 10^9/L$,因此,这些患者腹水中肝素酶mRNA和蛋白质的表达增高可能与其中的炎细胞增高并活化有关.综上所述,肝素酶在良、恶性腹水中均有较高的表达.炎性细胞在良性腹水中积聚及活化可能是良性腹水中肝素酶mRNA高表达的原因.检测腹水脱落细胞中肝素酶mRNA的表达对于鉴别良、恶性腹水没有应用价值.

4 参考文献

- 1 Cai YG, Fang DC, Yang SM, Luo YH, Yang MH, Wang DX. Increased expression of heparanase mRNA is correlated with metastasis of gastric carcinoma and is probably correlated with c-met protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2004;84:974-978
- 2 Bar-Meir S, Lerner E, Conn HO. Analysis of ascitic fluid in cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1979;24:136-144
- 3 Piura B, Rabinovich A, Leron E, Yanai-Inbar I, Mazor M. Peritoneal tuberculosis-an uncommon disease that may deceive the gynecologist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:230-234
- 4 Adam RA, Adam YG. Malignant ascites: past, present, and future. *J Am Coll Surg* 2004;198:999-1011
- 5 Torresini RJ, Prolla JC, Diehl AR, Morais EK, Jobim LF. Combined carcinoembryonic antigen and cytopathologic examination in ascites. *Acta Cytol* 2000;44:778-782
- 6 Gulyas M, Kaposi AD, Elek G, Szollar LG, Hjerpe A. Value of carcinoembryonic antigen (CEA) and cholesterol assays of ascitic fluid in cases of inconclusive cytology. *J Clin Pathol* 2001;54:831-835
- 7 Perez R, Zhang PJ. Detection of EWS-WTT fusion mRNA in ascites of a patient with desmoplastic small round cell tumor by RT-PCR. *Hum Pathol* 1999;30:239-242
- 8 Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, Aingorn H, Atzmon R, Ishai Michaeli R, Aviv A, Pecker I, Friedmann Y. Mamalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J* 2000;2(Suppl):37-45
- 9 Zcharia E, Metzger S, Chajek Shaul T, Friedmann Y, Pappo O, Aviv A, Elkin M, Pecker I, Peretz T, Vlodavsky I. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and mammary gland morphogenesis. *J Mamm Gland Biol Neop* 2001;6:311-322
- 10 Maxhimer JB, Quiros RM, Stewart R, Dowlatshahi K, Gattuso P, Fan M, Prinz RA, Xu X. Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer. *Surgery* 2002;132:326-333
- 11 El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1299-1305
- 12 Munenori T, Yoshio N, Takaomi O, Hirokazu U, Yasuhiro S, Futoshi U, Toshiyoshi F, Mehmet G, Hitoshi N, Motowo N, Noriaki T, Minoru H. Heparanase expression correlates with invasion and poor prognosis in gastric cancers. *Lab Invest* 2003;83:613-622
- 13 Koliopanos A, Friess H, Kleeff J, Shi X, Liao Q, Pecker I, Vlodavsky I, Zimmermann A, Buchler MW. Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer. *Cancer Res* 2001;61:4655-4659
- 14 Gohji K, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Katsuoka Y, Nakajima M. Heparanase protein and gene expression in bladder cancer. *J Urol* 2001;166:1286-1290
- 15 Ginath S, Menczer J, Friedmann Y, Aingorn H, Aviv A, Tajima K, Dantes A, Glezerman M, Vlodavsky I, Amsterdam A. Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001;18:1133-1144
- 16 Xu X, Ding J, Dmowski WP. Heparanase-1 gene expression and regulation in the endometrium from women with and without endometriosis during different phases of the cycle. *Fert Steri* 2004;82(Suppl 2):S76
- 17 Ding J, Xu X, Shen J, Braun DP, Rana N, Dmowski WP. Heparanase-1 expression in endometrium during menstrual cycle in healthy control women and in women with endometriosis. *Fert Steri* 2002;78(Suppl 1):S88
- 18 Zong LL, Ma L, Wang XN, Zhang JH, He YL. Expression of heparanase gene in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2004;39:24-26

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

世界华人消化杂志获得2003年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标,1999年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系,该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中。综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标,如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等,对期刊分学科进行综合打分。通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定,今年中国科学技术信息研究所评出了第三届中国百种杰出学术期刊,世界华人消化杂志 荣获2003年度百种中国杰出学术期刊称号。(世界胃肠病学杂志 2005-02-17)

家族性胆固醇结石患者肝组织HMGCR和SCP₂mRNA的表达

崔云峰, 崔乃强, 李东华, 张 琚

崔云峰, 崔乃强, 李东华, 天津市南开医院急腹症研究所 天津市 300100
张琚, 南开大学分子生物学研究所 天津市 300071

崔云峰, 男, 1973-7-5 生, 天津市人, 汉族, 1997 年获浙江大学医学学士学位,
2004 级天津医科大学博士生, 主治医师, 主要从事普通外科临床与科研工作。
天津市卫生局基金资助项目, NO. 03KY33

通讯作者: 崔乃强, 300100, 天津市南开区三纬路 122 号, 天津市南开医院
急腹症研究所。yunfengcuidocor@yahoo.com.cn
电话: 022-27022268-2241

收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-22

Expression of HMGCR, SCP₂ mRNA in hereditary cholesterol gallstone patients

Yun-Feng Cui, Nai-Qiang Cui, Dong-Hua Li, Ju Zhang

Yun-Feng Cui, Nai-Qiang Cui, Dong-Hua Li, Institute of Acute Abdominal Emergency, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China
Ju Zhang, Institute of Molecular Biochemistry, Naikai University, Tianjin 300070, China

Supported by the Foundation of the Tianjin Board of Health, No. 03KY33

Correspondence to: Nai-Qiang Cui, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China. yunfengcuidocor@yahoo.com.cn

Received: 2005-03-01 Accepted: 2005-03-22

Abstract

AIM: To investigate the expression of the genes for HMGCoA reductase (HMGCR) and sterol carrier protein-2 (SCP₂) in the livers of patients with hereditary and non-hereditary cholesterol gallstone, as well as non-cholesterol gallstone.

METHODS: The mRNA expression levels of the liver HMGCR and SCP₂ genes were determined by RT-PCR in 28 patients with hereditary cholesterol gallstone, 30 patients with non-hereditary cholesterol gallstone, and 32 patients with non-cholesterol gallstone.

RESULTS: The mRNA expression levels of HMGCR in hereditary and non-hereditary cholesterol gallstone patients were $1.9\,269 \pm 0.2\,134$ and $1.9\,791 \pm 0.2\,524$, respectively, both increased significantly ($P < 0.05$) as compared with that in the non-cholesterol gallstone patients ($0.7\,730 \pm 0.1\,530$). The levels of SCP₂ mRNA in hereditary and non-hereditary cholesterol gallstone patients were $0.8\,908 \pm 0.1\,649$ and $0.7\,503 \pm 0.1\,004$, both increased significantly ($P < 0.05$) as compared with non-cholesterol gallstone patients ($0.5\,205 \pm 0.1\,900$). Moreover, there was also a significant increase of SCP₂ mRNA in hereditary cholesterol gallstone

patients as compared with non-hereditary cholesterol gallstone patients ($P < 0.05$).

CONCLUSION: HMGCR and SCP₂ are overexpressed in cholesterol gallstone patients, which may be an important cause of cholesterol gallstones.

Key Words: Hereditary cholesterol gallstone; Liver; HMGCoA reductase; Sterol carrier protein-2

Cui YF, Cui NQ, Li DH, Zhang J. Expression of HMGCR, SCP₂ mRNA in hereditary cholesterol gallstone patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1115-1118

摘要

目的: 研究家族遗传性胆囊胆固醇结石患者、非家族遗传性胆囊胆固醇结石患者和非胆固醇结石患者肝组织 HMGCoA 还原酶(HMGCR)、固醇携带蛋白 2 (SCP₂) 基因 mRNA 的表达情况, 进而明确二者在胆石形成中的作用。

方法: 选取 2003-08/2004-08 天津市南开医院外科住院病例 90 例, 均取得患者及家属知情同意, 其中家族遗传性胆囊胆固醇结石患者 28 例, 非家族遗传性胆囊胆固醇结石患者 30 例, 非胆固醇结石患者 32 例, 术中肝活检, 行肝组织总 RNA 提取, 逆转录反应合成 cDNA, 设计引物, 进行聚合酶链反应(PCR)扩增 HMGCR 和 SCP₂ 基因的目的片段, 检测肝组织 mRNA 的表达水平的不同。

结果: 家族遗传性和非家族遗传性胆固醇结石组 HMGCR, SCP₂ mRNA 表达水平较非胆固醇结石组升高; 其中 HMGCR mRNA 表达在家族遗传性胆固醇结石组为 $1.9\,269 \pm 0.2\,134$, 非家族遗传性组为 $1.9\,791 \pm 0.2\,524$, 二者均高于非胆固醇结石组 $0.7\,730 \pm 0.1\,530$, 差异有显著性($P < 0.05$); SCP₂ mRNA 表达在家族遗传性胆固醇结石组为 $0.8\,908 \pm 0.1\,649$, 非家族遗传性组为 $0.7\,503 \pm 0.1\,004$, 二者均高于非胆固醇结石组 $0.5\,205 \pm 0.1\,900$, 差异有显著性($P < 0.05$); 家族遗传性胆固醇结石 SCP₂ mRNA 表达水平较非家族遗传性胆固醇结石组升高, 差异有显著性($P < 0.05$), 而 HMGCR mRNA 在家族遗传性和非家族遗传性胆固醇结石组两组间无统计学差别。

结论: 胆囊胆固醇结石患者肝组织 HMGCR, SCP₂ mRNA 表达水平升高是胆囊胆固醇结石形成的重要原因。

关键词: 家族性胆固醇结石; 肝; HMGCoA 还原酶; 固醇携带蛋白 2

崔云峰, 崔乃强, 李东华, 张璐. 家族性胆固醇结石患者肝组织 HMGCR 和 SCP₂mRNA 的表达. 世界华人消化杂志. 2005;13(9):1115-1118
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1115.asp

0 引言

胆汁胆固醇高分泌, 生成致石性胆汁, 是胆囊胆固醇结石形成的重要原因. HMGCoA 还原酶是肝脏胆固醇合成的限速酶, 其活性增高, 则肝脏合成胆固醇增多, 可使胆汁中胆固醇饱和指数上升. SCP₂ 为可溶性碱性蛋白^[1]. 作为胆固醇代谢的调节因子, 参与胆固醇的生物合成和胆固醇向胆汁酸、胆固醇酯及类固醇激素的转化; 另作为胆固醇转运器, 参与细胞内、质膜间胆固醇的运输^[2-4]. 在本实验中我们研究了具有家族遗传背景的胆囊胆固醇结石患者、散发性结石患者和非结石患者肝组织 HMGCR, SCP₂ 基因的表达情况. 试图探讨在家族遗传背景下和散发条件下 HMGCR, SCP₂ 基因表达情况的改变, 从而揭示二者在胆石形成中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 家族遗传性胆囊胆固醇结石组为^[5], 3代血缘亲属中至少2代, 而且每代中至少有1例胆固醇结石患者, 结石中胆固醇含量>50%. 散发性结石组为胆囊结石患者, 结石中胆固醇含量>50%. 对照组为原发性肝内胆管结石患者, 结石中胆固醇含量<20%; 胃、十二指肠溃疡、胃癌、结肠癌等超声证实无胆石患者. 患者及家属知情同意. 排除标准: 对胆固醇代谢可能有影响的疾病、生理状态和饮食生活因素, 如肥胖、内分泌病、酗酒、某些药物等. 2003-08/2004-08 南开医院外科住院家族遗传性胆囊胆固醇结石患者28例, 女15例, 男13例, 年龄25-80岁; 散发性结石患者30例, 女16例, 男14例, 年龄20-80岁; 对照组32例, 女16例, 男16例, 年龄15-78岁. 两组患者的年龄及体重指数BMI (kg/m²) 无显著差别 ($P>0.05$). 术中活检约5 mm³ 肝组织, 立即放入液氮保存. Taq DNA 聚合酶, 购自北京金世纪生物公司; N₆ 随机引物, Sagon 公司合成; M-MLV 逆转录酶和 Trizol 试剂购于 GIBCO 公司; 引物由北京奥科生物技术有限公司合成; 结石中胆固醇含量用 Centric 公司生化试剂盒测定.

1.2 方法 采用 Trizol 法提取肝组织总 RNA 的, 新鲜组织标本在液氮中研磨, Trizol 匀浆后行 RNA 提取, 所得 RNA 进行浓度、纯度和完整性的检测. 取 RNA 1 ug 用 M-MLV 进行逆转录反应, 逆转录反应条件为 37℃ 水浴中反应 2 h, 所得 cDNA 用于 PCR 扩增, 产物置 -20℃ 冻存备用. 扩增目标引物见表 1.

表1 PCR 扩增目标 cDNA 所用引物

基因名称	引物序列5'→3'	扩增片段bp
β ₂ -Microglobulin	上游 ATG CCT GCC GTG TGA ACC ATGT	285
	下游 AGA GCT ACC TGT GGAGCAACCT	
GAPDH	上游 GGG GAG CCA AAA GGG TCA TCA TCT	457
	下游 GAC GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG	
HMGCR	上游 TACCATGT CAGGGGTACGTC	247
	下游 CAAGCCTAGAGACATAATCATC	
SCP2	上游 ATGGGTT TTC CG GAAGCCGCCAGTT	432
	下游 TCAGAGCTTAGCGTTGCCT GGCTG	

PCR 反应条件为第1组: HMGCR/GAPDH 94℃, 3 min⇒(94℃, 90 s→5℃, 60 s→72℃, 60s)×28⇒72℃, 7 min; 内参照 GAPDH 的 PCR 条件同 HMGCR 基因, 循环数为 22. 第2组: SCP₂/β₂-微球蛋白 94℃, 3 min⇒(94℃, 60 s→58℃, 60 s→72℃, 60 s)×22⇒72℃, 7 min; 内参照 Microglobulin 的 PCR 条件同 SCP₂ 基因, 循环数为 21. 将 PCR 产物加样于 2 g/L 琼脂糖凝胶中, 电泳后在凝胶成像分析系统中分析目的基因 PCR 产物条带的灰度值及相应的内参照 PCR 产物条带的灰度值, 以二者的比值反映原始样品中目的基因 mRNA 的水平. 结石中胆固醇含量测定采用 Andrew K Diehl 方法^[6].

统计学处理 应用 SPSS10.0 统计软件, 计量资料以 mean±SD 表示, 数据处理采用单因素方差分析, 两组间比较采用 HSD 检验.

2 结果

家族遗传性和非家族遗传性胆固醇结石组 HMGCR mRNA 表达水平较非胆固醇结石升高, 差异有显著性, $P<0.05$, 图1; 但家族遗传性和非家族遗传性胆固醇结石组两组间无统计学差别 $P>0.05$, 表1. 家族遗传性和非家族遗传性胆固醇结石组 SCP₂ mRNA 表达水平较非胆固醇结石增高, 差异有显著性, $P<0.05$, 图2; 家族遗传性胆固醇结石组 SCP₂ mRNA 表达水平高于非家族遗传性胆固醇结石组, 差异有显著性, $P<0.05$, 表2.

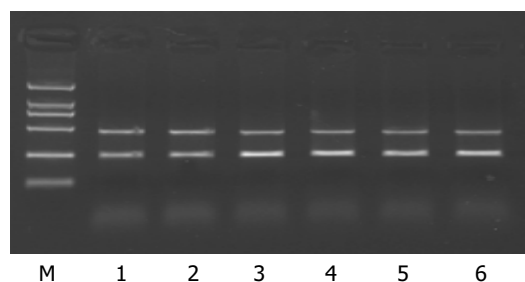


图1 肝组织 HMGCR mRNA 的表达. 1, 2 对照组; 3, 4 非家族遗传性胆固醇结石组; 5, 6 家族遗传性胆固醇结石组; 前 GAPDH, 457 bp; 后 HMGCR, 247 bp.

表2 胆固醇结石患者肝组织 mRNA 表达水平

	n	HMGCR/GAPDH Mrna A值比	SCP ₂ /Micro mRNA A值比
家族遗传性组	28	1.9269 ± 0.2134 ^a	0.8908 ± 0.1649 ^{ac}
非家族遗传性组	30	1.9791 ± 0.2524 ^a	0.7503 ± 0.1004 ^a
对照组	32	0.7730 ± 0.1530	0.5205 ± 0.1900

^aP<0.05 vs对照组, ^cP<0.05 vs非家族遗传性组.

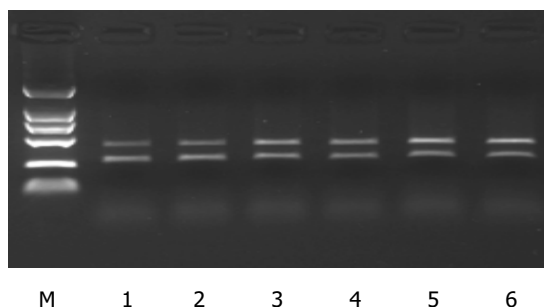


图2 肝组织SCP₂ mRNA的表达. 1, 2 对照组; 3, 4 非家族遗传性胆固醇结石组; 5, 6 家族遗传性胆固醇结石组;前SCP₂, 432 bp;后Microglobulin, 285 bp.

3 讨论

胆囊胆固醇结石的形成是一个多因素参与的复杂病变过程, 国内外关于胆囊胆固醇结石发病机制的研究由70年代Admirand和Small基于热力学的生物化学理论已经发展为多种因素综合作用的学说^[7], 其中肝脏胆固醇代谢异常致胆汁中胆固醇过饱和, 是结石形成的首要和最重要条件之一. 目前遗传因素在胆固醇结石致石性胆汁形成中的作用研究日益受到国内外学者的重视, Pima印第安人和部分西方国家人群胆囊结石发生率高; 单卵双生者胆汁胆固醇饱和度往往相似, 这些现象提示胆石病具有遗传特征^[8]. 现多数学者认为胆石病是一种具有遗传倾向的多基因遗传病, 具有常染色体显性延迟遗传特点, 多个基因的微效累积作用及后天的环境因素在其发病过程中起重要作用^[9-11]. Paigen *et al*^[12]通过对结石易感小鼠C57L/J和抗结石形成小鼠AKR/J两个株系进行遗传分析, 认为不只一个基因影响结石形成. 现已发现有许多遗传位点作用于胆汁胆固醇的过饱和、成核和胆囊的收缩, 已知染色体定位和功能的45个基因可以归纳成6类胆石病的候选基因, 但他们与胆固醇结石的确切关系需要进一步验证^[13].

HMGCoA还原酶活性增高, 肝脏合成胆固醇增多, 可使胆汁中胆固醇饱和指数上升^[14]. 人的HMGCoA还原酶的基因位于第13号染色体上, 其cDNA长约45 kb, 编码的HMGCoA还原酶具有888个氨基酸序列, 其中339个氨基酸序列为膜结合部位, 439个氨基酸为酶催化部位, 另有110个氨基酸连接部位, 并经分析, 人

与仓鼠的HMGCoA还原酶的cDNA具有高度同源性^[15]. Shoda *et al*^[16]发现胆石症患者的HMGCoA还原酶活性比一般人群要高, 他们认为HMGCoA还原酶基因水平上升是导致胆石症的重要原因. 但Khanuja *et al*^[17]研究了九系胆石症发病率不同的小鼠, 发现易患胆石症的C57L, SWR和A系小鼠的HMGCoA还原酶的mRNA水平没有下降, 而抗胆石症的SM, AKR, DBA/2系小鼠HMGCoA还原酶的mRNA水平显著降低; 甾醇调节元件结合蛋白(SREBP)可能是HMGCoA还原酶基因的调节因素^[18]. 对于HMGCR活性与胆石形成关系的争论较大, 部分学者认为结石易感小鼠HMGCR mRNA表达水平升高, 而在抗结石形成小鼠HMGCR mRNA表达水平变化不明显. 我们的实验发现胆固醇结石患者肝组织HMGCoA还原酶 mRNA表达水平较非胆固醇结石升高, 差异有显著性各组比较($F = 22.256$, $P < 0.05$); 与Shoda *et al*结果一致, 即胆石症患者的HMGCoA还原酶活性比一般人群要高, 并且mRNA水平也显著高于一般人群. 我们认为HMGCoA还原酶基因水平上升必然导致肝脏胆固醇合成增加, 使致石性胆汁出现, 导致胆石症的发生. 然而, 由于在家族遗传性和非家族遗传性胆固醇结石患者间其基因表达未发现明显差别, 所以他在遗传中的作用有待进一步研究.

SCP₂基因与SCP_x基因在结构上重叠相连, 为一聚合基因(fusion gene), 常称为SCP₂/SCP_x基因. 哺乳动物的SCP₂/SCP_x基因具有高度保守性^[19]. SCP₂/SCP_x基因定位于人类染色体1p32, 全长约80 kb, 包含16个外显子和15个内含子, 已鉴定出多个转录起始点^[20]. SCP₂是一种分子量为13.2 ku的可溶性碱性蛋白, 最早从小鼠肝脏中被分离纯化, 且被证实肝脏中含量最高, 主要存在于肝脏的过氧化物酶体(peroxisome)、内质网、线粒体、溶酶体和胞质中. Lyons *et al*^[21]观察到肝细胞瘤细胞过氧化物酶体中胆固醇浓度是正常小鼠肝细胞的10倍, SCP₂浓度(2.5 μg/mg)却远低于对照组(8 μg/mg), 但体外培养动脉粥样硬化形成中巨噬细胞和动脉平滑肌细胞都观察到细胞内游离胆固醇浓度的升高与SCP₂mRNA、SCP₂同步升高现象, 故推测细胞内高浓度胆固醇决定了SCP₂基因的表达水平. 动物实验证实SCP₂在新合成的胆固醇转运至胆汁的过程中是必不可少, 并能将肝脏新合成的胆固醇直接从内质网快速转运至胆汁, 而不需细胞微管系统和高尔基体的介入^[22]. Wang *et al*^[23]观察到在结石易感小鼠中SCP₂ mRNA与SCP₂同步升高现象, 认为是SCP₂转录的上调导致了SCP₂含量的增多, 从而导致肝脏胆固醇和胆汁胆固醇浓度升高, 促进结石形成. 对易感小鼠的进一步研究发现在结石形成过程中Lith 1基因导致了SCP₂ mRNA和SCP₂的过度表达. 在实验中, 我们检测到SCP₂ mRNA表达在胆固醇结石患者明显较对照

组为高($F = 11.089$ $P < 0.05$), 与 Fuchs, Wang *et al* 在结石易感小鼠观察到结果不谋而合, 也与我们以往结果相同^[24]; 目前认为 SCP₂ 可通过以下机制参与致石性胆汁形成: 促进 7-脱氢胆固醇生成胆固醇^[25-26]; 抑制 C7H 活性减少胆固醇向胆汁酸的转化^[27]; 抑制 ACAT 活性减少胆固醇向胆固醇酯转化; 提高 LDL-c 来增加肝细胞胆固醇浓度. 因此我们认为: SCP₂ 作用的结果是胆汁中胆固醇含量增加和胆汁酸含量减少, 形成致石性胆汁, 为胆固醇析出结晶并最终形成结石提供了必需条件. 我们同时发现家族遗传性胆固醇结石组 mRNA 表达水平高于非家族遗传性胆固醇结石组, 差异有显著性($P < 0.05$); 因此我们设想 SCP₂ 可能在胆石病的遗传中起一定的作用.

总之, 我们认为: 胆囊胆固醇结石患者肝组织 HMGCR, SCP₂ mRNA 表达水平升高, 因此 HMGCR, SCP₂ 基因表达上调可能是胆囊胆固醇结石形成的重要原因; SCP₂ 基因表达水平上调则可能在胆石病遗传中起一定作用; 进一步验证了“肝脏是致石性胆汁产生的主要部位, 其在胆石形成中占有重要地位; 而且遗传因素在胆石病的发病中占有重要地位”这一假说.

4 参考文献

- Stolowich NJ, Petrescu AD, Huang H, Martin GG, Scott AI, Schroeder F. Sterol carrier protein-2: structure reveals function. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:193-212
- Atshaves BP, Storey SM, McIntosh AL, Petrescu AD, Lyuksyutova OI, Greenberg AS, Schroeder F. Sterol carrier protein-2 expression modulates protein and lipid composition of lipid droplets. *J Biol Chem* 2001;276:25324-25335
- Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, McIntosh AL, Petrescu AD, Schroeder F. Sterol carrier protein-2 expression alters plasma membrane lipid distribution and cholesterol dynamics. *Biochemistry* 2001;40:6493-6506
- Gallegos AM, Schoer JK, Starodub O, Kier AB, Billheimer JT, Schroeder F. A potential role for sterol carrier protein-2 in cholesterol transfer to mitochondria. *Chem Phys Lipids* 2000;105:9-29
- 费健, 韩天权, 张圣道, 蒋兆彦, 姜志宏, 张奕, 蔡杏兴. 胆囊结石病家系载脂蛋白 E 基因型分析. *外科理论与实践* 2001;6:142-145
- Diehl AK, Schwesinger WH, Holleman DR Jr, Chapman JB, Kurtin WE. Clinical correlates of gallstone composition: distinguishing pigment from cholesterol stones. *Am J Gastroenterol* 1995;90:967-972
- Portincasa P, Moschetta A, Calamita G, Margari A, Palasciano G. Pathobiology of cholesterol gallstone disease: from equilibrium ternary phase diagram to agents preventing cholesterol crystallization and stone formation. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003;3:87-68
- Kosters A, Jirsa M, Groen AK. Genetic background of cholesterol gallstone disease. *Biochim Biophys Acta* 2003;1637:1-19
- 陶太珍, 沈靖, 姚才良, 谭永飞, 杨松, 彭俊, 黄晓莉. 胆石症家族聚集性的病因和流行病学研究. *中国公共卫生* 1999;15:293-295
- 费健, 韩天权, 蒋兆彦, 姜志宏, 张奕, 蔡杏兴, 张圣道. 胆囊结石病家系遗传特征的初步研究. *肝胆胰外科杂志* 2002;14:4-6
- 杨松, 谭永飞, 喻荣彬, 彭俊, 沈靖, 姚才良. 胆石病家族聚集性及遗传方式的研究. *中华流行病学杂志* 1999;20:293-295
- Paigen B. Genetics of responsiveness to high-cholesterol diets in the mouse. *Am J Clin Nutr* 1995;62:458-462
- Lammert F, Carey MC, Paigen B. Chromosomal organization of cadiate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology* 2001;120:221-238
- Roglans N, Vazquez-Carrera M, Alegret M, Novell F, Zambon D, Ros E, Laguna JC, Sanchez RM. Fibrates modify the expression of key factors involved in bile-acid synthesis and biliary-lipid secretion in gallstone patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;59:855-861
- Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme-A(HMG-CoA)reductases. *Genome Biol* 2004;5:248
- Shoda J, He BF, Tanaka N, Matsuzaki Y, Yamamori S, Osuga T. Primary dual defect of cholesterol and bile acid metabolism in liver of patient with intrahepatic calculi. *Gastroenterology* 1995;108:1534-1537
- Khanuja B, Cheah YC, Hunt M, Nishina PM, Wang DQ, Chen HW, Billheimer JT, Carey MC, Paigen B. Lith1, a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7729-7733
- Field FJ, Born E, Mathur SN. Fatty acid flux suppresses fatty acid synthesis in hamster intestine independently of SREBP-1 expression. *J Lipid Res* 2003;44:1199-1208
- Atshaves BP, Storey SM, Schroeder F. Sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x expression differentially alters fatty acid metabolism in L cell fibroblasts. *J Lipid Res* 2003;44:1751-1762
- Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, McIntosh AL, Martin GG, Chao H, Kier AB, Schroeder F. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog Lipid Res* 2001;40:498-563
- Lyons HT, Kharroubi A, Wolins N, Tenner S, Chanderbhan RF, Fiskum G, Donaldson RP. Elevated cholesterol and decreased sterol carrier protein-2 in peroxisomes from AS-30D hepatoma compared to normal rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1991;285:238-245
- Puglielli L, Rigotti A, Greco AV, Santos MJ, Nervi F. Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1995;270:18723-18726
- Fuchs M, Lammert F, Wang DQ, Paigen B, Carey MC, Cohen DE. Sterol carrier protein 2 participates in hypersecretion of biliary cholesterol during gallstone formation in genetically gallstone-susceptible mice. *Biochem J* 1998;336(Pt 1):33-37
- 张淑坤, 崔乃强, 李东华, 张艳萍, 汤新之. 胆囊胆固醇结石患者肝组织固醇携带蛋白 2 mRNA 的表达. *中华肝胆外科杂志* 2003;9:423-425
- Amigo L, Zanlungo S, Miquel JF, Glick JM, Hyogo H, Cohen DE, Rigotti A, Nervi F. Hepatic overexpression of sterol carrier protein-2 inhibits VLDL production and reciprocally enhances biliary lipid secretion. *J Lipid Res* 2003;44:399-407
- Bonne AC, den Bieman MG, Gillissen GF, van Lith HA, van Zutphen LF. Chromosomal localization of genes involved in biosynthesis, metabolism or transport of cholesterol in the rat. *Cytogenet Genome Res* 2002;97:183-186
- Hirai A, Kino T, Tokinaga K, Tahara K, Tamura Y, Yoshida S. Regulation of sterol carrier protein 2 (SCP2) gene expression in rat peritoneal macrophages during foam cell formation. A key role for free cholesterol content. *J Clin Invest* 1994;94:2215-2223

肝癌特异性 GGT 诊断肝癌的研究进展

沈卫东, 黄介飞

沈卫东, 黄介飞, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
通讯作者: 沈卫东, 226001, 江苏省南通市西寺路 20 号, 南通大学附属医院
消化内科, shenwd2003@yahoo.com.cn
电话: 0513-5052078
收稿日期: 2005-03-06 接受日期: 2005-04-01

摘要

γ -谷氨酰转移酶(γ -glutamyltransferase, GGT)及其同工酶作为肝癌的标记物日益受到重视, GGT- II 已成为 AFP 以外的最佳肝癌标志物, 并在检测方法和临床应用等方面有了较多新的进展. 本文就 GGT 基因的分子结构和基因构成、肝内分布特点及肝癌时的异常表达机制、检测及临床价值等作一综述.

沈卫东, 黄介飞. 肝癌特异性 GGT 诊断肝癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1119-1122
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1119.asp>

0 引言

肝细胞性肝癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤, 早期诊断对治疗和预后极为重要. 肝癌早期诊断标志物较多, 但目前尚无一种标志物能诊断所有肝癌^[1-3]. 其中人体 γ -谷氨酰转移酶(γ -glutamyltransferase, GGT)及其同工酶作为肝癌的标记物日益受到重视.

1 GGT 分子结构

GGT 分子由大小两个亚基组成, 大亚基(重链)由 351 个氨基酸残基组成, 小亚基(轻链)由 189 个氨基酸残基组成. 重链前有一单一肽链(信号肽), 他由 27 个氨基酸残基组成, 该链为脂溶性的, 他将 GGT 固定在细胞膜上. GGT 大小亚基上分别有糖基化位点和酶活性中心, 在大亚基上有六个 N-糖基化位点, 小亚基上有一糖化位点. 酶活性中心位于小亚基上. GGT 有非磷酸依赖性谷氨酰酶活性, 表明该酶有谷氨酰胺结合位点. 肝癌 GGT 等电点为 3.8.

GGT 在本质上是一种含天冬氨酸的 N-连接的糖蛋白, 正常肝脏含有完整的 Gal11-4GlcNAc 外型糖链, 但在肝细胞癌变时, 表达的 GGT 却有一种独特的糖链结构, 主要表现为合成的糖链不全, 往往含有缺乏半乳糖(Gal)的外型糖链^[4]. 应用聚丙烯酰胺电泳可将 GGT 分成 1-12 条同工酶区带, 传统观点认为这些同工酶的区别在于糖链结构的异常, 即所谓天线结构的区别, 造成了在电泳上迁移率的不同, 而他们蛋白质一级结构相同. Pettersen *et al*^[5]通过对肝转移癌和正常肝脏组织对比研究也认为, 他们之间的糖基化作用有明显的异质性. 这些同工

酶在功能上有无差异目前尚不清楚.

2 GGT 基因

研究表明, 人 GGT 基因属于一个多基因家族, 目前认为至少有 7 种基因, 以适应高度生理变异及不同生理状态下的表达^[6]. 对于这些不同基因之间和电泳所出现的同工酶之间的关系有待进一步研究. GGT 基因大多位于 22 号染色体上, 存在着一个 q11-qter 的 BCR 基因相关区域, 编码有效的 GGT. 通过对人肝癌组织(HepG)克隆的 GGT cDNA 研究显示, 他长约 2 326 bp, 由 1707 个核苷酸组成, 可编码 569 个氨基酸组成的肽链; 5' -末端非编码区域(5' -NC 区)有 487 个核苷酸; 3' -末端(3' -NC 区)由 132 个核苷酸组成并含有 AAT AAA 结构. 目前认为人 GGT 基因至少编码以下几种 mRNA: (1) GGT I mRNA: 主要编码人体正常组织的 GGT, 并且具有组织特异性. (2) 去除了顶端结构的 GGT I mRNA: 主要编码 GGT 轻链. (1) 和 (2) 是同一种基因的转录产物. (3) GGT II mRNA: 主要在肝脏中表达. (4) GGT III mRNA: 是另外一个去除了顶端的基因转录产物, 其基因结构尚不清楚. 目前研究较多的为 GGT I mRNA, 他主要存在于胰腺、胎肝、胎盘、肺以及肝癌组织细胞中, 不同组织中的 GGT I mRNA 可读框架(open reading frame, ORF)相同, 主要的区别在于其 5' -NC 区. 在 5' -NC 区, 至少存在着 8 种外显子, 他们的可变剪接调控着 GGT I mRNA 在不同组织中的表达^[7]. 而 Holic *et al*^[8-9]认为在肝胚胎细胞分化的不同阶段, GGT I 基因的表达受到不同启动子的驱使和调控, 并产生不同的 mRNA.

3 肝癌动物模型与 GGT 研究

动物实验中, 常以 2-乙酰氨基苄(2-FAA)等偶氮化学致癌剂喂饲雄性 SD(Sprague Dawley)大鼠或 Wistar 大鼠建立肝癌模型. 用化学致癌剂诱发鼠肝癌后, GGT 活性明显上升, 免疫组化示肝内胆小管、癌细胞膜以及胞质中见到大量的 GGT 存在, 同时在同工酶区带上出现与胚胎肝 GGT 相似的条带. 有学者用 2-FAA 喂饲 SD 大鼠诱发肝癌后, 发现鼠肝可溶性 GGT、膜结合性 GGT、总 GGT 均显著增加, 肝组织中总 RNA 水平也明显升高. Ha *et al*^[10]也发现在致肝癌的大鼠中, 随着肿瘤增大, GGT 表达也随之增强.

4 GGT 肝内异常表达的特点及机制

GGT 广泛分布于体内, 以肾脏、肝脏、胰腺、小肠等

脏器最为丰富, 其中又以肾脏活性最高. 但血清中GGT多来自于肝脏^[11], 细胞内GGT与血清中的GGT之间的关系尚不清楚. GGT在体内催化谷胱甘肽及其结合物的降解, 生成半胱氨酰甘氨酸和 γ -谷氨酰残余物, 是 γ -谷氨酰循环中的一个关键酶^[12]. 有研究表明, 口服抗氧化剂与血清中GGT在正常范围内有剂量-效应关系, 血清中GGT水平与氧化应激有一定关系^[13]. 人类GGT在胚胎期活性较高, 出生后迅速下降至低水平. 在肝脏内主要存在于分泌和吸收功能强的细胞膜上, 如胆管上皮、肝内胆小管等的细胞边缘. 肝组织中GGT有可溶性(亲水性)和膜结合性(疏水性)两种形式, 并以前者为主. 肝癌形成过程中, 不同分子形式可溶型和膜结合型GGT亦呈同步升高趋势, 且可溶型GGT与总GGT比值恒定于0.51-0.65.

在癌变的肝组织中, GGT重新大量表达, 表现出胎肝的特点. 在外周血清中出现特异性同工酶区带. GGT在肝内的异常表达与HCC的发生和进展有着密切联系, 已成为HCC早期诊断指标之一. 但是在癌变过程中, GGT异常表达的机制尚不清楚. Lee *et al*^[13]认为, 肝脏的癌前病变组织中, GGT催化下的谷胱甘肽代谢可能触发氧化损伤, 这种损伤可能与病变组织向恶性转化有关. Yao *et al*^[14]通过从肝癌组织中提取纯化总RNA, 以RT-PCR扩增GGT基因, 对M3位点的酶切分析发现, 在肝癌、癌周和远癌组织中M3位点甲基化程度均低于30%, 呈广泛的低甲基化状态, 各组内未甲基化比例与甲基化比例的差别非常显著, 提示GGT表达受基因甲基化程度的调节. 因而认为癌变过程中GGT基因去甲基化, 使已关闭的GGT基因重新活化, 再过量表达出GGT引起肝组织和血中酶活性的大幅升高. Athanase *et al*从不同组织中提取GGT mRNA, 并对其5'-NC进行基因分析显示, 人GGT mRNA 5'-NC区域存在着8种外显子, 其中外显子VIII为肝癌组织特有, 并认为在不同组织中, GGT的转录水平不同可能与5'-NC外显子可选择性或组织特异性的可变剪接有关.

5 肝癌特异性GGT的检测及临床意义

在很多恶性肿瘤(包括肝癌)发生时, 患者血清中GGT活性常显著升高^[11], 但由于GGT在体内分布较广, 酶诱导剂如乙醇、苯妥英钠等可诱发GGT的合成增加, 大多数良性肝、胆、胰等病也可伴GGT活性增强, 故该酶的特异性相对较差. 醋酸纤维素薄膜电泳、亲和电泳、琼脂糖凝胶电泳等用于GGT的检测均有一定的价值, 但这些方法相对复杂, 不易于临床推广. 因而进一步研究简易而准确的GGT检测方法, 尤其是肝癌特异性GGT更为重要.

5.1 GGT-II检测方法进展及临床诊断价值

5.1.1 聚丙烯酰胺电泳法 1967年Orlowski *et al*^[15]应用淀粉胶电泳发现原发性肝癌(PHC)患者血清中存在“肝癌特异性”GGT同工酶, 其后国外学者用聚丙烯酰胺凝胶电泳可将GGT分离出11-13条同工酶区带, 其中肝癌特异性区带GGT-II阳性率为27-54%, 而在正常

人、孕妇、良性肝病及肝外肿瘤中不出现, 且与年龄、性别及乙肝病毒感染无关; 与AFP浓度、癌体大小无相关性. Xu *et al*^[16-17]改良了检测方法, 将GGT分离出11条同工酶, 其中GGT-II对PHC的诊断阳性率提高到90%, 而非癌肝病中阳性率在10%, 孕妇、肝外肿瘤及正常对照均为阴性. 后国内外学者经过系列临床筛选研究, 综合评价GGT-II诊断PHC的敏感性为94%, 特异性为97.1%, 在AFP阴性肝癌中, GGT-II阳性率为78.67%, 对小肝癌诊断的阳性率为80%^[18].

5.1.2 火箭免疫电泳法 根据抗原的不同有两种方法. 一种是从人胎肝中提取及纯化GGT抗原, 然后与福氏佐剂充分混匀, 免疫新西兰兔, 制备得抗血清. 不同浓度的人胎肝GGT抗原与抗血清具有很好的免疫反应, 出现相应的酶呈色火箭峰, 其峰面积与抗原的浓度成正比. 检测时, 将肝癌患者的血清与抗血清反应, 凡出现较明显的酶呈色火箭峰者为阳性. 如出现的酶呈色火箭峰较浅者定为弱阳性, 不出现峰者为阴性^[19]. 另一种方法是将GGT抗原改为肝癌特异性GGT-II, 其余原理相同. 二者相比, 后者更具有简便, 敏感性强, 特异性高的特点, 对肝癌的阳性率可达86.9%^[20].

5.1.3 GGT单克隆抗体检测法 苗爱莲 *et al*^[21]将GGT单克隆抗体和神经氨酸酶(NMD)进行稀释, 用过碘酸钠法将抗体和NMD吸附并固定到醋酸纤维膜上, 用于检测肝癌患者的血清. 临床应用结果显示, 对PHC诊断敏感性为83.77%, 特异性为98.04%, 对AFP阴性的PHC患者诊断阳性率为65.91%. Ni *et al*以纯化的HS-GGT作为抗原, 免疫小鼠, 制备单克隆抗体, 用斑点酶联免疫吸附(dot-ELISA)法检测患者血清GGT-II, 诊断PHC阳性率达71.5%. 该法具有操作方便、无需特殊试剂和设备、易于推广等优点, 但易出现假阳性, 可能是由于GGT-II所针对的抗原位点与其他非肝脏特异性GGT同工酶之间仍存在有一定的交叉抗原性^[22-23].

5.1.4 肝癌特异性GGT定量检测 Yao *et al*^[24]对GGT定量检测作了研究. 其方法为血清的GGT同工酶以阶段梯度的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 在电泳后酶呈色的醋酸纤维薄膜上, 将GGT-I'或GGT-II或GGT-II'带切下合并为肝癌特异性区(HSB)带于试管中, 与其他各区带分别以稀酸洗脱出同工酶区带, 在可见分光光度计上比色, 分别计算出GGT同工酶各区带的百分比, 按所占百分比计算出血清中HSB的活性单位数. 研究表明, HSB定量敏感性和特异性分别为85.3%、97.2%. HSB定量明显优于AFP, 而略优于HSB定性.

5.1.5 联合其他肝癌标志物研究方面 GGT-II与AFP联合检测可使阳性率提高到94.0%, 有学者分别对GGT-II与AFP、甘氨酸脯氨酸二肽氨基肽酶(GPDA-F/ALT)、AFP mRNA、维生素K缺乏诱导蛋白(PIVKAII)、铁蛋白、肿瘤坏死因子、CA199、CA125等联合检测肝癌作了研究, 结果示GPDA-F/ALT、GGT-II、AFP同步检测可

使诊断敏感性提高至 97.2%, GGT- II 和 PIVKAI 联合检测可使敏感性提高至 93%, 肝癌特异性 GGT 联合 AFP mRNA 可以使肝癌的诊断率达到 93.6%.

5.2 其他几种特殊的肝癌特异性 GGT 检测方法及其临床诊断价值

5.2.1 LDL-VLDL-GGT 的检测 于嘉屏 *et al*^[25]以抗载脂蛋白 B 抗体为沉淀剂, 沉淀血清中低密度脂蛋白及极低密度脂蛋白结合的 γ -谷氨酰基转移酶 (LDL-VLDL-GGT), 测定其活性, 对 65 例肝癌、53 例肝硬化、32 例慢性肝炎检测发现, 其对肝癌的诊断敏感性达 86.2%.

5.2.2 albumin-GGT 的检测 Pompili *et al*^[26]用蛋白电泳方法检测 131 例肝硬化合并肝癌患者, 有 88 例白蛋白结合的 γ -谷氨酰基转移酶 (albumin-GGT) 阳性, 而在 59 例肝硬化无肝癌患者中仅 14 例 albumin-GGT 阳性, 在 17 例肝转移癌患者中有 9 例阳性, 而正常人无一例阳性, 结果表明, albumin-GGT 对肝硬化合并肝癌的诊断灵敏性为 67%, 特异性为 76%.

5.2.3 欧曼陀罗凝集素分离法 以 NMD 水解后的血清直接上欧曼陀罗凝集素亲和层析柱, 首先用 0.05 mol/L 醋酸洗去不结合和弱结合组份, 再用 0.01 mol/L 醋酸洗脱强结合组份, 用连续监测法测定洗脱液的 GGT 活性变化, 结果示正常人、良性肝病患者在 0.05 mol/L 醋酸洗脱时可出现 1-2 个峰, 没有强结合峰. PHC 患者除此之外还出现一个特有的比例不大的强结合峰, 阳性率为 80%.

5.2.4 Con A 亲和法 伴刀豆球蛋白 A (Con A) 与正常人、良性肝病患者血清中的亲和性较强, 与肝癌患者血清中的 GGT 亲和性较弱, 亲和率分别为 80.6%、88.1%、67.6%. 因而可以利用肝癌特异性 GGT 的植物凝集素亲和法诊断肝癌^[27].

6 GGT mRNA 的检测及意义

GGT I mRNA 在体内分布具有组织特异性, 而他们的主要差别在于 5' -NC. Tsutsumi *et al*^[28]把人胎肝、肝癌组织和胎盘中不同形式的 GGT I mRNA 分别称为 A、B、C 亚型, 根据他们 5' -NC 区的分子机构差异, 设计出不同的引物, 运用 RT-PCR 的方法, 检测 16 例肝癌患者和 18 例非肝癌患者的肝组织中 GGT mRNA 的表达, 发现 16 例肝癌患者中有 15 例 GGT I mRNA 类型为 B 亚型, 而 18 例非肝癌患者均检测到了 A 亚型, 仅 2 例检测到了 B 亚型, 有 7 例为 A 与 C 复合亚型, 而酒精或其他药物引起的 GGT 升高, 与亚型的变化没有关系. 从而认为肝癌的发生与 GGT I mRNA 从 A 亚型向 B 亚型转化有着密切关系 ($P < 0.01$), 检测 GGT I mRNA 有助于肝癌的诊断. Daubeuf *et al*^[29]对人四种不同的癌细胞株研究发现, 肝癌细胞中 GGT mRNA 以 B 亚型为主. Sheen *et al*^[30-31]通过类似研究得出了相同的结论, 并且认为 GGT I mRNA B 亚型与血清中 AFP 水平、肿瘤灶、术后复发、术后生存率及肿瘤细胞的分化程度相关, 术后肿瘤的浸润和进展与术后残

余肝脏组织中的 GGT mRNA B 亚型水平有关, 从而认为监测 GGT mRNA 也是预测术后是否复发的一个良好指标. 国内韩国庆 *et al*^[32-34]同样运用 RT-PCR 方法检测了正常对照组、非癌肝病组、肝癌组、肝转移癌肝组织及外周血的 3 种 GGT mRNA, 也得出了类似结论, 并发现小肝癌中 GGT mRNA B 亚型阳性率也达 87.5%; 26 例 HCC 中有 12 例外周血中检出 GGT mRNA B 亚型, AFP 阴性的 10 例 HCC 中, 有 5 例检出 GGT mRNA B 亚型, 二者相比无显著差异性, 从而认为血清 AFP 与周围血 GGT mRNA B 亚型无相关性, 这一点与 Kuo-Shyang *et al* 的研究不完全相同, 具体尚有待进一步研究. 由上述研究可见, 测定人体血清中以及肝组织 GGT I mRNA 有助于肝癌的早期诊断以及监测手术后的复发.

7 展望

进一步探讨肝癌特异性 GGT、GGT mRNA 的表达特点以及与其他新的肝癌标志物的联合诊断, 寻求最理想的方案, 有助于在血清水平和分子生物学水平对 HCC 早期诊断、鉴别诊断、疗效评价以及监测术后的复发、转移. 同时, 分离纯化 GGT 同工酶, 尤其是 GGT- II, 测定其基因序列, 阐明 GGT 基因亚型与 GGT 同工酶之间的关系, 也必将有助于对 HCC 发生及进展过程中的 GGT 异常表达的本质认识.

8 参考文献

- 1 Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62:57-63
- 2 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:542-546
- 3 Parks R, Garden O. Liver resection for cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:766-771
- 4 Yamashita K, Totani K, Iwaki Y, Takamisawa I, Tateishi N, Higashi T, Sakamoto Y, Kobata A. Comparative study of the sugar chains of gamma-glutamyltranspeptidases purified from human hepatocellular carcinoma and from human liver. *J Biochem (Tokyo)* 1989;105:728-735
- 5 Pettersen I, Andersen JH, Bjornland K, Mathisen O, Bremnes R, Wellman M, Visvikis A, Huseby NE. Heterogeneity in gamma-glutamyltransferase mRNA expression and glycan structures. Search for tumor-specific variants in human liver metastases and colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1648:210-218
- 6 Courtay C, Heisterkamp N, Siest G, Groffen J. Expression of multiple γ -glutamyltransferase genes in man. *Biochem J* 1994; 297(Pt 3):503-508
- 7 Visvikis A, Pawlak A, Accaoui MJ, Ichino K, Leh H, Guellaen G, Wellman M. Structure of the 5' sequences of the human gamma-glutamyltransferase gene. *Eur J Biochem* 2001;268: 317-325
- 8 Holic N, Suzuki T, Corlu A, Couchie D, Chobert MN, Guguen-Guillouzo C, Laperche Y. Differential expression of the rat gamma-glutamyl transpeptidase gene promoters along with differentiation of hepatoblasts into biliary or hepatocytic lineage. *Am J Pathol* 2000;157:537-548
- 9 Mikkelsen IM, Mortensen B, Laperche Y, Huseby NE. The expression of gamma-glutamyltransferase in rat colon carci-

- noma cells is distinctly regulated during differentiation and oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 2002;232:87-95
- 10 Ha WS, Kim CK, Song SH, Kang CB. Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat: development of hepatotumorigenesis. *J Vet Sci* 2001;2:53-58
- 11 Ohata M, Toda G. Gamma-glutamyltranspeptidase (Gamma-GT). *Rinsho Byori* 2001;116(Suppl):62-71
- 12 Hochwald SN, Harriosn LE, Rose DM, Anderson M, Burt ME. Gamma-glutamyl transpeptidase mediation of tumor glutathione utilization in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:193-197
- 13 Lee DH, Blomhoff R, Jacobs DR Jr. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res* 2004;38:535-539
- 14 Yao D, Jiang D, Huang Z, Lu J, Tao Q, Yu Z, Meng X. Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyl transferase and alteration of gamma-glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;88:761-769
- 15 Orłowski M, Szczeklik A. Heterogeneity of serum gamma-glutamyl transpeptidase in hepatobiliary diseases. *Clin Chim Acta* 1967;15:387-391
- 16 Xu KC, Meng XY, Shi YC, Ge ZJ, Ye L, Yu ZJ, Yang DM. The diagnostic value of a hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase. *Int J Cancer* 1985;36:667-669
- 17 Xu K, Meng XY, Wu JW, Shen B, Shi YC, Wei Q. Diagnostic value of serum gamma-glutamyl transferase isoenzyme for hepatocellular carcinoma: a 10-year study. *Am J Gastroenterol* 1992;87:991-995
- 18 沈鼎明, 沈薇, 左国庆, 曾维政, 梅浙川, 周友梅, 徐葆元. 血清肝癌标志物在原发性肝癌诊断中的价值 - 附 321 例肝癌测定结果. *中华消化杂志* 1992;12:223-226
- 19 黄介飞, 姚登福, 孟铁镛, 魏群, 倪润洲, 张弘, 肖明兵. 肝癌特异性 GGT 火箭电泳对原发性肝癌的诊断价值. *中华消化杂志* 1995;15:269-271
- 20 Stolzel U, Teubner A, Ernstberger J, Habeck JO, Schuppan D. Isolated elevation of gGT: What should be the diagnostic approach? *Dtsch Med Wochenschr* 2004;129(Suppl 2):S54-56
- 21 苗爱莲, 李军, 魏曙亚, 候蓉, 原荣, 王香林. 肝癌特异 γ -谷氨酰转肽酶同工酶 II 活性检测及其临床价值. *西安交通大学学报(医学版)* 2003;24:85-87
- 22 Ni RZ, Huang JF, Xiao MB, Zhang PY, Meng XY. Detection of GGT-II by Dot-ELISA with monoclonal antibody in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2004;23:66-68
- 23 Tang W, Wang XY, Gao JE, Ji HP, Tao QM, Ji Y. Preparation and application of the monoclonal antibody against hepatoma-specific gamma-glutamyltransferase. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2003;11:100-102
- 24 Yao DF, Huang ZW, Chen SZ, Huang JF, Lu JX, Xiao MB, Meng XY. Diagnosis of hepatocellular carcinoma by quantitative detection of hepatoma-specific bands of serum gamma-glutamyltransferase. *Am J Clin Pathol* 1998;110:743-749
- 25 于嘉屏, 王爱华, 顾鹏飞, 陈军. 免疫沉淀法测定血清中与两种脂蛋白结合的 γ -谷氨酰基转移酶活性及其诊断肝癌的价值. *中华检验医学杂志* 2003;26:371-373
- 26 Pompili M, Addolorato G, Pignataro G, Rossi C, Zuppi C, Covino M, Grieco A, Gasbarrini G, Rapaccini GL. Evaluation of the albumin-gamma-glutamyltransferase isoenzyme as a diagnostic marker of hepatocellular carcinoma-complicating liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:288-295
- 27 司维柯, 李士敏, 罗朝学, 胡国珍, 何长生, 王源, 魏明竞. 伴刀豆球蛋白 A 识别正常与肝癌 γ -谷氨酰转肽酶的实验观察. *第三军医大学学报* 2000;22:294-295
- 28 Tsutsumi M, Sakamuro D, Takada A, Zang SC, Furukawa T, Taniguchi N. Detection of a unique gamma-glutamyl-transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;23:1093-1097
- 29 Daubeuf S, Accaoui MJ, Pettersen I, Huseby NE, Visvikis A, Galteau MM. Differential regulation of gamma-glutamyltransferase mRNAs in four human tumour cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1568:67-73
- 30 Jeng KS, Sheen IS, Tsai YC. Gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA may serve as a diagnostic aid in hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2001;88:986-987
- 31 Sheen IS, Jeng KS, Tsai YC. Is the expression of γ -glutamyl transpeptidase messenger RNA an indicator of biological behavior in recurrent hepatocellular carcinoma? *World J Gastroenterol* 2003;9:468-473
- 32 Han GQ, Qin CY, Shu RH. The analysis of gamma-glutamyl transferase gene in different type liver tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:276-280
- 33 Han GQ, Qin CY, Ren WH, Shi J, Wang YJ, Liu HL. Clinical impact of gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA subtypes on early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2002;21:192-195
- 34 秦成坤, 彭志海, 韩国庆. 外周血 γ -谷氨酰转肽酶 mRNA-H 亚型与甲胎蛋白对原发性肝癌诊断及肝外转移意义的比较. *中华实验外科杂志* 2004;21:671-672

编辑 张海宁

遗传性血色病基因突变与肝脏疾病相关性的研究进展

施文娟, 成 军

施文娟, 甘肃省兰州电机有限责任公司医院肝病诊疗中心
甘肃省兰州市 730050
成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛
医院传染病研究所. cj@qenetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-20

摘要

遗传性血色病是一种常见的先天性铁代谢异常性疾病. 分子生物学研究表明, 遗传性血色病主要与 6 号染色体上的一种基因, 即 HFE 基因的突变有关. HFE 基因的突变造成体内铁代谢路径的改变, 造成肝脏等多器官的损害. 近年来的研究表明, HFE 基因的突变与病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)、肝纤维化 / 肝硬化、肝细胞癌 (HCC) 的发生发展密切相关, 因而具有十分重要的意义. 这提示体内铁代谢的异常, 参与各种不同类型的肝脏疾病的发病过程, 研究 HFE 基因的突变不仅有利于阐明遗传性血色病的发病机理, 而且有助于其他类型肝脏疾病的防治研究.

施文娟, 成军. 遗传性血色病基因突变与肝脏疾病相关性的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1123-1126
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1123.asp>

0 引言

20 世纪 90 年代中期, Feder *et al* 利用基因克隆技术发现 6 号染色体上存在一种人白细胞抗原 (HLA) 基因, 他是常见的先天性铁代谢异常性疾病——遗传性血色病的主要基因^[1], 后将其命名为 HFE 基因. HFE 基因表达于人体整个消化道上皮细胞, 以极化形式分布于胃和结肠上皮细胞基底侧表面, 以非极化形式存在于食管上皮细胞和黏膜下白细胞整个细胞膜表面及胞质中, 在十二指肠腺窝细胞中分布最多^[2]. 该基因编码一种类似于主要组织相容性复合体 I (MHC-I) 类分子的蛋白, HFE 蛋白有 3 个细胞外结构域 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$)、一个跨膜区和一个较短的细胞内肽段, 他与 $\beta 2$ 微球蛋白相结合, 维持并稳定其结构与功能. 一般认为 HFE 蛋白并不参与抗原呈递过程, 而是与转铁蛋白受体 (transferring receptor, TFR)、 $\beta 2$ 微球蛋白相互作用, 影响细胞对铁的摄取、调控铁转运及维持细胞内铁稳态.

HFE 基因突变常引起肝脏、心脏、胰腺及其他内分泌器官的铁沉积过多, 导致肝硬化、心功能不全、心肌病及糖尿病等. HFE 基因突变主要包括 C282Y、H63D 两种错义突变, C282Y 是 HFE 基因最主要的突变, 其 282 位半胱氨酸由酪氨酸所取代, 研究证实 C282Y 突变阻止

HFE 蛋白与 $\beta 2$ 微球蛋白结合, 从而影响 HFE 蛋白在分子表面的正常表达. 另一种较重要的 HFE 基因突变是 H63D (天门冬氨酸置换 63 位的组氨酸), 一般情况下他对机体储存铁的影响较小.

铁导致肝损伤的机制尚未完全阐明, 目前认为可通过数种机制直接造成肝细胞损伤. 铁可增加活性氧中间体的生成, 后者可导致脂质过氧化, 并通过氧化损伤蛋白质和核酸; 铁亦可通过减少 T 细胞的生成和降低自然杀伤细胞及 T 辅助细胞的功能, 影响抗原特异性细胞反应; 铁亦可影响免疫介导的窦状隙枯否细胞对丙型肝炎病毒 (HCV) 和乙型肝炎病毒 (HBV) 的清除; 最近证明, 铁还可降低枯否细胞促炎细胞因子的生成量. Cable *et al*^[3] 研究发现, 体外培养的肝细胞中加入非转铁蛋白结合铁, 可使肝细胞形态发生变化. 随着铁浓度的增加, 肝细胞核形态受到进一步破坏. Ishida *et al* 研究了慢性肝损伤患者体内铁的分布情况, 发现大量的铁沉积于肝小叶外周区, 在铁沉积区可见肝细胞核空泡变、脂褐素及金属硫蛋白沉积. 此种病理改变可能是由于铁促进了超氧化物产生, 而造成细胞核的损伤. Iancu *et al* 研究了 20 例血色素沉着症患者, 发现随着肝铁浓度和铁指数的增加, 肝细胞损伤愈重. 上述研究提示, 铁作为一种强有力催化剂, 促进氧自由基的产生, 导致肝细胞亚细胞膜磷脂过氧化损伤, 特别是在线粒体和微粒体膜的损伤, 通过干扰电子转移而导致能量减少, 最终使细胞死亡而继发肝纤维化形成.

1 与非酒精性脂肪性肝病相关性的研究

在非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的发病机制中, 肝脏脂肪变性后, 各种因素激发的氧应激、脂质过氧化最终可导致肝细胞损伤, 产生炎症、坏死、纤维化, 促成疾病进展. 目前认为自由基介导的脂质过氧化是铁引起细胞毒性的基础. 铁是参与自由基产生的化学反应中的一种催化剂, 过多的铁沉积可以引起活性氧簇的产生, 攻击细胞膜多不饱和脂肪酸, 导致细胞膜脂质过氧化, 使细胞溶酶体脆性增加、线粒体功能障碍及细胞内钙稳态改变, 诱导肝细胞损伤, 并通过激活核因子- κB (NF- κB), 刺激肝脏 Kupffer 细胞的肿瘤坏死因子 α (TNF α) 基因表达, 释放与细胞损伤有关的活性产物, 激活肝星状细胞, 使 I 型胶原及其他细胞外基质增加, 介导肝脏纤维化、肝硬化的发生及发展. 通常情况下, 肝纤维化、肝硬化仅发生于铁过负荷存在时间较长并且肝脏铁含量明显增加.

大量研究证实, 胰岛素抵抗是NAFLD的一个特征, 是其发展的最重要的病因学因素. 与胰岛素抵抗相关的代谢异常性疾病如糖尿病、高甘油三酯血症、高血压、肥胖等, 常出现NAFLD^[4-6]. 有研究将NAFLD划入“胰岛素抵抗相关代谢综合征”的一个组成部分中^[7-8]. 也有研究发现在高脂血症、脂肪肝、高血糖患者中, 存在血清铁蛋白、肝脏铁浓度、HFE基因突变率的增加. 虽然胰岛素抵抗在铁代谢中的作用机制不明, 但胰岛素抵抗在血清铁蛋白升高、肝脏铁过负荷、脂肪变性的过程中具有一定作用, 铁过负荷与胰岛素抵抗综合征密切相关^[9]. Fargion *et al*^[10]对胰岛素抵抗进行定量研究, 发现血清铁蛋白升高的患者中均可见肝脏铁浓度增加, 72%存在代谢异常. 多元分析显示: 非酒精性脂肪性肝炎(NASH)发生的可能性随血清铁蛋白及肝脏铁浓度增加而增加, NASH与多种代谢改变有关, 认为铁代谢、糖代谢及脂质代谢异常大多数源于胰岛素抵抗. 胰岛素抵抗、铁过负荷是诱导NASH发生的因素.

目前研究认为, 铁过负荷、HFE基因突变的NAFLD患者肝脏铁过多沉积参与肝脏损伤, 该过程极有可能由胰岛素抵抗所激发, 研究显示微粒体膜集中存在有转铁蛋白受体、胰岛素调控的葡萄糖转运体, 胰岛素刺激葡萄糖转运的同时可能偶联转铁蛋白受体, 介导细胞外铁进入细胞内, 促进肝细胞的铁沉积. 在胰岛素抵抗综合征中炎症因子大量激活, 增加巨噬细胞中血清铁蛋白mRNA转录, 转运血清铁蛋白进入肝脏. 另外, 肝脏脂肪变性、炎症改变、铁过负荷影响肝脏对胰岛素的降解, 使胰岛素受体及胰岛素活性下降, 加剧外周高胰岛素血症. 铁过度积累、胰岛素抵抗以及肝脏损伤间的恶性循环, 使原有的疾病进一步恶化, 导致肝脏纤维化、肝硬化、甚至肝癌的发生.

然而, 有部分学者发现^[11-12], NAFLD并不存在铁过负荷, 肝脏铁沉积与NAFLD临床、病理表现、病变严重程度以及疾病进展均无关系. NAFLD发生发展是多因素作用的结果, 其中包括铁过负荷的作用, 但与其他因素如胰岛素抵抗、游离脂肪酸增加、细胞色素P450、线粒体结构功能障碍、细胞因子(如TNF α)的作用相比, 铁过负荷可能是NAFLD疾病进展的一个辅助因素.

2 与病毒性肝炎相关性的研究

铁与肝炎病毒具有协同毒性作用. Fargion *et al*研究了212例遗传性血色病, 发现慢性乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染分别是9%和24%, 提示肝炎病毒可能协同铁加速肝损害. Dimitrijevi *et al*^[13]对126例HBV感染者肝活检, 发现3例肝细胞中有含铁血黄素和铁蛋白沉积, 但免疫组化染色无肝细胞特征性的毛玻璃样改变, 提示HBV的感染的发病机制可能与铁代谢有关. 国内曹治宸 *et al*观察了103例乙型肝炎患者铁代谢血清学指标, 发现血清铁蛋白、血清铁随肝损伤加重而增加, 转铁蛋白、总铁结合力随肝损伤加重而减少. 提示铁负荷过重可

能协助HBV加重肝损伤.

Farinati *et al*^[14]研究发现慢性丙型肝炎患者血清铁蛋白和肝组织铁含量(HIC)比乙型肝炎患者高, 并且发现HCV感染者丙二醛含量增高, 提示铁可能协同HCV触发自由基产生, 从而干扰线粒体的功能, 导致肝损伤. 目前认为铁会影响慢性肝炎患者对干扰素 α (IFN α)的应答. 肝脏铁浓度高影响干扰素 α 疗效的根本原因是铁本身, 还是与铁负荷增高影响了疗效的其他因素(如病毒基因型、组织学损伤程度、病毒负荷)有关尚无定论. 关于排铁对干扰素 α 疗效的影响, 最近2项前瞻性研究在干扰素 α 治疗无效患者和从未用过干扰素 α 的患者中, 观察了排铁对干扰素 α 疗效的影响. Fontana *et al*证明, 排铁不仅可改善肝脏组织学, 还可降低HCV RNA水平. Cozzolongo *et al*^[15]对83例慢性丙型肝炎患者, 分为去铁组和非去铁组, 两组对IFN α 的应答分别为31%和14%, 说明放血疗法对减轻肝组织炎症有益.

Boucher *et al*^[16]对55例慢性丙型肝炎给予IFN α 治疗, 观察治疗前和治疗后肝脏铁浓度和铁在肝脏的分布情况, 结果铁含量随着IFN α 的治疗而减少, 提示IFN α 促进了间质细胞对铁的清除. 以上研究提示, 治疗前铁代谢指标的改变有助于预示HCV对IFN α 的应答.

Meyron-Holtz *et al*^[17]发现36%的慢性丙型肝炎患者血清铁增高. 炎症亦可使某些血清铁指标(如铁蛋白)升高, 较精确的铁负荷增加指标是HIC(用原子吸收分光光度测定法测定). Van-Thiel *et al*对病理学不同的各种慢性病毒性肝炎患者的HIC进行了回顾分析. 结果发现, 治疗有效患者的HIC比无效患者低. 这在丙型肝炎患者也得到了证实. Olynyk *et al*^[18]提出, HIC>100 $\mu\text{g/g}$ 的患者, 几乎90%治疗无效. 但Boucher *et al*^[16]发现, 干扰素 α 治疗有效和无效患者的HIC无显著差异, 并发现不论临床有无疗效, 干扰素 α 治疗后患者的HIC都有所降低. Griffiths *et al*^[19]对有关文献进行综述后得出结论, 铁可能是慢性丙型肝炎肝损伤的辅助因素, 并与疾病严重性相关. HIC是铁负荷增加的精确指标. HIC增高的患者, 干扰素疗效差.

3 与肝纤维化、肝硬化相关性的研究

肝脏铁过负荷可以引起肝纤维化和肝硬化. Geoger *et al*^[20]认为, 肝脏储存铁的Perls染色与肝纤维化呈正相关, 肝脏铁过负荷是肝纤维化的一个重要因素. 因C282Y基因突变可以引起肝脏储存铁及其他有关铁指标的升高, 进一步研究C282Y突变与肝纤维化的关系, 发现C282Y基因突变仅是NASH肝纤维化发生的间接因素, 而对NASH肝纤维化起重要作用的是肝脏储存铁的过度沉积. Bugianesi *et al*^[12]发现40例血清铁蛋白升高的患者中, 77%病例存在NASH的肝脏病理学改变具有肝脏大泡性脂肪变性、小叶炎症的特点, 25例表现为肝脏纤维化, 肝脏铁沉积>2级约占90%, 表明铁过负荷在NAFLD中肝纤维化的作用.

4 与肝癌相关性的研究

肝细胞癌 (hepaticellular carcinoma, HCC) 是肝脏疾病的严重后果, 铁负荷过度造成的慢性肝脏疾病, 常发展成为肝细胞癌。近年来, 国外学者就 HFE 基因突变与 HCC 的关系作了很多研究。Cauza *et al*^[21] 研究发现, HFE 基因突变 C282Y 纯合子与原发性肝癌明显相关。一组 30 例纯合子相关的不依赖其亲属关系而影响的 17 例血色病患者, 肝铁水平 >22 000 $\mu\text{g/g}$ 干重 (等于 4 500 $\mu\text{g/g}$ 湿重), 肝活检证实有纤维化或肝硬化。肝硬化两个主要的死亡原因是肝性脑病和肝癌, 死亡发生在铁完全耗空之前。肝癌发生率比一般人群高 200 倍, 发生率 15%, 在肝硬化基础上发生, 80% 为肝细胞癌, 仅 20% 为肝内胆管癌^[22]。

Blanc *et al*^[23] 报道了 35 例无肝硬化肝癌患者, 19 例 (54%) 肝组织铁负荷过量 (I+) 患者有 8 例发现 HFE 基因突变: 2 例 C282Y/C282Y, 3 例 C282Y/WT, 2 例 C282Y/H63D 和 1 例 H63D/H63D。16 例 (46%) 肝组织铁负荷正常 (I-) 患者无 1 例发现 HFE 基因突变。在铁负荷过量 (I+) 患者中 C282Y 基因突变频率明显增高 (36.8%) 与铁负荷正常 (I-) 患者相比较有统计学意义。

Lauret *et al*^[24] 对 179 例酒精性肝硬化 (其中 43 例肝癌) 患者, 98 例肝炎肝硬化 (其中 34 例肝癌) 患者, 159 例健康人进行研究发现: 3 组间基因突变频率无显著性差异, 然而在 43 例酒精性肝硬化肝癌患者中有 9 例 (20.9%) C282Y 纯合子基因突变, 与 136 例酒精性肝硬化无肝癌患者仅有 6 例 (4.4%) 比较有显著性差异, 这种差异在肝炎肝硬化、肝癌患者与肝炎肝硬化非肝癌患者或 H63D 基因突变中未发现。

然而, Willis *et al*^[25] 报道, 215 例肝癌患者 HFE 基因突变较为罕见, C282Y 纯合子为 2.5%, C282Y/H63D 杂和子为 1%。Racchi *et al*^[26] 认为, 与血色病相关的 HFE 基因突变未增加罹患肝癌的风险, 携带 HFE 突变基因在 HCC 病理过程中并未起到重要的作用, 在慢性肝脏疾病中有未知的基因改变决定肝癌的发生。故 HFE 基因突变与肝细胞癌的相关性有待进一步研究。

遗传性血色病系 HFE 基因突变导致铁过量从肠黏膜细胞转移入门脉循环, 以致过量的铁质在肝内沉积, 从而导致肝纤维化、肝硬化、肝癌发生。此外, 铁与肝炎病毒具有协同毒性作用, 铁会影响慢性肝炎患者对干扰素的应答, 铁和高胰岛素血症在非酒精性脂肪肝的发病机制中亦具有协同作用。因此, 铁代谢异常对慢性肝损伤的影响日益为人们所关注, 一方面肝细胞内铁引起脂质过氧化物 (LPO), 导致微粒体、线粒体和溶酶体等细胞器膜稳定性降低, 释出水解酶至胞质进而促发肝细胞损伤和死亡, 另一方面 Kupffer 细胞在吞噬受损的含铁肝细胞后被激活, 产生成纤维细胞生长因子 (FGF)、转化生长因子 β (TGF β) 刺激星形细胞活化, 产生大量胶原, 而铁又是胶原合成中脯氨酸羟化酶的重要辅助因子, 导致病理性纤维化、肝

硬化。但只要早期治疗, 可以有效防止多余铁沉积, 预防并发症, 尤其是在肝硬化发生前治疗可防止肝癌发生。

5 参考文献

- Bacon BR, Powell LM, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology* 1999;116:193-207
- Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Feder JN, Tsuchihashi Z, Schatzman RC, Bacon BR, Sly WS. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2534-2539
- Cable EE, Connor JR, Isom HC. Accumulation of iron by primary rat hepatocytes in long-term culture: changes in nuclear shape mediated by non-transferrin-bound forms of iron. *Am J Pathol* 1998;152:781-792
- Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001;21:17-26
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001;121:91-100
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850
- Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;35:373-379
- Turlin B, Mandler MN, Moirand R, Guyader D, Guillygomarc'h A, Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance associated iron overload. A study of 139 patients. *Am J Clin Pathol* 2001;116:263-270
- Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P, Taioli E, Valenti L, Fiorelli G. Hyperferritinemia iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2448-2455
- Washington K, Wright K, Shyr Y, Hunter EB, Olson S, Raiford DS. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol* 2000;31:822-828
- Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:134-140
- Dimitrijevic J, Bojanic N, Skaro-Milic A, Mijuskovic P, Ilic S, Nozic D. Morphologic characteristics of HBV markers and products of iron metabolism in liver tissue in patients with hepatitis B virus. *Vojnosanit Pregl* 2002;49:477-483
- Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:449-456
- Cozzolongo R, Cuppone R, Manghisi OG. The treatment of chronic hepatitis C not responding to interferon. *Curr Pharm Des* 2002;8:967-975
- Boucher E, Bourienne A, Adams P, Turlin B, Brissot P, Deugnier Y. Liver iron concentration and distribution in chronic hepatitis C before and after interferon treatment. *Gut* 1997;41:115-120

- 17 Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Rouault TA. Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science* 2004;306:2087-2090
- 18 Olynyk JK, Reddy KR, Di-Bisceglie AM, Jeffers LJ, Parker TI, Radick JL, Schiff ER, Bacon BR. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2001;108:1104-1109
- 19 Griffiths A, Olynyk JK. Iron and the response to treatment of hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002;97:788-790
- 20 Kochman F, Ducrocq F, Parquet PJ. Cyclic oro-alimentary disorders. *Rev Prat* 1997;47:1913-1916
- 21 Cauza E, Peck-Radosavljevic M, Ulrich-Pur H, Datz C, Gschwantler M, Schoniger-Hekele M, Hackl F, Polli C, Rasoul-Rockenschaub S, Muller C, Wrba F, Gangl A, Ferenci P. Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003;98:442-447
- 22 池肇春. 遗传性血色病性肝硬化进展. 临床肝胆病杂志 2000;16: 81-83
- 23 Blanc JF, De Ledinghen V, Bernard PH, de Verneuil H, Winnock M, Le Bail B, Carles J, Saric J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Increased incidence of HFE C282Y mutations in patients with iron overload and hepatocellular carcinoma developed in non-cirrhotic liver. *J Hepatol* 2000;32:805-811
- 24 Lauret E, Rodriguez M, Gonzalez S, Linares A, Lopez-Vazquez A, Martinez-Borra J, Rodrigo L, Lopez-Larrea C. HFE gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1016-1021
- 25 Willis G, Wimperis JZ, Lonsdale R, Fellows IW, Watson MA, Skipper LM, Jennings BA. Incidence of liver disease in people with HFE mutations. *Gut* 2000;46:401-404
- 26 Racchi O, Mangerini R, Rapezzi D, Gaetani GF, Nobile MT, Picciotto A, Ferraris AM. Mutations of the HFE gene and the risk of hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25: 350-353

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第六届全国胃肠动力学术研讨会征文通知

本刊讯 为提高国内胃肠动力障碍性疾病临床和基础研究水平, 吸取国外最新研究成果, 加强对外交流与合作, 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组定于2005-11 上旬在武汉召开全国第六届胃肠动力学术会议, 届时将邀请国内外胃肠动力学专家就本学科的基础和临床研究进展作专题演讲, 并进行广泛的学术交流. 现将征文有关事项通知如下:

1 征文内容

(1)胃肠动力障碍性疾病的基础和临床研究;(2)胃肠功能性疾病的基础和临床研究;(3)胃肠神经系统功能与胃肠动力学基础研究;(4)胃肠动力学检测方法的临床应用.

2 征文要求

(1)论文摘要不得超过800 字, 电脑打印(附软盘), 格式为: 题目, 作者, 单位, 邮编, 目的, 方法, 结果和结论, 附联系电话及E-mail 地址;(2)已在全国公开发表的论文不予受理.

3 投稿地址

武汉市解放大道1277 号协和医院消化科 刘劲松 收(邮编: 430022), 电话: 027-85726381; 2 武汉市丁字桥路100 号湖北省医学会 林勇 胡丽萍收(邮编: 430064), 电话: 027-87893467.

4 截稿日期

2005-07-30

5 会议具体地点

另行通知.会议信息, 论文投稿, 表格下载请登陆网站:<http://hubeiyiyuan.go.nease.net>.

中华医学会消化病学分会

消化病学分会胃肠动力学组

胆管癌组织中 CD44v6 和 nm23-H1 的表达及其临床意义

张炳远, 闫尚伦, 李玉军, 吴力群

张炳远, 闫尚伦, 吴力群, 青岛大学医学院附属医院肝胆血管外科
山东省青岛市 266003
李玉军, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青岛市 266003
通讯作者: 张炳远, 266003, 山东省青岛市江苏路 16 号, 青岛大学医学院附
属医院肝胆血管外科.
电话: 0532-2911369
收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-02-02

摘要

目的: 探讨胆管癌组织中 CD44v6 和 nm23-H1 的表达及临床意义.

方法: 采用免疫组织化学方法检测 49 例胆管癌及 16 例胆管良性病变组织中 CD44v6 和 nm23-H1 的表达. 分析与临床病理学特征的相关性.

结果: CD44v6 阳性表达率在胆管癌组明显高于胆管良性病变组 69.40% vs 18.75%, $P < 0.01$; CD44v6 表达与胆管癌的临床分期、转移及预后有关. nm23-H1 在胆管癌组织中的阳性表达率明显低于胆管良性病变组 53.1% vs 87.50%, $P < 0.05$; nm23-H1 的表达与胆管癌的组织学分级、临床分期、转移及预后密切相关. CD44v6 和 nm23-H1 在胆管癌组织中表达呈负相关 ($r = -0.359$, $P < 0.05$).

结论: CD44v6 的表达与胆管癌的临床分期、转移及预后有关, nm23-H1 的表达与胆管癌的组织学分级、临床分期、转移及预后有关; 二者可能在胆管癌细胞的侵袭和转移中起重要作用. 联合检测二者有利于评估胆管癌的生物行为及判断预后.

张炳远, 闫尚伦, 李玉军, 吴力群. 胆管癌组织中 CD44v6 和 nm23-H1 的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1127-1130
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1127.asp>

0 引言

恶性肿瘤的侵袭和转移是受多因素调控的复杂过程, 涉及肿瘤细胞恶性增殖、肿瘤组织新生血管形成、肿瘤细胞黏附、分泌蛋白降解基质及肿瘤细胞迁移运动等一系列过程. 已有研究表明, CD44v6 和 nm23-H1 在肿瘤的侵袭和转移中起着十分重要的作用. 我们联合检测 CD44v6 和 nm23-H1 在胆管癌中的表达, 并结合临床和随访资料分析, 旨在探讨他们的表达特征和临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 选取青岛大学医学院 1999-01/2001-01 间 49 例手术切除的肝外胆管癌患者的存档组织蜡块, 每例均有详细的临床资料、手术记录及 18 mo 以上的随访结

果, 全部病例均经病理证实. 其中男 26 例, 女 23 例, 年龄 38-77 (平均 54.3 ± 7.4) 岁. 按 CT 显示肿瘤大小 0.8-6.0 cm, 其中 ≤ 2.0 cm 者 15 例, > 2.0 cm 者 34 例. 按部位分肝门部胆管癌 (上段癌) 27 例, 中段癌 8 例, 下段癌 14 例. 临床 PTNM 分期 I 期 4 例, II 期 9 例, III 期 15 例, IV 期 21 例. 组织学分级包括 I 级 (高分化) 10 例, II 级 (中分化) 21 例, III 级 (低分化) 18 例. 临床和病理证实伴有转移者 27 例 (包括淋巴结、肝、胆囊、肠系膜和胰腺等), 无转移者 22 例. 49 例胆管癌患者生存时间 > 18 mo 者 17 例, ≤ 18 mo 者 32 例. 同时取 16 例经手术及病理学检查证实的胆管良性病变 (9 例胆总管囊肿, 7 例胆管黏膜慢性炎症) 蜡块标本做对照. 用已知阳性组织切片做对照片. CD44v6 (工作浓度 1:100) 和 nm23-H1 (工作浓度 1:50) 单克隆抗体 (鼠抗人) 和 SP 试剂盒均购自福州迈新生物技术公司.

1.2 方法 采用 SP 免疫组织化学法, 所有标本均经 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 每例 4 μ m 连续切片, 分别作 HE 染色及 SP 免疫组化染色, SP 染色法按照 SP 试剂盒说明书进行. 结果判断标准: CD44v6 和 nm23-H1 阳性信号为细胞膜和 (或) 细胞质内出现棕黄色或棕褐色染色. 根据染色强度及显色癌细胞比例将染色分为 “-”, “+”, “++” 三级. (1) 按切片细胞显色有无及深浅评分: 无显色为 0 分, 浅黄色为 1 分; 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分. (2) 按显色细胞比例记分: 显色细胞 $< 10\%$ 为 0 分; $10-30\%$ 显色为 1 分; $31-60\%$ 显色为 2 分; 60% 以上显色为 3 分. 每例积分 = (1) \times (2). 按积分高低分为: 阴性 (-), 积分为 0 分; 阳性 (+), 积分 1-4 分; 强阳性 (++) , 积分 > 4 分.

统计学处理 根据资料性质 CD44v6 在胆管癌及正常胆管中的表达差异、及其表达与胆管癌患者性别、组织学分级、是否伴发转移、存活时间关系, nm23-H1 在胆管癌及正常胆管中的表达差异、及其表达与胆管癌患者性别、年龄、肿瘤大小、组织学分级、临床分期、是否伴发转移、存活时间关系应用 χ^2 检验; CD44v6 与胆管癌患者年龄、肿瘤大小、临床分期、应用 χ^2 校正检验; CD44v6、nm23-H1 与胆管癌部位关系应用精确检验法; CD44v6 与 nm23-H1 胆管癌组织中的表达相关性应用 Spearman 等级相关分析.

2 结果

2.1 CD44v6 和 nm23-H1 的表达 CD44v6 阳性表达产物呈棕黄色或棕褐色, 主要定位于细胞膜 (图 1), nm23-H1 阳性表达产物呈棕黄色或棕褐色颗粒状或团块状, 主要定位于细胞质 (图 2). 16 例胆管良性病变组织中, CD44v6 阳性表达 3 例, 阳性率为 18.75% (3/16), nm23-H1 阳性表

达14例,阳性率为87.50%。49例胆管癌中,CD44v6和nm23-H1的阳性表达率分别为69.40%(34/49)和53.1%(26/49)。CD44v6在胆管癌中的阳性表达率显著高于良性病变组织($\chi^2 = 12.61, P < 0.01$),nm23-H1在胆管癌中的阳性表达率显著低于良性病变组织($\chi^2 = 6.04, P < 0.05$)。

2.2 CD44v6和nm23-H1表达与胆管癌临床病理特征的关系 CD44v6在胆管癌中的表达与患者性别($\chi^2 = 0.36, P > 0.05$)、年龄($\chi^2 = 0.01, P > 0.05$)、肿瘤大小($\chi^2 = 0.004, P > 0.05$)、肿瘤部位($P = 0.87, P > 0.05$)及组织学分级($\chi^2 = 0.14, P > 0.05$)、TNM($\chi^2 = 3.13, P > 0.05$)分期无关,与转移状况($\chi^2 = 7.07, P < 0.01$)及预后($\chi^2 = 6.11, P < 0.05$)密切相关;nm23-H1在胆管癌中的表达与患者年龄($\chi^2 = 0.01, P > 0.05$)、性别($\chi^2 = 0.01, P > 0.05$)、肿瘤大小($\chi^2 = 0.0006, P > 0.05$)、肿瘤部位($P = 0.99, P > 0.05$)、组织学分级($\chi^2 = 4.57, P > 0.05$)无关,与TNM分期($\chi^2 = 4.05, P < 0.05$)、转移状况($\chi^2 = 6.20, P < 0.05$)及预后($\chi^2 = 4.79, P < 0.05$)密切相关(表1)。

2.3 胆管癌组织中CD44v6表达与nm23-H1表达的关系在CD44v6表达阳性的34例胆管癌组织中,nm23-H1阳性者14例(41.2%),在CD44v6阴性的15例中,nm23-H1阳性者12例(80.0%)。经统计学处理,CD44v6表达与nm23-H1表达呈负相关($r = -0.359, P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 CD44v6在胆管癌组织中的表达及临床意义 CD44是

一种广泛分布于细胞表面的跨膜糖蛋白,属细胞黏附分子(CAM)家族成员。细胞黏附分子(CAM)所介导的细胞或细胞外基质(EAM)的相互作用,是恶性肿瘤形成、侵袭和转移的生物学基础。人类CD44基因定位于11号染色体短臂上,CD44外显子有两种,一种是组成型外显子,另一种是V区变异性拼接外显子,其产生的亚型主要有标准型CD44(CD44s)和变异型CD44(CD44v),CD44v6是CD44的一种拼接变异体,他的出现可改变肿瘤细胞表面CAM的结构和功能,使肿瘤细胞侵袭和转移的能力增强^[1-2]。近年来研究发现,CD44v6的过量表达与多种人体恶性肿瘤,如结肠癌、胃癌、原发性肝癌、前列腺癌等许多肿瘤的发生发展、侵袭和转移密切相关^[3-12]。我们采用免疫组化方法检测CD44v6在49例胆管癌组织和16例胆管良性病变组织中的表达,并结合资料分析。结果显示,CD44v6阳性表达率在胆管癌中显著高于胆管癌良性病变($P < 0.01$),与Mikami *et al* 研究结果相似^[13],CD44v6表达阳性与胆管癌的转移及预后呈正相关,CD44v6表达阳性的患者术后18 mo内复发和转移的机会显著增高,存活率明显降低。结果表明,CD44v6参与胆管癌的发生和细胞恶性转化过程,在肿瘤临床进展和转移过程中起着重要作用,是胆管癌转移潜能的重要标志。因此,CD44v6可作为检测胆管癌和判断预后的可靠病理生理学指标。

3.2 nm23-H1在胆管癌组织中的表达及临床意义 Steeg *et al*于1988年利用差式筛选方法,发现一种cDNA克隆的表达与鼠K-1735黑色素瘤的转移能力有关,此即

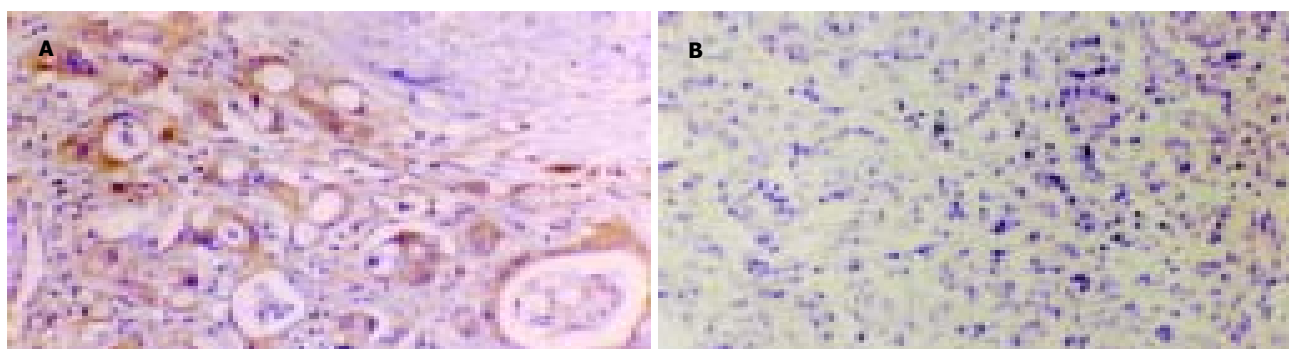


图1 CD44v6在胆管癌组织中的表达×200。A: 阳性; B: 阴性。

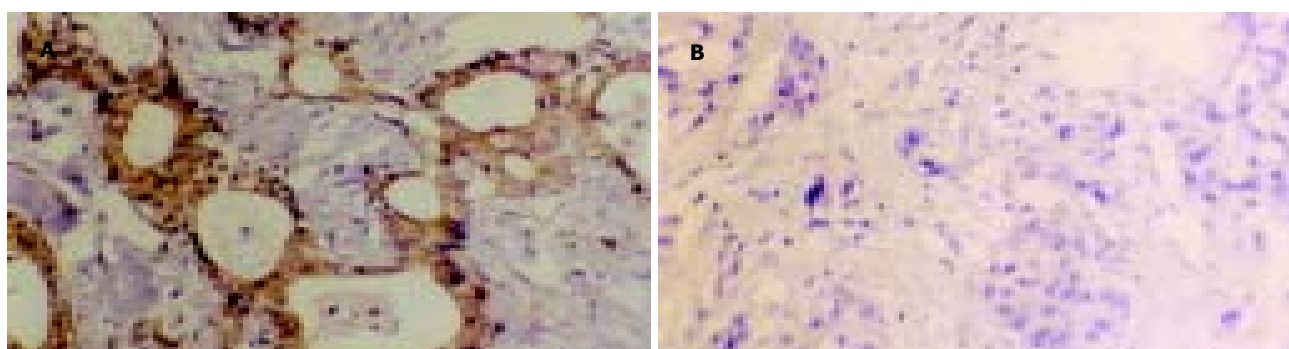


图2 nm23H1在胆管癌组织中的表达×200。A: 阳性; B: 阴性。

表1 CD44v6 和 nm23-H1 表达与胆管癌临床病理特征的关系

病理特征	n	CD44v6				nm23-H1			
		-	+	++	R	-	+	++	R
性别									
男	26	7	10	9	73.1	12	8	6	53.8
女	23	8	6	9	65.2	11	8	4	52.2
年龄									
>50岁	38	12	11	15	68.4	18	13	7	52.6
≤50岁	11	3	5	3	72.7	5	3	3	54.5
肿瘤大小									
>2.0 cm	34	10	13	11	70.6	16	13	5	52.9
≤2.0 cm	15	5	3	7	66.7	7	3	5	53.3
部位									
上段	27	9	10	8	66.7	13	9	5	51.9
中段	8	2	2	4	75	4	3	1	50.0
下段	14	4	4	6	71.4	6	4	4	57.1
组织学分级									
I	10	3	3	4	70.0	4	4	2	60.0
II	21	7	6	8	66.7	7	9	5	66.7
III	18	5	7	6	72.2	12	3	3	33.3
临床分期									
I-II	13	7	3	3	46.1	3	5	5	76.9 ^a
III-IV	36	8	13	15	77.8	20	11	5	44.4
伴转移									
无	22	11	5	6	50.0 ^b	6	10	6	72.7 ^a
有	27	4	11	12	85.2	17	6	4	37.0
存活时间									
≤18 mo	32	6	11	15	81.3 ^a	19	7	6	40.6 ^a
>18 mo	17	9	5	3	47.1	4	9	4	70.6

R 为阳性表达率, “+”、“++” 合并后再与 “-” 比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

nm23 基因. 人类 nm23 基因主要有两个亚型即 nm23-H1 和 nm23-H2. 临床研究最多的是 nm23-H1, 人 nm23-H1 基因定位于 17 号染色体着丝点附近, 即 17q21.3-22, 其所编码的蛋白质为核苷二磷酸激酶 (NDPK), NDPK 被认为至少参与两个在肿瘤发育上起重要作用的功能^[14-15]: 微管的聚合和解聚以及 G 蛋白介导的细胞信号传导. 微管的聚合和解聚需要由 NDPK 介导的转磷酸作用所提供的 GTP, 因此 nm23-H1 蛋白的改变, 一方面可能使微管聚合异常而引起减数分裂时纺锤体的异常, 从而导致肿瘤细胞染色体非整倍体的形成, 促进肿瘤的发展, 另一方面, 他可能通过影响细胞骨架而引起细胞运动, 从而参与浸润转移过程. NDPK 的第二个功能是在信号传导过程中使 GDP 还原为 GTP, 从而使 G 蛋白激活, 可以设想以这种方式能调节大量的蛋白介导的细胞信号传导的反应, 进而参与肿瘤的发生和发展. 在人类多种肿瘤如大肠癌、

乳腺癌、肝癌、肺癌等中, nm23-H1 的表达与肿瘤的转移及临床预后不良呈负相关^[16-17]. 我们的研究结果显示, nm23-H1 表达阳性率在胆管癌中显著低于胆管良性病变组织. nm23-H1 表达阳性与胆管癌的临床分期和转移呈显著负相关. nm23-H1 表达阴性的患者术后 18 mo 复发和转移的机会显著增高, 存活率明显降低.

我们的研究还发现, nm23-H1 表达阳性的肿瘤组织中存在着染色强度不同的细胞群, 尤其是在肿瘤边缘向邻近正常组织浸润的细胞多为阴性表达. 这表明在同一肿瘤内存在着侵袭力不同的多个细胞亚群, nm23-H1 阴性的细胞系是参与浸润和转移的具有高侵袭潜能的细胞, 对肿瘤的发展及预后起重要作用. 同时, 也反映了 nm23-H1 基因对胆管癌浸润的抑制作用.

总之, nm23-H1 表达的缺失或失活与胆管癌的组织分化、临床分期及转移密切相关, 尤其在反映肿瘤向邻

近器官侵犯和转移方面有重要意义,通过检测 nm23-H1 基因的表达可指导临床准确估计肿瘤的侵袭性和转移趋势,选择适宜的治疗方案以及评估预后。

3.3 CD44v6和nm23-H1表达的相互关系 在恶性肿瘤发生的癌基因研究中,许多学者提出了基因协同作用假说,认为在恶性肿瘤发生、发展和转移的各阶段,至少有两个或两个以上功能不同的异常激活的基因各自发挥不同作用,并在时间和空间上相互配合,协同促进了细胞的癌变。目前,有关 CD44v6 和 nm23-H1 相关性的报道甚少,结果也不一致^[18-19]。我们的研究结果表明,在胆管癌组织中 CD44v6 和 nm23-H1 表达呈负相关($r = -0.359$, $P < 0.05$),说明 CD44v6 和 nm23-H1 具有肿瘤转移过程中存在协同作用。其中 CD44v6 阳性表达伴 nm23-H1 阴性表达的患者发生淋巴结转移和肝转移的可能性大。本研究显示5例同时有淋巴结和肝转移的胆管癌 CD44v6 均为阳性表达,而 nm23-H1 均为阴性表达。有资料表明,CD44v6 也具有 GTP 连接蛋白和 G 蛋白的特性^[2],而 CD44v6 作为黏附分子参与细胞骨架蛋白形成伪足,促进转移。所以, nm23-H1 和 CD44v6 可能共同通过 G 蛋白及细胞骨架蛋白的调节来影响转移的发生,但确切的机制,仍有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 3):373-380
- 2 Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;46:165-186
- 3 Bhatavdekar JM, Patel DD, Chikhlikar PR, Shah NG, Vora HH, Ghosh N, Trivedi TI. Molecular markers are predictors of recurrence and survival in patients with Dukes B and Dukes C colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2001;44:523-533
- 4 Gu HP, Shang PZ, Zhou CL. Expression of CD44v6 and E-cadherin in prostate carcinoma and metastasis of prostate carcinoma. *Zhonghua Nan Kexue* 2004;10:32-38
- 5 Xin Y, Grace A, Gallagher MM, Curran BT, Leader MB, Kay EW. CD44V6 in gastric carcinoma: a marker of tumor progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9:138-142
- 6 Endo K, Terada T. Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol* 2000;32:78-84
- 7 Yue SQ, Yang YL, Dou KF, Li KZ. Expression of PCNA and CD44mRNA in colorectal cancer with venous invasion and its relationship to liver metastasis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2863-2865
- 8 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003;23:1581-1588
- 9 Chun SY, Bae OS, Kim JB. The significance of CD44 variants expression in colorectal cancer and its regional lymph nodes. *J Korean Med Sci* 2000;15:696-700
- 10 Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Kosma VM. Expression and prognostic value of CD44 standard and variant v3 and v6 isoforms in prostate cancer. *Eur Urol* 2001;39:138-144
- 11 Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, Yang DZ, Shi JS, Liang AL, Liu NN, Wang XM. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D. *World J Gastroenterol* 2003;9:1482-1486
- 12 Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Pyrhonen S. CD44 variant 6 expression predicts response to treatment in advanced colorectal cancer. *Oncol Rep* 2004;11:41-45
- 13 Mikami T, Saegusa M, Mitomi H, Yanagisawa N, Ichinoe M, Okayasu I. Significant correlations of E-cadherin, catenin, and CD44 variant form expression with carcinoma cell differentiation and prognosis of extrahepatic bile duct carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2001;116:369-376
- 14 Hartsough MT, Morrison DK, Salerno M, Palmieri D, Ouatas T, Mair M, Patrick J, Steeg PS. Nm23-H1 metastasis suppressor phosphorylation of kinase suppressor of Ras via a histidine protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2002;277:32389-32399
- 15 Roymans D, Willems R, Van Blockstaele DR, Slegers H. Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:465-476
- 16 Hartsough MT, Steeg PS. Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:301-308
- 17 Otero AS. NM23/nucleoside diphosphate kinase and signal transduction. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:269-275
- 18 Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, Ma JP. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004;10:776-782
- 19 Messinetti S, Giacomelli L, Fabrizio G, Giarnieri E, Gabatel R, Manno A, Feroci D, Guerriero G, Masci E, Vecchione A. CD44v6 and Nm23-H1 protein expression related to clinico pathological parameters in colorectal cancer. *Ann Ital Chir* 2003;74:45-51

编辑 张海宁

结肠癌LS174细胞培养上清对树突状细胞诱导CTL杀伤效应的影响

陈翔, 汪森明, 孙海, 何威

陈翔, 汪森明, 孙海, 何威, 南方医科大学附属珠江医院肿瘤科
广东省广州市 510280

通讯作者: 陈翔, 510280, 广东省广州市工业大道中253号, 南方医科大学珠江医院. chenxiangcc1@163.com
电话: 020-88167196

收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-03-10

摘要

目的: 观察结肠癌细胞对人单个核细胞源树突状细胞(DC)诱导的CTL杀伤效应的影响, 探讨其在人体的免疫逃避机制。

方法: 人外周血分离单个核细胞以GM-CSF和IL-4培养DC, 用结肠癌LS174细胞的提取物诱导DC, 并激活T淋巴细胞抗肿瘤效应, 在此不同过程中, 体系中加入人结肠癌细胞系LS174的培养上清液. 以正常培养体系为对照, 通过计算细胞毒杀伤率检测不同条件下DC激活同种异体T淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的能力。

结果: LS174细胞培养上清液作为条件培养的DC, 在DC培养的早期阶段对DC激活过程有明显的影响(在DC培养的第1 d加入肿瘤培养上清组, 第3 d加入肿瘤培养上清组 vs 正常培养的DC组, DC培养第5 d加入肿瘤培养上清组, DC激活T淋巴细胞过程加入肿瘤培养上清组, $P < 0.05$)。

结论: 肿瘤细胞分泌的某些物质可在DC培养的早期阶段影响肿瘤的免疫, 这可能是肿瘤细胞逃避机体免疫监视的机制之一。

陈翔, 汪森明, 孙海, 何威. 结肠癌LS174细胞培养上清对树突状细胞诱导CTL杀伤效应的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1131-1133
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1131.asp>

0 引言

随着对肿瘤免疫机制的了解以及对树突状细胞(dendritic cell, DC)独特功能的进一步了解, 肿瘤免疫治疗特别是以DC为主的肿瘤疫苗研究成为肿瘤治疗研究的重点之一. DC作为一种专职的抗原呈递细胞能摄取和加工抗原, 激发T细胞免疫, 是目前已知体内功能最强的抗原呈递细胞, 在肿瘤细胞免疫中起着十分重要的作用. 目前的研究表明, 多数肿瘤患者的DC功能受到不同途径、不同程度的抑制, 不能有效激发机体T细胞免疫^[1]. 为探讨肿瘤免疫中DC激活免疫的机制, 我们观察了肿瘤细胞分泌物对负载抗原的DC激活T淋巴细胞, 并对肿瘤细胞产生特异性杀伤效应过程中的影响, 探讨肿瘤细胞逃避机体免疫监视的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI1640 干粉, 胎牛血清, L-谷氨酰胺(L-

glutamine), 青霉素-链霉素(P-S)双抗(Gibco公司); MTT试剂、二甲基亚砜(美国Sigma公司); Ficol1淋巴细胞分离液(相对密度 1.077 ± 1 g/L) (Lymphoprep™公司); 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、白介素4(IL-4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) (Peprotech公司); 结肠癌系LS174细胞(由南方医院消化内科馈赠)。

1.2 方法

1.2.1 结肠癌肿瘤细胞全细胞性抗原的制备 常规培养并收集LS174肿瘤细胞, 用RPMI-1640培养基液稀释结肠癌细胞, 使其成为细胞浓度为 5×10^9 /L的细胞悬液, 分装于冻存管, 严密封口, 用液氮行快速冷冻, 10 min后迅速置入37℃水浴中, 待其完全融化后, 再次放入液氮中, 反复3次, 离心(1 000 r/min)并收集肿瘤细胞碎片作为肿瘤抗原提取物^[2]。

1.2.2 肿瘤细胞培养上清液的制备 收集处于对数生长期的LS174细胞, 计数, 以 2×10^4 /cm²的密度种于50 mL培养瓶中, 37℃、50 mL/L CO₂孵育箱中培养3 d后收集上清液, 过滤, 加入RPMI1640完全培养基, 于-70℃冻存备用^[3]。

1.2.3 外周血单个核细胞(PBMC)的分离 用Ficol1密度梯度离心法分离PBMC, 分离步骤简述如下: 在离心管内加入体积比为1:2的淋巴细胞分离液和肝素化的新鲜稀释血液, 离心20 min(1 500 r/min), 吸取界面层单个核细胞, Hanks液洗涤2次(1 000 r/min, 10 min)。

1.2.4 人外周血T淋巴细胞的分离 取其他健康人外周血, 经淋巴细胞分离液分离后获得单个核细胞, PBS洗去血小板后, 37℃贴壁2 h去除贴壁细胞, 非贴壁细胞以RPMI 1640悬浮, 注入T细胞尼龙毛柱, 37℃孵育1 h后, 冲洗出非黏附细胞做为同种异体T细胞。

1.2.5 DC体外培养 DC的诱导参照文献[4]方法, 并稍作修改. 用RPMI1640完全培养基(含100 mL/L灭活胎牛血清, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.05 mmol/L 2-巯基乙醇, 10^5 U/L P-S双抗), 将PBMC密度调到 2×10^6 /L, 加入24孔板, 每孔1 mL, 37℃、50 mL/L CO₂培养2 h, 洗去非贴壁细胞. 贴壁细胞分两组培养. A组: 为正常组, 仅用含IL-4(100 μ g/L)和GM-CSF(100 μ g/L)的RPMI1640完全培养基培养; B组: 为肿瘤上清抑制组, 分为B1、B2、B3三组, 除加入IL-4(100 μ g/L)和GM-CSF(100 μ g/L)的RPMI1640完全培养基外, 分别于第1、3、5 d加入25%肿瘤培养上清液. 每3 d半量更换新培养基、rhGM-CSF、IL-4和肿瘤上清培养液,

共培养 7 d, 培养结束前 1 d 加或不加肿瘤坏死因子 TNF- α (100 μ g/L)。

1.2.6 致敏DC诱导的特异性CTL对LS174细胞杀伤效应的检测^[5] (1)致敏DC的获取:DC培养第4 d, 两组每孔分别加入终浓度为 40 μ g/L LS174 肿瘤靶细胞冻融物, 第7 d收集悬浮DC, 即为负载冻融LS174肿瘤抗原的DC。(2)负载抗原的致敏DC诱导特异性CTL的产生:T淋巴细胞与负载特异性抗原DC按 100:1 比例混合培养 72 h, 即为CTL。悬浮DC以 1×10^4 /孔加入 24 孔圆底培养板, 正常培养所获A组DC分3组(A1, A2, A3), 其中A2、B1组加入以 25% 肿瘤培养上清液悬浮的人同种T细胞 1×10^6 , 其余每孔加入RPMI1640完全培养液悬浮的人同种T细胞 1×10^6 , 混合培养 72 h。(3)细胞毒性实验:将DC、CTL离心后吸去上清, 其中A3、B1组以浓度为 25% 肿瘤培养上清液悬浮, 其余各组以RPMI1640完全培养液悬浮, 调节细胞浓度为 1×10^6 /mL, 每组分6复孔, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 按效应细胞:LS174为 50:1 比例, 每组3孔, 每孔加入LS174靶细胞 2×10^4 , 每组另外3孔为效应细胞对照孔, 每孔的液体总量为 200 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 的孵箱中孵育 12 h, 加入 5 mmol MTT 20 μ L/孔, 培养 4 h, 吸弃上清, 加入二甲基亚砷 200 μ L/孔, 水浴振荡 10 min, 静止 20 min。在酶标仪上于 570 nm 处读出各实验组的光密度值(A值), 计算其细胞杀伤率。细胞杀伤率计算公式如下:

细胞杀伤率(%) = (DC和CTL细胞孔 A_{570} + 单纯靶细胞孔 A_{570} - 细胞毒实验孔 A_{570}) / 单纯靶细胞 $A_{570} \times 100\%$

2 结果

2.1 形态学观察 PBMC经 2 h 贴壁后, 贴壁细胞数量较少、体积小, 诱导 2 d, 贴壁细胞伸展, 呈高度多形性; 培养 6-7 d 细胞形态不规则, 粗细不等的毛刺多而密, 呈现典型的DC形态。含有肿瘤细胞培养上清液的DC, 第5 d时细胞团散开, 较多贴壁伸展的巨噬细胞, 典型的毛刺状细胞较少见。

2.2 致敏DC诱导特异性CTL对肿瘤细胞的杀伤效应 采用SPSS10.0统计软件, 进行各组间One-WayANOVA分析。A1组无肿瘤上清抑制, A2组肿瘤上清抑制DC诱导T

细胞为CTL, A3组肿瘤上清抑制CTL细胞毒作用, B1组第1 d肿瘤上清抑制DC成熟, B2组第3 d肿瘤上清抑制DC成熟, B3组第5 d肿瘤上清抑制DC成熟。其中A1组与B1、B2组有明显的差异($P < 0.05$), A1组与A2组、A3组、B3组之间无明显差异(表1)。

3 讨论

我们联合应用GM-CSF及IL-4直接从外周血中培养出大量DC。结果显示, 源于外周血的PBMC在体外经GM-CSF及IL-4共同刺激, 再通过源于结肠癌LS174肿瘤细胞的肿瘤抗原粗提物刺激后能够诱导同种异体混合T淋巴细胞产生CTL, 具有高效的抗肿瘤免疫反应。通过本组实验结果还可见到, 在DC激活T淋巴细胞的过程的早期阶段, 加入肿瘤培养上清可以具有一定的抑制CTL的特异免疫反应, 与对照组有显著差异。在DC培养的第1 d和第3 d加入肿瘤培养上清对DC激活T淋巴细胞的抗肿瘤免疫作用有明显抑制作用。而在DC培养的第5 d加入肿瘤培养上清则不能抑制抗肿瘤作用, 在DC提呈抗原给T淋巴细胞过程及激活的CTL杀伤靶细胞的过程中, 加入肿瘤培养上清同样不能抑制抗肿瘤作用。

肿瘤免疫耐受的机制可能有^[6]: (1)肿瘤抗原的免疫原性弱; (2)肿瘤表面主要组织相容复合分子(MHC)、协同刺激因子及黏附因子的表达下降; (3)DC表面共刺激分子的表达缺失或下调; (4)肿瘤产生某些免疫抑制因子, 如血管内皮生长因子(VEGF)、白介素-10(IL-10)、转化生长因子- β (TGF- β)等, 对DC成熟和分化的抑制; (5)大多数肿瘤抗原属于自体抗原, 易于诱发免疫耐受; (6)肿瘤细胞抗凋亡或诱导免疫细胞凋亡。实验中在DC培养的早期加入结肠腺癌LS174细胞培养液上清, 能有效抑制抗肿瘤免疫反应, 可能是结肠癌分泌的可溶性免疫抑制因子导致DC的不成熟或功能缺陷, 不能有效提呈抗原。而在DC培养后期, 则不受肿瘤分泌因子的影响。在DC尚处于未成熟阶段, 肿瘤分泌物可减少DC的增殖成熟, 还可能通过分泌IL-10等因子影响DC的有效提呈功能。说明在DC提呈抗原激活T细胞的过程中, 肿瘤对此过程的细微影响就可能导致免疫耐受或不应答。

Schuler *et al*^[7]总结了近年来运用抗原负载的DC瘤苗进行的实验及临床研究, 认为对DC瘤苗的研究不仅需要临床研究的标准一致化, 还要对DC生物特性的更为细致的研究。DC对T细胞的激活过程非常复杂, 至少需要两个信号的传导^[8]。DC功能可受到体内微环境的影响而诱导对抗原免疫耐受的可能, 如用IL-10处理后, DC能提呈抗原诱导耐受。多种肿瘤分泌IL-10, 通过肿瘤微环境中的DC诱导免疫耐受, 这可能是肿瘤逃避免疫攻击的机制之一。但体外培养成熟的DC可以抵抗肿瘤IL-10的免疫抑制功能^[9]。从实验中也可见到, 在成熟DC诱导T细胞为CTL以及CTL对靶细胞杀伤的过程中, 加入肿瘤培养上清并不能抑制CTL的杀伤活性, 说明成熟后的DC及CTL

表1 不同条件DC激活的CTL对LS174靶细胞的杀伤效应(mean \pm SD)

效应细胞	杀伤率(%)
A1组	61.55 \pm 11.71
A2组	55.12 \pm 11.70
A3组	64.30 \pm 16.22
B1组	31.63 \pm 8.57 ^a
B2组	33.33 \pm 7.69 ^a
B3组	57.22 \pm 15.64

^a $P < 0.05$ vs A1, A2, A3, B3组。

较少受到肿瘤分泌的可溶性因子的影响,可以诱发出有效的抗肿瘤免疫反应。

4 参考文献

- 1 Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1755-1766
- 2 Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 1997;70:706-715
- 3 Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1096-1103
- 4 朱学军,曹雪涛,于益芝,陈国友,万涛,马施华,唐华,章卫平. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. *中国肿瘤生物治疗杂志* 1997;4:302-306
- 5 李明松,袁爱力,张万岱,刘思德,吕爱民,周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. *世界华人消化杂志* 1999;7:161-163
- 6 Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:844-854
- 7 Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003;15:138-147
- 8 Espinoza-Delgado I. Cancer vaccines. *Oncologist* 2002;7 (Suppl 3):20-33
- 9 Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Knop J, Schuler G, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induced a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999;93:1634-1642

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病大鼠的防治作用

吴贵恺,杨秋香,李玉林,荣绍元,司艳菱,刘信荣

吴贵恺,司艳菱,唐山市工人医院消化科 河北省唐山市 063000
杨秋香,唐山市协和医院 河北省唐山市 063004
李玉林,华北煤炭医学院附属医院消化科 河北省唐山市 063000
荣绍元,唐海县医院 河北省唐海县 063200
刘信荣,华北煤炭医学院附属医院 河北省唐山市 063000
通讯作者:吴贵恺,063000,河北省唐山市文化路27号,河北省唐山工人医院消化科. quikaivw@163.com
电话:0315-3722233 传真:0315-2814801
收稿日期:2005-03-01 接受日期:2005-03-22

摘要

目的:探讨不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病的防治作用。

方法:40只SD大鼠随机分为低剂量二甲双胍组,中剂量二甲双胍组,高剂量二甲双胍组,模型组和正常组,每组均8只。模型组和治疗组大鼠以高脂饲料喂养,正常组大鼠以普通饲料喂养。低、中、高剂量二甲双胍治疗组大鼠高脂饮食2 wk后分别以100 mg/kg、200 mg/kg、300 mg/kg的二甲双胍每日一次灌胃治疗。模型组、正常组则给予等容积的蒸馏水每日一次灌胃。实验12 wk处死各组大鼠。测定血清转氨酶、血脂,HE染色观察肝脏病理改变。

结果:12 wk模型组大鼠血清ALT、AST、TG值明显升高,肝脏表现为脂肪性肝炎,治疗各组大鼠血清ALT、

TG明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),接近正常组水平,肝脏表现为轻、中度脂肪肝。肝组织炎症活动计数明显下降($P<0.05$),各治疗组之间血清ALT、AST、TG水平、肝细胞脂肪变性程度无显著差异。

结论:二甲双胍对大鼠肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病有防治作用,低、中、高剂量二甲双胍对非酒精性脂肪性肝病防治效果差异无显著。

吴贵恺,杨秋香,李玉林,荣绍元,司艳菱,刘信荣. 不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病大鼠的防治作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1133-1135
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1133.asp>

0 引言

随着生活方式及膳食结构的改变,非酒精性脂肪性肝病(NALFD)的发病率明显增高,已成为全球普遍关注的医学问题和社会问题。肥胖、高脂血症性脂肪肝是临床上最常见的非酒精性脂肪肝类型,目前以节制饮食、增加运动和修正不良行为的减肥方法是公认NALFD有效的基础治疗方法。然而,急剧地改变患者的饮食习惯和生活方式,部分患者难以接受,这就需要研究有效的药物治疗方

较少受到肿瘤分泌的可溶性因子的影响,可以诱发出有效的抗肿瘤免疫反应。

4 参考文献

- 1 Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1755-1766
- 2 Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 1997;70:706-715
- 3 Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1096-1103
- 4 朱学军,曹雪涛,于益芝,陈国友,万涛,马施华,唐华,章卫平. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. *中国肿瘤生物治疗杂志* 1997;4:302-306
- 5 李明松,袁爱力,张万岱,刘思德,吕爱民,周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. *世界华人消化杂志* 1999;7:161-163
- 6 Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:844-854
- 7 Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003;15:138-147
- 8 Espinoza-Delgado I. Cancer vaccines. *Oncologist* 2002;7 (Suppl 3):20-33
- 9 Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Knop J, Schuler G, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induced a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999;93:1634-1642

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病大鼠的防治作用

吴贵恺,杨秋香,李玉林,荣绍元,司艳菱,刘信荣

吴贵恺,司艳菱,唐山市工人医院消化科 河北省唐山市 063000
杨秋香,唐山市协和医院 河北省唐山市 063004
李玉林,华北煤炭医学院附属医院消化科 河北省唐山市 063000
荣绍元,唐海县医院 河北省唐海县 063200
刘信荣,华北煤炭医学院附属医院 河北省唐山市 063000
通讯作者:吴贵恺,063000,河北省唐山市文化路27号,河北省唐山工人医院消化科. quikaivw@163.com
电话:0315-3722233 传真:0315-2814801
收稿日期:2005-03-01 接受日期:2005-03-22

摘要

目的:探讨不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病的防治作用。

方法:40只SD大鼠随机分为低剂量二甲双胍组,中剂量二甲双胍组,高剂量二甲双胍组,模型组和正常组,每组均8只。模型组和治疗组大鼠以高脂饲料喂养,正常组大鼠以普通饲料喂养。低、中、高剂量二甲双胍治疗组大鼠高脂饮食2 wk后分别以100 mg/kg、200 mg/kg、300 mg/kg的二甲双胍每日一次灌胃治疗。模型组、正常组则给予等容积的蒸馏水每日一次灌胃。实验12 wk处死各组大鼠。测定血清转氨酶、血脂,HE染色观察肝脏病理改变。

结果:12 wk模型组大鼠血清ALT、AST、TG值明显升高,肝脏表现为脂肪性肝炎,治疗各组大鼠血清ALT、

TG明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),接近正常组水平,肝脏表现为轻、中度脂肪肝。肝组织炎症活动计数明显下降($P<0.05$),各治疗组之间血清ALT、AST、TG水平、肝细胞脂肪变性程度无显著差异。

结论:二甲双胍对大鼠肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病有防治作用,低、中、高剂量二甲双胍对非酒精性脂肪性肝病防治效果差异无显著。

吴贵恺,杨秋香,李玉林,荣绍元,司艳菱,刘信荣. 不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病大鼠的防治作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1133-1135
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1133.asp>

0 引言

随着生活方式及膳食结构的改变,非酒精性脂肪性肝病(NALFD)的发病率明显增高,已成为全球普遍关注的医学问题和社会问题。肥胖、高脂血症性脂肪肝是临床上最常见的非酒精性脂肪肝类型,目前以节制饮食、增加运动和修正不良行为的减肥方法是公认NALFD有效的基础治疗方法。然而,急剧地改变患者的饮食习惯和生活方式,部分患者难以接受,这就需要研究有效的药物治疗方

法,目前尚无有效的药物治疗方法.二甲双胍做为胰岛素受体增效剂用于治疗NALFD,国外已有动物实验^[1]及小样本病例报道^[2].我们通过动物实验方法探讨二甲双胍对NALFD是否有防治作用,低、中、高剂量二甲双胍对NALFD防治作用有否差异,为二甲双胍用于人类治疗NALFD及剂量的选择提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 40只雄性SD大鼠,购自河南医科大学动物中心,体重 150 ± 10 g,普通饲料喂养1 wk后,随机分为5组,每组均8只.正常组普通饲料喂养;模型组,低剂量二甲双胍治疗组,中剂量二甲双胍治疗组及高剂量二甲双胍治疗组喂高脂饲料,按照我国学者范建高创立的方法,在普通饲料基础上加10%猪油,2%胆固醇3 mo制备肥胖、高脂血症大鼠脂肪肝模型.实验动物自由饮水和进食,分笼饲养于 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 明暗各12 h的动物实验室12 wk.

1.2 方法 在高脂饲料喂养2 wk后,低、中、高剂量组大鼠在喂高脂饲料的同时分别按 $100\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、 $200\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、 $300\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ (由成人剂量 $0.5\text{ g}/\text{d}$; $1.0\text{ g}/\text{d}$; $1.5\text{ g}/\text{d}$ 的10倍折算)给予二甲双胍每日一次灌胃,正常组与模型组给予等容积的蒸馏水每日一次灌胃.喂养12 wk处死各组大鼠,鼠处死前,隔夜禁食,次日称量体重后,以 $1\text{ g}/\text{L}$ 水合氯醛麻醉,右心室取血处死,称取肝脏湿重,并从肝右叶中部切取2块肝组织,用 $40\text{ g}/\text{L}$ 甲醛固定后制备石蜡切片.

1.2.1 肝指数计算 处死大鼠时,称量体重,肝脏湿重,肝指数(%) = 肝脏湿重 / 体重 $\times 100\%$

1.2.2 血清学指标检测 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、甘油三脂(TG)和总胆固醇(TC).

1.2.3 病理学检查 石蜡切片HE染色观察肝脏病理学变化.按肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数之比值为 $0, <1/3, 1/3-2/3$ 和 $>2/3$ 将肝细胞脂肪变性分为(-)-(++)4个等级, $\geq 1/3$ 诊断为脂肪肝.炎症活动度计分标准分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑样坏死(PN)、桥接坏死(BN)四项,每项根据病变程度分别计1-4分,因为PN、BN严重度与预后直接相关,故计分2倍于其他病变,计分公式为 $P+L+2PN+2BN$.

表2 各组大鼠血清生化指标和肝脏炎症活动度记分结果

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	炎症活动度
正常组	8	38.50 ± 5.17	143.50 ± 21.25	0.72 ± 0.20	1.252 ± 0.18	0.53 ± 0.57
模型组	8	95.00 ± 40.50^b	247.76 ± 77.37	0.78 ± 0.22	2.24 ± 0.28^b	6.12 ± 1.35^b
低剂量组	8	44.40 ± 11.10^c	134.20 ± 30.22	0.49 ± 0.15^d	1.94 ± 0.32	3.23 ± 0.64^c
中剂量组	8	42.20 ± 10.20^c	143.00 ± 27.80	0.43 ± 0.17^d	1.71 ± 0.35	3.15 ± 0.58^c
高剂量组	8	41.80 ± 12.50^c	153.33 ± 26.70	0.50 ± 0.16^d	1.95 ± 0.33	3.02 ± 0.62^c

^b $P < 0.01$ vs 正常组, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组.

统计学处理 计量资料用均数 \pm 标准差(mean \pm SD),组间比较采用单因素方差分析,等级资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 一般情况 实验中5组大鼠均无死亡,模型组大鼠体重与正常组相比无显著差异,但肝指数均显著高于正常组($P < 0.01$);治疗组体重低于模型组,肝指数低于模型组($P < 0.05$),治疗组3组之间体重、肝指数无显著差异(表1).

表1 各组大鼠体重和肝指数结果

组别	n	体重(g)	肝指数(%)
正常组	8	449.15 ± 26.80	2.83 ± 0.28
模型组	8	477.63 ± 48.10	5.19 ± 0.78^b
低剂量组	8	380.10 ± 47.20^a	3.28 ± 0.25^a
中剂量组	8	383.40 ± 46.50^a	3.14 ± 0.28^a
高剂量组	8	368.42 ± 46.70^a	3.47 ± 0.23^a

^a $P < 0.05$ vs 模型组, ^b $P < 0.01$ vs 正常组.

2.2 血清脂质变化 与正常组相比,模型组大鼠血清TC水平明显升高($P < 0.05$),TC水平与正常组基本相似.与模型组相比,治疗各组血清TC无显著改变,而TC水平却显著下降($P < 0.01$),各组间无明显差异(表2).

2.3 血清转氨酶变化 模型组大鼠血清ALT、AST较正常组明显升高($P < 0.01$);各治疗组大鼠血清ALT、AST显著下降($P < 0.05$),接近正常组水平,治疗组各组间差异无显著性(表2).

2.4 肝组织病理学变化 大体观察,正常组大鼠肝脏形态正常,模型组大鼠肝脏体积增大,饱满圆钝,色黄油腻,质地较脆.二甲双胍治疗3组大鼠肝脏形态均接近于正常组,肝脏体积略增大,边缘稍钝,暗红色.正常组大鼠肝组织切片HE染色未见明显异常.模型组大鼠肝组织切片可见弥漫性肝细胞脂肪变性,以大泡性脂肪变为主,细胞核被挤到细胞周边.标本中出现小叶内炎症细胞浸润和散在的点状坏死;肝小叶内和汇管区出现以单核细胞、淋巴细胞为主的炎性细胞浸润,往往小叶内炎症较

汇管区炎症更明显, 临近脂变肝细胞可见气球样变肝细胞, 部分大鼠肝组织小叶内可见多个点片状坏死灶, 并有1例出现碎屑样坏死, 1例出现桥接坏死, 2例出现脂肪囊肿, 与正常组比较肝脏炎症活动度计数差异显著 ($P < 0.01$). 各治疗组大鼠肝组织呈轻、中度肝细胞脂肪变性, 无大泡性脂肪变形成, 小叶内、汇管区炎症坏死减轻, 未见碎屑样坏死和桥接坏死, 肝脏炎症活动度计数较模型组明显下降 ($P < 0.05$), 但组间差异无统计学意义 (表2).

3 讨论

非酒精性脂肪性肝病 (NALFD) 是一类肝组织学改变与酒精性肝炎类似但无过量饮酒史的临床综合征, 主要包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、非酒精性脂肪性肝纤维化、非酒精性脂肪性肝硬化. 统计学资料显示肥胖人群单纯性脂肪肝发病率为60%, NASH为20-25%, 肝硬化为2-3%^[3]. NASH患者中肥胖者的比例高达69-100%^[4], 我们选用了高脂饲料喂养的肥胖、高脂血症脂肪肝大鼠动物模型作为研究模型, 该模型与人类肥胖、高脂血症脂肪肝极为相似, 故该模型适用于药物治疗的研究, 其结果对人类具有指导作用.

临床上发现节食、增加运动可提高机体组织对胰岛素的敏感性, 从而改善 NALFD 肝功能及肝脏组化改变, 早期甚至可逆转 NALFD. Day *et al*^[5] 提出的二次打击学说被认为是 NALFD 统一发病机制学说, 他认为胰岛素抵抗 (IR) 是肝脏脂肪堆积的首要原因, 目前普遍认为 IR 和高胰岛素血症是 NALFD 的始动因素而非结果^[3]. 2000 年 Lin 首先报道了应用胰岛素增敏剂二甲双胍治疗具有胰岛素抵抗的遗传性瘦素缺乏的 ob/ob 小鼠脂肪肝获得较好的效果, Uygun 和 Marchesini *et al*^[2, 6] 分别将二甲双胍应用人类 NASH 的治疗获得了血清转氨酶降低, 肝脏缩小, 肝脏脂肪变性减轻, 无明显毒副作用的良好效果. 目前, 国内外尚无不同剂量二甲双胍对 NALFD 干预的研究. 我们采用低、中、高三种剂量二甲双胍对高脂饲料喂养的大鼠进行干预, 结果显示与模型组相比 3 个治疗组均获得了肝指数、血清转氨酶明显降低, 各组肝脏组织学明显改善, 只显示轻、中度脂肪变性, 基本无脂肪大泡形成, 肝小叶及汇管区炎性细胞浸润减轻的病理变化. 治疗组无明显毒副作用, 无 1 例死亡. 统计学处理显示上述指标治疗组与模型组相比差异有显著性. 而治疗组间各项指标差异无显著性.

众所周知, 作为治疗糖尿病的二甲双胍具有抑制机体摄食能力, 他对 NALFD 的防治作用是否简单的为抑制机体摄食作用所致? Lin 的实验结果显示, 每天进食同等能量的二甲双胍治疗组 ob/ob 小鼠与配对的对照组, 只有治疗组各项指标及病理明显改善. 提示二甲双胍治疗 NALFD 非抑制机体摄食量所致. 二甲双胍主要通过以下几

个途径发挥对 NALFD 的防治作用: (1) 通过增强外周组织对胰岛素的敏感性而增加对葡萄糖的利用, 降低血糖但不增加胰岛素分泌, 同时抗脂肪分解从而降低血清游离脂肪酸水平作用^[7-8], 减少肝细胞脂肪储积. (2) 抑制肝细胞内 TNF- α 表达, 从而解除 TNF- α 对胰岛素受体起始信号传递的抑制作用, 减轻肝细胞的胰岛素抵抗, 减少肝内脂肪分解及脂肪储积; (3) 降低肝细胞固醇调节因子结合蛋白-1 (SREBP-1) 表达, 从而减少脂肪酸合成酶 (FAS) 的激活, 导致脂肪酸合成减少; (4) 阻止解偶联蛋白-2 (UCP-2) 在肝细胞的表达, 从而减轻对线粒体 ATP 合成酶的抑制, 提高线粒体合成 ATP 的效率, 阻止组织坏死和纤维化^[9]; (5) 调节肝细胞内被认为是脂肪、糖代谢主要细胞调节因子的 AMP 激酶活性, 从而减少肝脏脂肪储积及炎性坏死^[10].

二甲双胍治疗过程中最大的潜在危险是乳酸中毒, Lalau *et al*^[11] 通过对二甲双胍治疗过程中出现乳酸中毒的病例报告进行分析, 得出单纯应用二甲双胍一种药物治疗不出现乳酸中毒的结论. Marchesini 和 Uygun *et al* 应用二甲双胍治疗人类 NALFD 4 mo 共 54 例, 均未出现乳酸中毒, 只有胃肠道反应. 可见应用二甲双胍治疗 NALFD 是比较安全的. 我们的实验结果提示: 小剂量二甲双胍治疗 NALFD, 仍可起到较好的治疗效果, 且可减少二甲双胍的副作用, 值得在人类 NALFD 中进一步观察、应用.

4 参考文献

- 1 Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000;6:998-1003
- 2 Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Yesilova Z, Gulsen M, Dagalp K. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:537-544
- 3 范建高, 丁晓东, 曾悦. 非酒精性脂肪性肝炎: 美国肝脏病学学会专题研讨会纪要. *肝脏* 2003;8:59-61
- 4 Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohol like liver disease in nonalcoholics: A clinical and histologic comparison with alcohol induced liver injury. *Gastroenterology* 1988;95:1056-1062
- 5 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845
- 6 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001;358:893-894
- 7 Hundal RS, Inzucchi SE. Metformin: new understandings, new uses. *Drugs* 2003;63:1879-1894
- 8 Kirpichnikov D, Mcfarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med* 2002;137:25-33
- 9 Ricquier D. Neonatal brown adipose tissue. UCP-1 and the novel uncoupling protein. *Biochem Soc Trans* 1998;26:120-123
- 10 Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108:1167-1174
- 11 Lalau JD, Race JM. Lactic acidosis in metformin therapy: searching for a link with metformin in reports of metformin-associated lactic acidosis. *Diabetes Obes Metab* 2001;3:195-201

Clostridium difficile 细胞毒素 B 羧基末端功能区的克隆与表达

刘红升, 姜泊, 陈村龙, 陈学清

刘红升, 姜泊, 陈村龙, 陈学清, 广州南方医科大学南方医院消化病研究所 广东省广州市 510515
广州市科技攻关计划资助项目, No. 026G2434
通讯作者: 刘红升, 510515, 广东省广州市, 广州南方医科大学南方医院消化病研究所. liuhs325@163.com
电话: 020-61365830
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-22

摘要

目的: 克隆并表达 *Clostridium difficile* (*C. difficile*) 细胞毒素 B 羧基末端功能区基因, 为探索高效的防治 *C. difficile* 感染的疫苗和诊断抗原奠定基础。

方法: 提取 *C. difficile* 染色体基因, 用 PCR 方法扩增 Toxin B₃ 基因, 将其克隆至表达载体 PET22b(+), 用重组质粒转化大肠杆菌[E.coli BL21(DE3)], 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达. 用 SDS-PAGE 方法对表达产物进行分析。

结果: 从 *C. difficile* 基因组 DNA 中成功地克隆了毒素 B 的羧基末端重复区域的 1 848 bp 基因, 经过双酶切、PCR 和测序鉴定分析, 插入到载体的基因与 GenBank 中公布的 *C. difficile* VPI10463 的 Toxin B₃ 基因序列的同源性为 99%。SDS-PAGE 显示, 目的基因表达产物的分子质量为 71.3 ku, 利用表达载体 PET22b(+)表达出蛋白质, 重组蛋白表达量占菌体总蛋白的 34.8%。

结论: 含 *C. difficile* Toxin B₃ 基因的 PET22b(+)重组质粒能高效表达目的基因. 该重组子的构建为 *Clostridium difficile* 相关性疾病的诊断及后期制备疫苗, 提供了有力的保障。

刘红升, 姜泊, 陈村龙, 陈学清. *Clostridium difficile* 细胞毒素 B 羧基末端功能区的克隆与表达. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1136-1138
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1136.asp>

0 引言

C. difficile 是肠道感染中仅次于弯曲杆菌的常见致病菌, 现已公认为发达国家中最重要的院内感染源之一^[1]. 已论证约 25% 的抗生素相关性腹泻 (AAD)、75% 的抗生素相关性结肠炎以及近 90% 假膜性结肠炎 (PMC) 均与他的感染有关^[2-3]. 尤其是患严重的或多种基础性疾病而长期住院治疗老年人、或是使用广谱抗生素以及免疫功能抑制者更易感染 *C. difficile*, 导致艰难梭菌相关性疾病 (CDAD), 从而延长住院时间、增加医疗费用, 有时甚至因该病引起的严重并发症而死亡. 虽然以口服甲硝唑或万古霉素治疗可取得较好的疗效, 但目前依然存在因对甲硝唑、万古霉素耐药问题及停药后的复发等问题^[3]. 疫苗接种可使高危人群获得持久和较强的免疫力, 是预防与控制感染的有

效措施. 随着分子生物学技术的发展, 有关 *C. difficile* 重组抗原的研究已见较多的报道, 但多数是集中在毒素 A 上^[4-5], 而对毒素 B 的研究则相对较少. 我们根据 Genth *et al*^[6] 的文章将毒素 B 分成 3 个氨基酸片段: CDB1 (氨基酸 1-546, 包含接触反应区), CDB2 (氨基酸 901-1750, 含有假定的跨膜区), CDB3 (氨基酸 1751-2366, 被认为是受体结合区), 发现抗毒素 B 抗体与毒素 B 羧基末端 (氨基酸 1751-2366) 可以发生强烈反应, 说明该段很有可能成为制备疫苗和诊断抗原的重要候选蛋白. 故我们选取了毒素 B 羧基末端 CDB3 (氨基酸 1751-2366) 进行克隆与表达, 为以后的疫苗和抗原鉴定的研究建立基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 用于本实验的 *C. difficile* VPI10463 从兰州生物制品研究所购买. 大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 及质粒 PET22b(+) 系南方医科大学消化研究所存。

1.1.2 工具酶 *Eco*RI 与 *Xho*I 限制性核酸内切酶, *T*₄DNA ligase 酶均为 New England Biolab 公司产品。

1.1.3 试剂 厌氧发生剂、脑心浸液 (干粉) 购自生物梅里埃公司 (BioMerieux). 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒购自北京赛百胜生物制品公司, 琼脂糖、DNA Marker4 由天为时代生物科技公司提供, 质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、IPTG、SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质购自上海博彩生物科技有限公司. 引物合成及 PCR 产物、重组质粒测序由上海博亚生物科技公司完成. 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *C. difficile* 标准株的培养 *C. difficile* VPI 10463 接种于脑心浸液 (BHI) 培养基中, 传种后按 5% 接种于含有生理盐水的透析袋内, 置 BHI 培养基中 37℃ 厌氧环境中透析培养 72 h.

1.2.2 细菌基因组 DNA 和质粒的提取 分别采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒与质粒小量提取试剂盒中的方法提取。

1.2.3 目的基因 (CDB₃) 扩增 参考 GenBank 收录的 *C. difficile* VPI 10463 基因序列, 应用 Omega 2.0 和 primer 5.0 设计引物, 并在其 5' 端加上合适的限制性核酸内切酶的酶切位点^[7], 由上海博亚公司合成序列表 1. 反应条件: 采用 50 μL 反应体系, 按照常规 PCR 条件进行扩增, 热启动法, 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 150 s, 39 个循环后再延伸 10 min. 10 g/L 琼脂

表1 目的基因引物序列及酶切位点

正义链: 5' -TCCGAATTCGCTTATGTCAACTAGTGAA-3',

EcoRI

反义链: 5' -GCACTCGAGTTCCTAATCACTAATTG-3',

XhoI

糖凝胶电泳观察扩增结果. PCR产物送上海博亚生物科技公司测序. 目的基因DNA经*EcoRI*与*XhoI*双酶切, DNA凝胶回收试剂盒回收酶切片段.

1.2.4 质粒PET22b(+)的酶切鉴定和纯化 用*EcoRI*与*XhoI*限制性核酸内切酶对质粒进行双酶切后, 将酶切产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 计算产物条带分子质量, 然后用DNA凝胶回收试剂盒回收.

1.2.5 重组质粒的构建与鉴定 将经酶切纯化的目的基因、质粒PET22b(+)按10:1(摩尔数)进行连接, 反应体系为20 μ L, 在T₄ DNA ligase酶作用下16℃连接12 h, 取100 μ L常规方法制备的(大肠杆菌菌株BL21(DE3)感受态细胞, 加入10 μ L的连接产物, 于冰上放置30 min, 于42℃水浴中热休克90 s, 置冰上5 min, 加入600 μ L的SOC培养基, 37℃摇床上180次/min摇动1 h, 5 000 r/min离心1 min, 弃上清液约600 μ L, 将细菌重悬后, 取100 μ L培养物涂于含氨苄青霉素(100 mg/L) LB固体培养基平板中, 37℃孵育约16 h. 挑取单个菌落, 接种在含氨苄青霉素(100 mg/L) LB液体培养基中, 37℃摇床上200次/min摇菌致A₆₀₀值达0.6, 然后提取重组质粒. 重组质粒的鉴定: 将重组质粒用*EcoRI*与*XhoI*双酶切鉴定; 以重组质粒为模板, 用前述已合成的引物进行PCR反应; 重组质粒送上海博亚生物科技公司测序.

1.2.6 目的基因表达 将经过鉴定的阳性克隆菌落接种到2 mL LB培养液(含200 mg/L氨苄青霉素)中37℃摇床上180次/min摇菌8 h致A₆₀₀值达0.6, 4℃过夜, 然后按2%转接至(含200 mg/L氨苄青霉素) LB培养液中, 继续培养3 h至A₆₀₀值为0.8, 加IPTG至终浓度为1 mmol/L, 诱导后按1 h间隔, 进行取样, 共取样4次.

1.2.7 基因表达产物的SDS-PAGE分析 将菌液样品2 mL 5 000 r/min离心, 5 min, 用500 μ L的PBS将细菌重悬后, 加入同等量的2XSDS-PAGE样品缓冲液, 于100℃水浴5 min, 10 000 g离心, 10 min, 取上清加样. 采用5 g/L的浓缩胶和8 g/L的分离胶, 电泳2.5 h. 凝胶用考马斯亮兰R250染色.

2 结果

2.1 *C. difficile*细胞毒素B羧基末端基因片段(CDB₃)的序列 *C. difficile*细胞毒素B基因经PCR扩增结果电泳分析发现在1 800 bp左右有一条带, 大小与预计相符(图1).

2.2 重组载体的酶切鉴定与测序 将PCR产物经*EcoRI*与*XhoI*双酶切后, 定向插入经同样双酶切的PET22b(+)载体中, 获得重组质粒命名为PET22b(+)CDB₃. 重组质粒

经*EcoRI*与*XhoI*双酶切后电泳初步鉴定结果与预期相符. 直接以重组质粒PET22b(+)CDB₃为模板进行测序, 得到了克隆片段的DNA序列, 与GenBank记录的*C. difficile* VPI10463的ToxinB₃基因序列的同源性为99%.

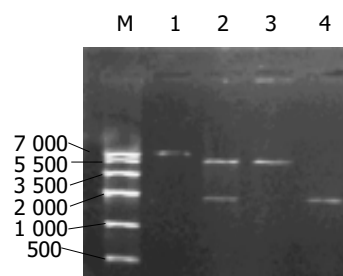


图1 CDB₃基因的PCR产物、重组质粒和PET22b(+)载体用*EcoRI*单酶切的图谱. M: marker; 1: 重组质粒用*EcoRI*单酶切; 2: 重组质粒用*EcoRI*与*XhoI*双酶切; 3: PET22b(+)载体用*EcoRI*单酶切; 4: PCR产物.

2.3 诱导产物的SDS-PAGE 阳性克隆子在IPTG的诱导下, 表达出的蛋白相对分子质量为71.3 ku, 与预期的蛋白大小一致(图2), 凝胶自动扫描分析, 其PET22b(+)CDB₃重组蛋白占菌体总蛋白的34%, 其中分泌表达占菌体总蛋白的22.7%, 可溶性表达占上清的14%, 包涵体占沉淀的82.7%.

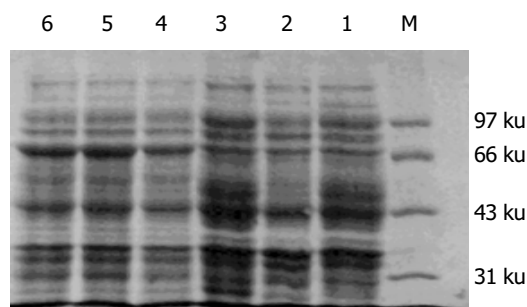


图2 CDB₃基因诱导表达产物的SDS-PAGE分析. M: 低分子质量的标准蛋白(97、66、43、31、20 ku); 1: 空大肠杆菌(BL21)经诱导作用的蛋白; 2: 空含PET22b(+)载体的BL21经诱导的蛋白; 3: 阳性克隆大肠杆菌在未诱导时的蛋白; 4、5、6: 阳性克隆大肠杆菌在IPTG诱导下1、3、4 h的蛋白.

3 讨论

目前, 在艰难梭菌相关性疾病(CDAD)的研究中发现, 艰难梭菌产毒株主要产生的两种外毒素: 毒素A(为分子质量308 ku的肠毒素), 毒素B(为分子质量270 ku的细胞毒素)^[8]. 毒素A具有弱细胞毒作用, 毒素B有极强的细胞毒性, 为毒素A的10倍. 动物模型已证明毒素A与B就是导致腹泻与肠炎症的原因, 多数的*C. difficile*产毒株均可以合成这两种毒素, 而非产毒株艰难梭菌在临床上不具有致病性. 但在动物模型中, 毒素B必须在有小量的毒素A提前给予的情况下才具有致死性, 因为毒素A必须和肠上皮细胞刷状缘上的受体相结合才能改变肠黏膜上皮细胞的电阻抗, 进而改变其完整性, 从而导致上皮细胞膜

破坏,毒素B可进入肠上皮细胞,然而长期没有发现人类毒素B的受体^[9].故上世纪90年代初以前一直认为毒素B仅在毒素A损伤肠黏膜细胞基础上而致病,因此对CDAD的诊断、预防的研究主要是针对*C difficile*毒素A.但近十多年来在一些大的综合性医院出现的爆发性的CDAD流行中,经鉴定发现毒素A阴性而毒素B阳性的*C difficile*造成的,证实以前观点是不正确的^[10-11].近年研究发现,人肠黏膜细胞表面上,葡萄糖基变位受体是毒素B的受体,并据此假设毒素B无须毒素A先致人上皮细胞膜损害,即可进入细胞,并引起肠局限性炎症,致中性粒细胞聚集以及从中性粒细胞、巨噬细胞释放炎症递质^[12-13].分子生物学研究表明,毒素B的氨基酸序列有3个显著结构:(1)位于毒素中央由疏水氨基酸组成并且具有高度保守性的序列,起跨膜、转运的作用.(2)位于C端的重复序列,起结合膜受体作用.(3)N端序列为毒素酶的作用及毒性作用区^[14].Fred *et al*分别克隆并在大肠杆菌内表达了毒素B基因的3个氨基酸片段aa1-900, aa901-1750, aa1751-2366,发现毒素B酶活性作用和细胞毒性作用位于N'端.Genth *et al*^[6]通过将毒素B分成3个片段CDB1、CDB2、CDB3,发现抗毒素B抗体与CDB3可以发生强烈反应,而与CDB1反应微弱,抗*C difficile*抗体既与CDB1又能与CDB3反应,CDB2则与两抗体均不反应,说明CDB3是良好的抗原.进一步实验发现,只有抗受体结合区域的抗体(抗CDB3抗体)才能保护完整细胞免受毒素B的细胞毒性攻击,而抗接触反应区的抗体(抗CDB1抗体)只有进入细胞内才能起保护作用.现有的研究表明,*C difficile* Toxin B3是一种理想的疫苗候选抗原.

目前,在*C difficile*感染的诊断中,传统实验室诊断的方法有细菌培养和组织培养检测毒素.细菌培养敏感,但时间长,缺乏特异性.组织培养敏感、特异性都很高,但是受设备与技术水平的限制.而酶联免疫检测法则是缺乏组织培养条件的实验室首选方法,可以与组织培养相媲美.其优点是灵敏度和特异度高,并且几乎接近组织培养,快速、准确^[15].*C difficile*抗毒素B抗体与CDB3可以发生强烈反应,故本研究为*C difficile*感染诊断抗原的研究也奠定了一定的基础.

我们参考*C difficile*国际标准株VPI 10463基因序列,用自行设计的CDB3引物在PCR反应中表现出较高的特异性,为理想的引物序列.在上、下游引物中分别加入EcoRI与XhoI酶切位点,保证了读码方向的正确性.为便于下一步的表达和纯化工作又将其装入了末端带

有His标签的融合表达载体,酶切鉴定和测序结果显示获得了带有特异的*C difficile* CDB3基因.蛋白电泳分析表明获得了高效表达的*C difficile* ToxinB3克隆株,ToxinB3重组蛋白占菌体总蛋白的34%,定位分析显示分泌表达占周质总蛋白的22.7%,可溶性表达占上清的14%,包涵体占沉淀的82.7%,为进一步研究*C difficile*相关性疾病的诊断和免疫保护作用奠定了重要的实验基础.

4 参考文献

- 1 Bartlett J G. Clinical practice Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002;346:334-339
- 2 Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. Clostridium difficile colitis. *N Engl J Med* 1994;330:257-262
- 3 齐锡位,刘世琴,许晓.抗生素相关性腹泻患者艰难梭菌的鉴定和敏感药物治疗.第一军医大学分校学报 2002;25:88
- 4 Kink JA, Williams JA. Antibodies to recombinant Clostridium difficile toxin A and B are an effective treatment and prevent relapse of *C. difficile* associated disease in a hamster model of infection. *Infect Immun* 1998;66:2018-2025
- 5 Ward SJ, Douce G, Figueiredo D, Dougan G, Wren BW. Immunogenicity of a salmonella typhimurium aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of Clostridium difficile toxin A. *Infect Immun* 1999;67:2145-2152
- 6 Genth H, Selzer J, Busch C, Dumbach J, Hofmann F, Aktories K, Just I. New Method to generate enzymatically deficient clostridium difficile toxin B as an antigen for immunization. *Infect Immun* 2000;68:1094-1101
- 7 杨晓强,姜泊,孙勇,王继德.艰难梭菌毒素基因3'末端重复区域基因片段的PCR克隆.第一军医大学学报 2002;22:791-793
- 8 von Eichel-Streiber C, Laufenberg-Feldmann R, Saringen S, Schulze J, Sauerborn M. Comparative sequence analysis of the clostridium difficile toxins A and B. *MolGen Genet* 1992;233:260-268
- 9 Neunlist M, Barouk J, Michel K, Just I, Oreshkova T, Schemann M, Galmiche JP. Toxin B of Clostridium difficile activates human VIP submucosal neurons, in part via an IL-1beta-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1049-1055
- 10 Moncrief JS, Zheng L, Neville LM, Lysterly DM. Genetic characterization of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:3072-3075
- 11 Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, Fritzsche TR. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A (-) B (+) strain of Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 2000;38:1696-1697
- 12 Mitty RD, LaMont JT. Clostridium difficile diarrhea: pathogenesis, epidemiology and treatment. *Gastroenterologist* 1994;2:61-69
- 13 Miller PD, Pothoulakis C, Baeker TR, LaMont JT, Rothstein TL. Macrophage-dependent stimulation of T cell depleted spleen cells by Clostridium difficile toxin A and calcium ionophore. *Cell Immunol* 1990;126:155-163
- 14 Hofmann F, Busch C, Prepens U, Just I, Aktories K. Localization of the Glucosyltransferase activity of Clostridium difficile Toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J Biol Chem* 1997;272:11074-11078
- 15 Wilkins TD, Lysterly DM. Clostridium difficile testing: after 20 years, still challenging. *J Clin Microbiol* 2003;41:531-534

消癥方对体外 CCl₄ 损伤大鼠原代肝细胞保护作用的研究

吴亚云, 程明亮, 李宏, 陆彤, 耿晓霞

吴亚云, 程明亮, 李宏, 陆彤, 耿晓霞, 贵阳医学院附属医院感染科
贵州省贵阳市 550004
贵州省自然科学基金资助项目, No. E-199
通讯作者: 吴亚云, 550004, 贵州省贵阳市云岩区贵医街 28 号, 贵阳医学院
附属医院感染科. qywuyy@21cn.com
收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-22

摘要

目的: 探讨消癥方抗肝纤维化作用的机理.

方法: 采用 IV 型胶原酶消化及 Ficoll 密度梯度离心的方法, 分离、培养大鼠肝细胞, 先加入 5%、10%、20% 药物血清干预体外培养的肝细胞 24 h, 再用四氯化碳(CCl₄)熏蒸法制造肝细胞损伤模型. 分别用 MTT 法及荧光实时定量 RT-PCR 法检测 CCl₄ 损伤后肝细胞的增殖、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)mRNA 表达, 并检测细胞培养上清中的谷草转氨酶(AST)活性.

结果: 消癥方药物血清能显著地促进 CCl₄ 损伤后肝细胞的增殖($P<0.05$, $P<0.01$). CCl₄ 损伤模型肝细胞内有一定量的 caspase-3mRNA 表达(6.96 ± 0.69 ng), 加 5%、10%、20% 正常大鼠血清干预后, 肝细胞 caspase-3mRNA 的表达(6.31 ± 0.64 , 6.01 ± 0.68 , 5.54 ± 0.58 ng)稍低于 CCl₄ 损伤模型, 加 5%、10%、20% 消癥方药物血清干预后, 肝细胞 caspase-3mRNA 的表达(5.51 ± 0.72 , 4.87 ± 0.45 , 3.08 ± 0.82 ng)显著下调($P<0.05$, $P<0.01$). CCl₄ 损伤模型肝细胞培养上清中 AST 活性为 1203.91 ± 86.85 nkat, 加 5%、10%、20% 正常大鼠血清干预后, 其培养上清中 AST 活性降低为 1092.39 ± 57.01 , 1025.54 ± 29.17 , 996.03 ± 53.68 nkat, 加 5%、10%、20% 消癥方药物血清干预后, 其培养上清中 AST 活性(998.70 ± 30.67 , 885.51 ± 44.82 , 753.48 ± 35.17 nkat)显著降低($P<0.05$, $P<0.01$). 消癥方药物血清对 CCl₄ 损伤后肝细胞增殖的影响、下调肝细胞 caspase-3mRNA 的表达及降低肝细胞培养上清中 AST 活性的作用, 均呈明显的血清浓度依赖关系.

结论: 消癥方抗肝纤维化机理与其保护肝细胞免受损害、抑制肝细胞凋亡有关.

吴亚云, 程明亮, 李宏, 陆彤, 耿晓霞. 消癥方对体外 CCl₄ 损伤大鼠原代肝细胞保护作用的研究. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1139-1141
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1139.asp>

0 引言

肝细胞凋亡与肝细胞坏死是肝纤维化发生发展的始动因素^[1]. 保护肝细胞、防止其变性、坏死, 促进肝细胞功能恢复, 在慢性肝病的治疗中具有重要意义. 消癥方由半枝莲、白花蛇舌草、断肠草等组成, 是贵州省施秉苗族同胞用于外敷治疗癥瘕痞痞的偏方, 鉴于中医异病同

治理论^[2], 我们已通过动物实验证明消癥方具有预防肝纤维化作用^[3], 但具体作用机理尚未完全清楚. 本实验通过观察消癥方药物血清对 CCl₄ 损伤后肝细胞的增殖、caspase-3mRNA 表达及培养上清中 AST 活性的影响, 旨在探讨消癥方抗肝纤维化作用机理.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 雄性大鼠, 体重 200-350 g, 由贵阳医学院动物实验中心提供.

1.1.2 主要试剂 消癥方为细粉末状, 由贵州省施秉县苗族老人田兴兰提供, 用前用自来水配成所需浓度, 煮沸备用. IV 型胶原酶、RPMI-1640 培养基干粉、MTT (Sigma 公司); 小牛血清 (杭州四季青公司); 淋巴细胞分离液 (Ficoll) (上海华精生物公司); 培养板 (Nunc 公司); 促肝细胞生长素 (广东阳江制药厂); 糖原染色试剂盒 (上海红桥医用试剂实验研究所). 10 × PCR Buffer II、10 mmol/L dNTP、50 μmol/L OligodT、20 U/μL RNase Inhibitor、50 U/μL MuL v (RNA 反转录酶)、SYBR green DNAPCR 试剂盒、caspase-3 及内参照 β-action 引物均由美国国立卫生研究院癌症/环境卫生研究所刘杰博士惠赠. 引物序列如下: caspase-3 正向引物: 5' -TGCGCCATGCTGAACTG-3'; 反向引物: 5' -TGGCCACCTTCCGGTTAAC-3'; β-action 正向引物: 5' -TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCT-3'; 反向引物: 5' -GCTCAGTAACAGTCCGCTAGA-3'.

1.1.3 仪器 二氧化碳孵箱 (MC0175, SANYO), 紫外分光光度计、2400 型 PCR 仪、定量 PCR 仪、酶标仪, Beckman 全自动生化分析仪.

1.2 方法

1.2.1 消癥方药物血清的制备 10 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、消癥方给药组, 每组 5 只. 给药组按 5 g/(kg·d) 予消癥方灌胃, 正常组按 5 g/(kg·d) 灌予生理盐水, bid × 3 d, 末次给药后 2 h 再重复灌胃 1 次, 1 h 后颈动脉放血, 收集血液, 1 500 r/min 离心 15 min, 混匀同组大鼠血清, 56℃ 水浴 30 min 灭活补体, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装, -80℃ 保存备用.

1.2.2 肝细胞的分离与鉴定 用 1% 巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 同时腹腔注射 5 000 U 肝素钠抗凝. 麻醉生效后, 用碘酒、酒精消毒, 打开腹腔, 用静脉输液管行门静脉插管, 灌入 D-Hank's 液 (15 mL/min), 同时剪断下腔静脉放血. 灌注至肝完全变为土黄色后, 小心分离肝脏, 移于平皿中用 0.5 g/L IV 型胶原酶继续循环灌

注, 至肝脏表面出现细小的液泡时剥去包膜, 小心取下肝脏, 剪碎. 吸肝组织悬液于100 mL三角烧瓶中37℃水浴箱中震荡消化20 min, 200目钢网过滤. 滤液500 r/min离心1-2 min, 洗涤3-4次, 5 mL沉淀物重悬于4倍体积的49.2% (V/V) Ficol1液上部, 进行梯度离心500 r/min × 5 min. 吸弃上清, 用RPMI-1640液沉洗2-3次, 沉淀细胞悬浮于RPMI-1640培养液中. 新分离的肝细胞用4 g/L台盼蓝溶液染色, 鉴定细胞活力并计算细胞数. 点涂片, 片干后用70 mL/L酒精固定约15 min, 行糖原染色(PAS染色)鉴定细胞的纯度^[4]. 阳性细胞于细胞质中见密集粉红色糖原颗粒, 胞核呈空泡状. 将原代肝细胞用含100 mL/L小牛血清、胰岛素5 mg/L、促肝细胞生长素20 mg/L、氢化可的松 10^{-6} mol/L、L-谷氨酰胺30 g/L、Hepes 50 mmol/L、青霉素 1×10^5 U/L、链霉素100 mg/L的1640培养液配成 2.5×10^8 /L浓度.

1.2.3 CCl₄熏蒸法制备肝细胞损伤模型^[5] 将浓度为 2.5×10^8 /L的原代肝细胞以按 1×10^5 /cm²种于96孔及24孔培养板中. 37℃、50 mL/L CO₂孵育箱中预培养24 h后, 更换新鲜培养液, 加入不同浓度的正常大鼠血清和消癥方药物血清(每组设5复孔), 继续培养15 h. 将培养板置于含0.4 mL/L浓度CCl₄的密闭盒内, 37℃下作用60 min后, 移出密闭盒常规培养36 h.

1.2.4 MTT比色法测定肝细胞的增殖 上述96孔培养板每孔加入5 g/L的MTT液20 μL. 继续孵育4 h, 每孔加入DMSO 200 μL, 稍振荡后, 用酶标仪于波长620 nm测其吸光度(A值). A值越高, 说明HSC的增殖越强.

1.2.5 肝细胞内caspase-3 mRNA表达的检测 吸弃上述24孔培养板培养上清, 每孔加入TRIzol 1 mL, 反复吹洗, 收集细胞悬液, 然后按以下步骤检测caspase-3 mRNA表达情况: (1) 提取、纯化各组HSC的总RNA: 按TRIzol Reagent说明书进行, 用紫外分光光度计检测总RNA纯度(RNA样品 $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$), 再计算其浓度. (2) 反转录合成cDNA: 100 μL的反应体系中, 25 mmol/L MgCl₂ 22 μL, $10 \times$ PCR Buffer II 10 μL, 10 mmol/L dNTP 20 μL, 50 μmol/L OligodT 5 μL, 2×10^7 U/L RNase

抑制剂2 μL, 5×10^7 U/L MuL_v(RNA反转录酶) 2.5 μL, 最后补RNase-free H₂O至100 μL. 于PCR仪上反转录合成cDNA, 反应条件: 25℃ 10 min → 48℃ 60 min → 95℃ 5 min → 4℃保存. (3) 荧光实时定量PCR: 25 μL的反应体系中, $2 \times$ Buffer 12.5 μL, 正向引物(100 μmol/L) 0.5 μL, 反向引物(100 μmol/L) 0.5 μL, RNase-free H₂O 6.5 μL, 样本cDNA 5 μL. 于定量PCR仪上进行PCR反应, 条件如下: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min(1个循环) → 95℃ 15 s, 60℃ 1 min(40个循环). 反应结束后分析PCR过程中各样本Ct值, 绘制标准曲线, 以β-action为内参照, 参考文献[6]计算出各组mRNA含量(ng).

1.2.6 肝细胞培养上清AST的检测 收集上述24孔培养板培养上清, 经1 500 r/min离心3 min后, 用Beakman全自动生化分析仪测定AST.

统计学处理 计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示, 采用t检验.

2 结果

2.1 大鼠肝细胞产率、活力及纯度 采用Ficol1梯度离心平均每只大鼠获取 2.3×10^8 个肝细胞, 台盼蓝溶液染色鉴定细胞活力达90%以上, 糖原染色纯度高达98%以上.

2.2 消癥方对CCl₄损伤肝细胞增殖的影响 正常大鼠血清及消癥方药物血清对CCl₄损伤后肝细胞的增殖均有促进作用, 随浓度增高, 增殖逐渐增强, 呈浓度依赖关系; 与相同浓度的正常大鼠血清比较, 消癥方药物血清促肝细胞增殖作用更明显(表1).

2.3 消癥方对CCl₄损伤肝细胞内caspase-3 mRNA的影响 CCl₄损伤模型组有一定量的caspase-3 mRNA表达. 正常大鼠血清及消癥方药物血清均能显著下调肝细胞内caspase-3 mRNA的表达, 与同浓度的正常大鼠血清比较, 消癥方药物血清的作用更明显, 尤以20%浓度最显著(表1).

2.4 消癥方对CCl₄损伤肝细胞培养上清AST的影响 CCl₄损伤肝细胞模型培养上清的AST活性明显增高. 采用正常大鼠血清及消癥方药物血清干预的CCl₄损伤肝细胞培养上清的AST活性均较CCl₄损伤模型组明显降低, 与同浓

表1 不同浓度血清对CCl₄损伤后肝细胞增殖、caspase-3 mRNA表达及AST的影响(mean ± SD, n = 5)

组别	浓度(%)	吸光度(A值)	caspase-3 mRNA(ng)	AST(nkat/L)
CCl ₄ 损伤模型组	—	0.26 ± 0.03	6.96 ± 0.69	1 203.91 ± 86.85
正常大鼠血清组	5	0.28 ± 0.04	6.31 ± 0.64	1 092.39 ± 57.01
	10	0.31 ± 0.03	6.01 ± 0.68	1 025.54 ± 29.17
	20	0.32 ± 0.02 ^a	5.54 ± 0.58 ^a	996.03 ± 53.68 ^a
消癥方药物血清组	5	0.29 ± 0.03	5.51 ± 0.72 ^a	998.70 ± 30.67 ^{ad}
	10	0.38 ± 0.04 ^{be}	4.87 ± 0.45 ^{be}	885.51 ± 44.82 ^{bf}
	20	0.41 ± 0.02 ^{de}	3.08 ± 0.82 ^{bf}	753.48 ± 35.17 ^{df}

^aP<0.05, t = 3.25-4.55; ^bP<0.01, t = 5.45-8.12; ^cP<0.01, t = 9.38和10.76 vs CCl₄损伤模型组; ^dP<0.05, t = 3.12-3.23; ^eP<0.01, t = 5.87-8.46 vs 同浓度正常大鼠血清.

度的正常大鼠血清比较, 消癥方药物血清的作用更明显, 亦呈浓度依赖关系(表1)。

3 讨论

培养体系中的肝细胞可以很好地模拟体内肝脏生理环境, 可作为研究肝特异代谢过程和肝脏功能的重要工具^[7]。我们采用二步灌流联合Ficoll密度梯度离心方法分离肝细胞, 其纯度高达98%以上, 细胞活力达90%以上。CCl₄为不溶于水的无色液体, 是经典的亲肝毒物。利用其极易挥发的特点而设计的CCl₄熏蒸法制造肝细胞损伤模型, 方法简单易行, 成功率高^[5]。

我们通过用MTT法对消癥方药物血清干预的体外培养CCl₄损伤后大鼠肝细胞的增殖进行测定, 结果显示: 消癥方药物血清较正常大鼠血清显著地能促进肝细胞的增殖, 随血清浓度增高, 对肝细胞增殖的促进作用增强, 呈浓度依赖关系, 说明消癥方具有促进肝细胞再生作用, 有助于肝损伤时肝细胞的修复。在凋亡过程中的caspase联级反应中, caspase-3是主要的效应性caspase, 是细胞凋亡中公共的下游效应因子, 即凋亡下游的关键执行者, 在细胞凋亡中扮演重要角色。激活的caspase-3可进一步切割各种蛋白底物蛋白使细胞最终走向死亡^[8-9], 因此, 检测细胞内caspase-3的变化可作为判断细胞凋亡干预措施是否有效的可靠指标。caspase-3mRNA的表达与细胞凋亡呈正相关, caspase-3的定量检测还可克服形态学方法不能精确定量、亦不能很好地区别细胞的凋亡和坏死, 具有一定的假阳性等的不足^[10]。我们的结果表明: 随血清浓度增高, 消癥方药物血清较正常大鼠血清能显著下调肝细胞caspase-3mRNA的表达, 影响了蛋白酶的切割过程, 进而防止肝细胞凋亡和坏死的发生。细胞凋亡过程中的caspase激活涉及到两条途径, 即细胞表面死亡受体途径及线粒体途径, 有关消癥方是如何调控肝细胞信号

转导, 还有待进一步研究。

转氨酶活性是肝细胞损伤的敏感指标。肝细胞损伤时, 其细胞膜通透性发生改变, AST从肝细胞内泄漏至培养基中, 其活性的高低与肝实质细胞受损的程度一致。我们的结果显示: 随消癥方药物血清浓度增高, 肝细胞培养上清的AST下降, 提示消癥方具有防止肝细胞炎症、坏死及抗肝细胞损伤作用, 与整体动物实验结果吻合^[3]。总之, 我们从细胞水平证明消癥方具有保护肝细胞、防止其凋亡、变性和坏死作用, 阐明消癥方抗肝纤维化作用是通过减少引起肝纤维化的始动刺激因素而发挥的。

致谢: 本实验细胞培养部分在贵阳医学院免疫与干细胞中心完成, 得到左丽教授、舒利平讲师、赵星助教等同志的大力帮助, 在此一并致谢!

4 参考文献

- 1 Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;39:273-278
- 2 张东伟, 牛建昭, 陈家旭, 王冠一. 异病同治理论在中医研究中的应用的思考. *世界科学技术—中医药现代化* 2002;5:16-21
- 3 吴亚云, 姚玉梅, 熊涛, 刘琴, 邓开盛, 程明亮. 苗族草药“消疤草”预防猪血清免疫性肝纤维化的实验研究. 第十三次全国中西医结合肝病学术会议会编 2003:276-278
- 4 谢华福, 甘淋, 李娟, 刘小燕, 宋杰, 李洪. 一种简单的肝细胞分离、培养和鉴定方法. *泸州医学院学报* 2003;26:306-307
- 5 孙燕荣, 董俊兴, 吕秋军, 吴曙光. 二咖啡酰奎宁酸对大鼠肝原代细胞保护作用的研究. *解放军药学报* 2004;20:80-84
- 6 Liu WH, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 2002;302:52-59
- 7 张莉萍, 康格非. 原代肝细胞培养的研究现状. *国外医学临床生物化学与检验学分册* 2004;25:193-196
- 8 Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000;108:567-574
- 9 张晓田. Caspase-3与细胞凋亡的研究. *医学综述* 2002;8:621-623
- 10 张勇, 沈佰华, 余奇文, 马安伦, 李宁丽, 张冬青. 用荧光定量检测caspase-3的活性. *细胞与分子免疫学杂志* 2001;17:188-190

编辑 张海宁

三氧化二砷对肝癌诱导血管内皮细胞相关基因蛋白表达的影响

崔永安, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 左小东

崔永安, 左小东, 扬州大学临床医学院肿瘤诊疗中心

江苏省扬州市 225001

秦叔逵, 陈惠英, 南京八一医院全军肿瘤中心 江苏省南京市 210002

王锦鸿, 南京中医药大学文献研究所 江苏省南京市 210029

全军“十·五”攻关课题 No. MB2001; 江苏省科技厅资助项目, No. BQ98048; 南京军区重点课题, No. NJ9804

通讯作者: 秦叔逵, 210002, 江苏省南京市杨公井34标34号, 南京八一医院全军肿瘤中心. qinsk@cscso.org.cn

电话: 025-84453932

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-22

摘要

目的: 研究三氧化二砷(As_2O_3)注射液对肝癌诱导血管内皮细胞相关基因蛋白表达的影响。

方法: 构建了人肝癌 SMMC-7721 细胞株诱导人脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖的实验模型, 应用免疫组织化学方法, 严密观察了 As_2O_3 注射液对 SMMC-7721 细胞、ECV304 细胞及 SMMC-7721 细胞条件培养液培养的 ECV304 细胞, 有关基因蛋白表达的影响。

结果: 2 mg/L 的 As_2O_3 注射液, 对 SMMC-7721 细胞、ECV304 细胞及 SMMC-7721 细胞条件培养液培养的 ECV304 细胞表达肿瘤相关基因蛋白, 均有一定的调节作用; 可下调 VEGF、整合素 $\beta 1$ 和 EGFR 的表达; 上调 E-钙粘蛋白的表达。

结论: As_2O_3 注射液抗原发性肝癌及防治肝癌复发和转移的作用机制, 可能与其能调节肝癌细胞及血管内皮细胞 VEGF、整合素 $\beta 1$ 、E-钙粘蛋白和 EGFR 等基因蛋白的表达, 干预细胞的信号转导, 抑制肿瘤血管形成有关。

崔永安, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 左小东. 三氧化二砷对肝癌诱导血管内皮细胞相关基因蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1142-1144
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1142.asp>

0 引言

正常细胞转化成为恶性肿瘤细胞的过程复杂而漫长, 从分子生物学角度来看, 这是细胞分子生物学调控机制从量变到质变, 长期积累的后果. 原癌基因的激活, 癌基因的异常表达, 抗癌基因和肿瘤转移相关基因的激活与表达, 都与肿瘤的形成、转移及耐药性关系至为密切. 肿瘤相关基因的研究, 在肿瘤形成机制和探讨抗肿瘤新的治疗方法中均有十分重要的意义. 我们主要探讨了 As_2O_3 注射液对人肝癌 SMMC-7721 细胞、血管内皮细胞 ECV304 及 SMMC-7721 细胞条件培养液培养的 ECV304 细胞血管内皮生长因子(VEGF)、整合素 $\beta 1$ (CD29)、E-钙粘蛋白(E-CD)、表皮生长因子受体(EGFR)等有关

基因蛋白表达的影响, 以期从细胞分子生物学角度进一步揭示 As_2O_3 抗肿瘤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人类肝癌细胞株 SMMC-7721 和建株人脐静脉内皮细胞(ECV304), 均引自中国科学院上海细胞生物研究所. 亚砷酸注射液(As_2O_3 注射液), 哈尔滨伊达药业有限公司产品, 批号为 20010703, 规格 10 mL:10 mg. 使用前用 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养^[1] SMMC-7721 细胞和 ECV304 细胞接种于无菌培养瓶中, 加入适量 RPMI-1640 培养液, 于 37℃、50 mL/L CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养. 每 3-5 d 传代 1 次. 肝癌细胞条件培养液培养 ECV304 细胞, 则用预先制备的肝癌细胞条件培养液, 代替普通 RPMI-1640 培养液, 进行细胞培养. 肝癌细胞条件培养液的制备^[2]: 取 SMMC-7721 细胞, 按 2×10^8 /L/孔接种于 6 孔板, 48 h 后, 收集条件培养液, 滤膜过滤后备用。

1.2.2 免疫组化检测 按免疫组化超敏试剂盒(SP)说明书的步骤, 参照方福德 *et al*^[3] 介绍的方法操作. 分别收集与 As_2O_3 (终浓度为 2 mg/L) 共孵育 48 h 的 SMMC-7721 细胞、ECV304 细胞及 SMMC-7721 细胞条件培养液培养的 ECV304 细胞, 涂片, 风干, 4℃ 纯丙酮固定, 晾干. 每张涂片加 50 μ L 过氧化酶溶液以阻断内源性过氧化酶的活性, 室温下孵育 10 min, PBS (pH7.4) 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张涂片加 50 μ L 的非免疫性动物血清, 室温下孵育 10 min; 吸去多余的液体, 每张涂片加 50 μ L 的一抗(VEGF、整合素 $\beta 1$ 、E-钙粘蛋白及 EGFR), 室温下孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张涂片加 50 μ L 生物素标记的二抗, 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张涂片加 50 μ L 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液, 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张涂片加 100 μ L 新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察 3-10 min, 自来水冲洗, 苏木素复染, PBS 冲洗返蓝, 中性树胶封固, 镜检. 采用已知阳性切片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.3 免疫组化染色阳性判断 以胞质和/或胞膜呈棕黄色为阳性细胞, 油镜下观察 200 个细胞, 计算阳性细胞百分率. 阳性率 <5% 为 (-); 5-25% 为 (+); 26-50% 为 (2+); >50% 为 (3+).

统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件进行 *t* 检验和 Spearman 秩相关检验统计分析。

2 结果

2.1 As₂O₃对ECV304细胞相关基因蛋白表达的影响(表1) ECV304细胞未加药组, VEGF基因表达强(3+), CD29基因表达强(3+), E-CD基因表达弱(+), EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后, VEGF表达受到明显抑制(-), CD29表达明显被抑制(-), E-CD表达增强(3+), EGFR表达明显抑制(-).

表1 三氧化二砷对ECV304细胞肿瘤相关基因表达的影响(mean ± SD, n = 6)

	VEGF	EGFR	CD-29	E-CD
对照组	123.17 ± 23.67	126.67 ± 16.82	102.67 ± 25.90	13.33 ± 5.501
用药组	9.5 ± 5.4	9.5 ± 5.89	9 ± 6.19	103 ± 18.58
<i>t</i>	11.466	16.10	8.614	11.335
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 As₂O₃对SMMC-7721细胞相关基因蛋白表达的影响(表2) SMMC-7721细胞未加药组, VEGF基因表达较强(2+), CD29基因表达强(3+), E-CD基因表达弱(+), EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后, VEGF表达受到抑制(+), CD29表达明显被抑制(+), E-CD表达明显增强(3+), EGFR表达明显抑制(+).

表2 三氧化二砷对SMMC-7721细胞肿瘤相关基因表达的影响(mean ± SD, n = 6)

	VEGF	EGFR	CD-29	E-CD
对照组	75.83 ± 27.61	106 ± 27.80	108.67 ± 33.74	15 ± 8.56
用药组	10.83 ± 6.15	19.33 ± 14.83	14.5 ± 8.85	107.5 ± 21.51
<i>t</i>	5.629	6.738	6.613	9.788
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 As₂O₃对肝癌细胞条件液培养的ECV304细胞相关基因蛋白表达的影响(表3) SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组, VEGF基因表达强(3+), CD29基因表达强(2+), E-CD基因表达弱(+), EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后, VEGF表达受到抑制(+), CD29表达明显抑制(-), E-CD表达增强(2+), EGFR表达明显抑制(-).

表3 三氧化二砷对肝癌细胞条件液培养的ECV304细胞肿瘤相关基因表达的影响(mean ± SD, n = 6)

	VEGF	EGFR	CD-29	E-CD
对照组	131.67 ± 25.16	142.83 ± 15.13	99.83 ± 21.78	17.33 ± 9.87
用药组	21.83 ± 7.63	9.33 ± 4.18	9.67 ± 5.89	98.67 ± 18.86
<i>t</i>	10.233	20.831	9.787	9.357
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

从肿瘤相关基因着手来系统地研究肿瘤的形成、转移和

复发过程,是目前国内、外肿瘤学研究的热点课题.肿瘤相关基因的种类多种多样,按其功能可分为生长因子、生长因子受体、具有催化活性的信号转导蛋白、不具备催化活性的信号转导蛋白、核转录因子等.因此,肿瘤相关基因的生物学功能也是多种多样的.对肿瘤相关基因的研究,有助于了解肿瘤形成的过程.从肿瘤本身的细胞总数来看,肿瘤细胞总数在生长阶段是不断增加的.从细胞凋亡角度来看,肿瘤细胞的细胞凋亡倾向降低.无论是细胞生长过度,还是细胞凋亡倾向降低,其最终的结果是肿瘤本身的细胞总数增加,肿瘤体积不断增大.而无论是肿瘤的增殖还是凋亡,从分子生物学角度来看,都是由于基因的表达与调控,即肿瘤相关基因的表达与调控所决定的.因此,肿瘤相关基因的研究,对于了解肿瘤的增殖和凋亡过程,探索肿瘤转移的机制,研究新型的肿瘤标志物,促进肿瘤特异性诊断技术的开发和应用,以及开拓肿瘤的生物治疗学方法,都有十分重要的意义.

以往的研究表明,As₂O₃可诱导人肝癌细胞凋亡,对肿瘤相关基因具有调节作用.如As₂O₃可上调肝癌细胞凋亡促进基因bax和Fas的表达^[4-8],下调凋亡抑制基因bcl-2的表达^[9].对VEGF、MMP-2、CD44有下调作用,对nm23有上调作用^[10].我们的研究结果进一步表明.

3.1 As₂O₃具有抑制VEGF基因蛋白表达的作用 VEGF及其受体(VEGFR)在肝癌组织中较正常肝组织呈过表达,与肝癌的生长、转移、复发及治疗密切相关^[11-12].我们的实验表明,As₂O₃作用于SMMC-7721细胞、ECV304细胞及SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞后,ECV304细胞未加药组,VEGF基因表达强(3+),经As₂O₃药物作用后,VEGF表达受到明显抑制(-);SMMC-7721细胞未加药组,VEGF基因表达较强(2+),经As₂O₃药物作用后,VEGF表达受到抑制(+);SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组,VEGF基因表达强(3+),经As₂O₃药物作用后,VEGF表达受到抑制(+).说明As₂O₃注射液可通过下调VEGF的表达,影响VEGF的信号通路,来抑制肿瘤血管形成、控制肿瘤细胞的生长.

3.2 As₂O₃可抑制肝癌细胞及血管内皮细胞整合素β1(CD29)的表达 肝癌组织内CD29的表达明显高于非肝癌组织,并且与肝癌的侵袭性和转移有关^[13-15].我们的研究表明,ECV304细胞未加药组,CD29基因表达强(3+),经As₂O₃药物作用后,CD29表达明显被抑制(-);SMMC-7721细胞未加药组,CD29基因表达强(3+),经As₂O₃药物作用后,CD29表达明显被抑制(+);SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组,CD29基因表达强(2+),经As₂O₃药物作用后,CD29表达被抑制(-).说明As₂O₃注射液抗肝癌作用机制之一,可能与下调整合素β1的表达有关,通过影响整合素β1的信号通路,影响整合

素介导的肝癌细胞与肝癌细胞、肝癌细胞与细胞外基质的黏附,影响整合素调控的细胞外基质的降解、肿瘤细胞的运动,及肿瘤血管形成中的某个环节,来控制肿瘤细胞的生长。

3.3 As₂O₃可上调肝癌细胞及血管内皮细胞 E-钙粘蛋白(E-CD)的表达 E-CD在肝癌发生、发展过程中发挥重要作用,肝癌组织中E-CD的表达与癌灶体积有显著的相关性,E-CD蛋白表达的降低是肝癌重要的恶性生物学指标,对了解和判断肝癌的恶性程度及患者的预后具有重要意义^[16-17]。本研究表明,ECV304细胞未加药组,E-CD基因表达弱(+),经As₂O₃药物作用后,E-CD表达明显增强(3+);SMMC-7721细胞未加药组,E-CD基因表达弱(+),经As₂O₃药物作用后,E-CD表达明显增强(3+);SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组,E-CD基因表达弱(+),经As₂O₃药物作用后,E-CD表达有所增强(2+)。说明As₂O₃注射液抗肝癌作用机制之一,可能与提高E-CD蛋白表达有关,通过影响E-CD的信号通路,影响E-CD介导的肝癌细胞与肝癌细胞、肝癌细胞与细胞外基质的黏附,影响E-CD调控的细胞外基质的降解、肿瘤细胞的运动,及肿瘤血管形成中的某个环节有关。

3.4 As₂O₃对肝癌细胞EGFR表达具有抑制作用 EGFR在人肝癌的发生、发展中发挥一定的作用^[18]。As₂O₃作用SMMC-7721细胞、ECV304细胞及SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞后,ECV304细胞未加药组,EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后,EGFR表达明显抑制(-);SMMC-7721细胞未加药组,EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后,EGFR表达明显抑制(+);SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组,EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后,EGFR表达明显抑制(-)。说明As₂O₃注射液可通过下调肝癌细胞EGFR蛋白的表达,影响EGFR所介导的信号转导通路,从而抑制了肿瘤细胞的增殖和迁移,抑制了肿瘤新生血管形成,达到治疗肿瘤、防治肿瘤转移和复发的目的。

由于EGFR及其配体与E-CD、整合素等因子表达具有相关性,其中某一因子发生表达改变,或相互作用共同改变,均可对肿瘤的发生、发展及转移产生重要影响。

我们的研究表明,As₂O₃注射液对这些因子的表达均有一定调节作用,但其间的相互关系如何,尚有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 鄂征. 组织培养技术及其在医学研究中的应用. 第1版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004:125
- 2 王兵, 王杰军, 徐钧, 许青, 高勇, 郭静. 人参皂苷R_{g3}对胃癌诱导血管内皮细胞增殖的抑制作用. 肿瘤防治杂志 2001;8:234-236
- 3 方福德, 周吕, 丁灏, 张德昌. 现代医学实验技巧全书(上、下册). 第1版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995:165
- 4 秦叔逵, 陈洪, 陈惠英, 马军, 潘其声, 刘文虎. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞株凋亡的初步研究. 临床肿瘤学杂志 1998;3:40
- 5 刘琳, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英, 陈洪, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷对人肝癌细胞增殖和超微结构的影响. 肿瘤防治研究 2001;28:426-428
- 6 陈洪, 秦叔逵, 潘麒声, 陈惠英, 马军. 三氧化二砷抗肝癌作用的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:27-29
- 7 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 陈洪, 刘文虎, 王锦鸿. 三氧化二砷对人肝癌细胞选择性抑制作用的实验研究. 临床肿瘤学杂志 1999;4:39-41
- 8 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. 世界华人消化杂志 2000;8:532-535
- 9 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 陈洪, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:367-369
- 10 华海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英. 三氧化二砷抗肿瘤血管形成研究. 世界华人消化杂志 2004;12:27-31
- 11 Suzuki H, Seto K, Shinoda Y, Mori M, Ishimura Y, Suematsu M, Ishii H. Paracrine upregulation of VEGF receptor mRNA in endothelial cells by hypoxia-exposed hep G2 cells. *Am J Physiol* 1999;276:G92-97
- 12 邓靖宇, 何生. VEGF在肝癌中作用. 世界华人消化杂志 2004;12:454-458
- 13 郭悦青, 易继林, 闫振宇, 熊荣斌, 叶关泉. 整合素Integrin β1在原发性肝癌组织内的表达及意义. 数理医药学杂志 2004;17:312-315
- 14 王桂兰, 陈莉. 整合素在肝癌研究中的意义. 临床肿瘤学杂志 2004;9:325-340
- 15 Yamamoto H, Itoh F, Adachi Y, Sakamoto H, Adachi M, Hinoda Y, Imai K. Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1997;112:1290-1296
- 16 Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *metastatic potential. Int J Cancer* 1997;74:482-491
- 17 成峰, 王学浩, 钱建民, 张峰, 李相成. E钙粘蛋白、syndecan-1蛋白在肝细胞性肝癌中的表达与肝癌侵袭的关系. 中华普通外科杂志 2003;18:141-142
- 18 Fukusato T, Mori S, Kawamoto T, Taniguchi S, Machinami R. Immunohistochemical and ultrastructural localization of epidermal growth factor receptor in human liver and hepatocellular carcinoma tissues. *Acta Pathol Jpn* 1990;40:22-29

编辑 张海宁

不同红细胞免疫功能状态下的结肠癌肝转移小鼠模型的建立

王 程, 杨运高

王程, 杨运高, 南方医科大学中医系, 广东省广州市 510515
国家自然科学基金资助项目, No. 30070937
通讯作者: 杨运高, 510515, 广东省广州市南方医科大学中医系.
yangyungao@163.net
电话: 020-61648248
收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-04-08

摘要

目的: 建立不同红细胞免疫功能状态下的结肠癌肝转移小鼠模型, 并比较各模型组及对照组间红细胞免疫黏附功能(RBC immune adherence function, RIF).

方法: 将 48 只 BALB/C 小鼠分为 4 组: (1) 正常对照组; (2) 红细胞免疫正常小鼠结肠癌细胞脾移植肝转移组; (3) 红细胞免疫缺陷组; (4) 红细胞免疫缺陷并结肠癌细胞脾移植肝转移组. 观察各组小鼠红细胞 C3b 受体花环率(R-C3bR)、红细胞免疫复合物花环率(R-ICR)、红细胞免疫黏附肿瘤细胞花环率(RITCR)的表达情况.

结果: 各组 R-C3bR、RITCR 与组 1 (分别为 18.50 ± 3.82 , 17.0 ± 3.93 , $P < 0.01$) 比较有显著性差异; 各组 R-C3bR、R-ICR 与组 2 (分别为 13.80 ± 2.44 , 9.20 ± 3.71 , $P < 0.01$) 比较有显著性差异; 组 3 与组 4 比较, 各项指标比较无显著性差异($P > 0.05$).

结论: 给予低硒饲料喂养和接种肿瘤细胞均可造成小鼠 RIF 明显低下, 以前者作用更甚; 在低硒饲养已引起小鼠 RIF 低下的基础上, 再接种肿瘤细胞并不能使其 RIF 的减退继续加重. 各组模型方法稳定可靠, 重复性好, 能满足相关研究的需要.

王程, 杨运高. 不同红细胞免疫功能状态下的结肠癌肝转移小鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1145-1147
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1145.asp>

0 引言

肝脏接受门静脉和肝动脉双重血供, 是恶性肿瘤最常见的转移器官^[1-3], 尤以大肠癌转移多见. 郭峰 *et al*^[4] 的研究表明, 红细胞免疫黏附肿瘤细胞的作用在防止癌细胞血行运转中起着重要的作用, 其主要原理是癌细胞进入血液循环后可旁路激活和黏附 C3b 而被红细胞 CR1 免疫黏附. 缺硒是造成红细胞免疫功能低下的重要原因^[5], 而荷瘤小鼠亦会出现继发性的红细胞免疫功能障碍^[6]. 不同红细胞免疫功能状态下的结肠癌肝转移小鼠模型的建立, 有利于进一步研究红细胞免疫与肿瘤转移的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/C 小鼠纯系健康小鼠 48 只, 清洁级, 已

断奶 1 wk, 雌雄不拘, 小鼠及常规饲料由南方医科大学实验动物中心提供. 低硒饲料: 玉米粉 67.0%、小麦粉 27.5%、黄豆粉 7.5% (以上饲料购自克山病病区), 酵母 0.4%、食盐 0.6%、鱼肝油 2 μ L/kg, 饲料含硒量为 0.02 mg/kg 由广东省畜禽饲料研究实验室用经典方法 2, 3-二氨基萘荧光法测定.

1.2 方法

1.2.1 模型复制及分组 BALB/C 小鼠 48 只分为 4 组, 每组 12 只: (1) 正常对照组; (2) 红细胞免疫正常小鼠结肠癌细胞脾移植肝转移组; (3) 红细胞免疫缺陷组; (4) 红细胞免疫缺陷并结肠癌细胞脾移植肝转移组. 红细胞免疫缺陷模型建立方法: 已断奶 1 wk BALB/C 小鼠, 以低硒饲料连续饲养 10 wk^[5]. 小鼠结肠癌 CT26 细胞脾移植肝转移模型, 参考文献[7]方法. 动物经腹腔注射 10% (体积比) 的水合氯醛 0.1 mL 左右 (0.1 mL/20 kg) 麻醉成功后, 固定小鼠呈俯卧位, 于背侧中部、左侧腋中线与腋后线间, 取 5 mm 切口进腹, 显露脾脏, 并拉出切口外, 用 4 号针头于脾脏下极进针, 边退边缓慢注入 CT26 细胞 (由上海第二军医大学免疫教研室于益芝教授馈赠) 悬液 0.1 mL, 细胞含量为 1×10^6 /L, 可见注射部位的脾脏被膜变白及肿胀, 拔出针头, 夹住针眼处片刻. 查看无出血, 将脾脏放回原位, 全层缝合腹壁, 包扎. 红细胞免疫缺陷并结肠癌细胞脾移植肝转移模型, 已断奶 1 wk BALB/C 小鼠, 以低硒饲料连续饲养 10 wk 后按以上方法接种肿瘤细胞.

1.2.2 红细胞免疫功能的测定 荷瘤小鼠接种肿瘤细胞后 15 d 处死, 取血液测各项指标: 红细胞 C3b 受体花环率(RBC C3b receptor rosette, R-C3bR)、红细胞免疫复合物花环率(RBC immune complex receptor rosette, R-ICR)、红细胞免疫黏附肿瘤细胞花环率(RBC immune adherence tumor cell receptor rosette, RITCR), 测定方法参照文献[4], 以连接有 2 个以上酵母菌的红细胞为花环形成阳性, 计算红细胞花环率(%). 酵母多糖试剂、癌细胞试剂由第二军医大学长海医院血液免疫研究室提供.

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件对结果进行独立样本 *t* 检验 (independent-samples *t* test), 各组数据均采用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 组间均数比较用单向方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.01$ 为有统计学意义. 并对实验结束前仍存活的 43 只小鼠的 R-C3bR、R-ICR、RITCR 这 3 项指标进行偏相关分析.

2 结果

解剖观察正常对照组、红细胞免疫缺陷组的小鼠肝脏颜

色鲜红、有光泽,表面光滑,质地柔软,体积均一。2个荷瘤模型组小鼠肝脏色泽晦暗,各叶表面及切面均有白色转移瘤结节,呈多发性弥散分布,其大小不一,转移率为100%;各组脾脏有大小相对均一的肿瘤结节形成,直径为0.4-0.9 cm的灰白色结节,其他脏器未见转移灶。剖腹后可见腹腔内均有血性腹水,量不等;肝脏转移瘤数目有个体差异,部分小鼠肝脏明显肿大,转移结节融合成块,难以计数,肝组织严重受破坏,部分组织被转移结节替代,与脾脏上肿瘤结节的形态结构相似。光镜下观察,荷瘤肝组织见癌细胞聚集成团,伴有癌结节形成,符合低分化腺癌的结构特征。

相关性研究将实验结束前仍存活的43只小鼠的R-C3bR、R-ICR、RITCR这3项指标进行偏相关分析,结果显示R-C3bR与R-ICR呈显著性负相关($r = -0.6223$, $P = 0.000$), R-C3bR与RITCR呈显著性正相关($r = 0.6327$, $P = 0.000$), R-ICR与RITCR无明显相关关系。

各组R-C3bR、RITCR与组1比较有显著性差异($P < 0.01$), 各组R-C3bR、R-ICR与组2比较均有显著性差异($P < 0.01$);组3与组4间比较,各项指标无显著性差异($P > 0.05$, 表1)。

表1 各组红细胞免疫功能比较(mean±SD, %)

分组	n	R-C3bR	R-ICR	RITCR
1	12	18.50 ± 3.82	6.83 ± 1.69	17.00 ± 3.93
2	10	13.80 ± 2.44 ^b	9.20 ± 3.71	11.80 ± 3.49 ^b
3	12	8.92 ± 2.91 ^{bd}	13.42 ± 3.09 ^{bd}	9.83 ± 1.70 ^b
4	9	9.33 ± 2.44 ^{bd}	13.22 ± 3.49 ^{bd}	8.11 ± 2.52 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 1组; ^d $P < 0.01$ vs 2组。

3 讨论

肿瘤转移是一个连续过程,癌细胞由运动因子启动,离开原发部位进入血管,重新黏附并穿出血管,在局部形成细胞克隆,继而血管增生,形成转移灶^[8]。我们复制的红细胞免疫缺陷小鼠、红细胞免疫正常及缺陷状况下分别合并结肠癌细胞脾移植肝转移小鼠3种动物模型,并比较各组模型间小鼠红细胞免疫功能。针对大肠癌肝转移率高的特点,我们选用的结肠癌CT-26细胞脾移植肝转移小鼠模型,本法保留脾脏,保存了宿主固有的抗肿瘤免疫功能,较好地模拟了大肠癌根治术后因血行转移而发生肝脏转移的过程。另外,本法操作简便安全,潜伏期短,具有可重复的高转移发生率,具有与患者类似的转移途径,转移细胞保留了原细胞系的生物学特征。

红细胞CR1是一种膜糖蛋白,红细胞C3b/C4b受体,具有清除循环免疫复合物^[9-10]、免疫黏附癌细胞并进一步攻击癌细胞的重要的生物学功能。各模型组小鼠红细胞免疫功能发生紊乱, R-C3bR、R-ICR降低, RITCR

升高。以上3个指标并不保持绝对均衡,可能与肿瘤侵袭过程中,各指标变化不一样有关^[11]。实验结束前组3、组4的2组荷瘤小鼠分别有2只和3只小鼠死亡,其余未接种肿瘤细胞的2组小鼠无1只死亡。红细胞CR1占循环中总CR1的95%以上,所以红细胞CR1分子在抗肿瘤转移方面起着不可忽视的作用,并在一定程度上代表着红细胞免疫功能;其清除免疫复合物的作用比白细胞大500-1000倍^[12]。

硒是构成谷胱甘肽过氧化物和烟酸羟化酶等重要的必需成分,缺硒是造成红细胞免疫功能低下的重要原因。我们发现,低硒饲料饲养组较正常饲料饲养组小鼠RIF明显低下(表1)。在正常情况下,机体免疫功能需要硒的参与和激活,含硒酶谷胱甘肽过氧化物活性升高使红细胞抗氧化能力增强,从而保护细胞膜的完整性。长期给予动物低硒饲料,低硒状态会影响有关酶的合成与活性,加剧机体的过氧化反应,使红细胞及其细胞膜结构和功能损伤^[6],使红细胞免疫黏附功能下降。本研究的组3与组4间各项指标比较 $P > 0.05$,表明在低硒饲养已引起小鼠RIF低下的基础上,再接种肿瘤细胞并不能使其RIF的减退继续加重。可见在肿瘤发生前或肿瘤早期及时纠正由其他原因引起的红细胞免疫低下是非常必要的。模型组与正常对照组比较,小鼠RIF降低,差异有显著性($P < 0.01$),表明缺硒和接种肿瘤细胞均可造成小鼠RIF继发性下降。但其机制不同,肿瘤移植后宿主红细胞免疫功能是随着肿瘤的生长和发展呈进行性降低,在肿瘤侵袭时开始改变,尤其在血道转移时期下降更为显著^[6]。荷瘤情况下多伴有继发性免疫抑制^[13],肿瘤免疫抑制因子的增多,抑制了红细胞的免疫功能。宿主红细胞CR1活性降低导致红细胞对肿瘤细胞的促吞噬作用减弱;随着肿瘤的发展,红细胞表面受体和凝聚性增高,血中补体合成增多和补体系统活化增强,黏附在红细胞膜表面的免疫复合物增多,使R-ICR增高,CR1空位被免疫复合物占据,由于红细胞清除肿瘤免疫复合物功能障碍,补体与红细胞表面受体结合的不易脱位而导致占位性抑制,从而使R-C3bR降低。如此反复恶性循环,造成肿瘤细胞逃避机体免疫系统的攻击得以转移和扩散。这种变化过程与肿瘤转移密切相关。我们利用了该2种诱因分别建立了单独或叠加作用复制了不同红细胞免疫功能状态下的大肠癌肝转移小鼠模型,各组模型方法稳定可靠,重复性好,能满足红细胞免疫及其与肿瘤转移等相关研究的需要。

红细胞免疫与肿瘤转移的关系仍然是一项探索性的工作,许多亟待解决的问题摆在我们面前,如红细胞免疫系统是如何参与抑制肿瘤转移的控制网络,红细胞免疫抑制肿瘤转移功能与机体其他免疫功能的关系,药物调控红细胞免疫功能而达到预防或减少肿瘤转移,都有待进一步探讨。

4 参考文献

1 Figueredo A, Rumble RB, Maroun J, Earle CC, Cummings B,

- McLeod R, Zuraw L, Zwaal C. Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline. *BMC Cancer* 2003;3:26-26
- 2 Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999;230:309-318
- 3 Povoski SP, Fong Y, Sgouros SC, Kemeny NE, Downey RJ, Blumgart LH. Role of chest CT in patients with negative chest X-rays referred for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg Oncol* 1998;5:9-15
- 4 郭峰, 钱宝华, 张乐之. 现代红细胞免疫学. 上海: 第二军医大学出版社, 2002:172-175
- 5 杨运高, 陈先明, 傅江南, 周登峰, 江海燕. 大鼠红细胞免疫功能低下模型的研究. *中国中医基础医学杂志* 2002;8:204-206
- 6 甘润良, 章岳山, 匡希文, 胡平玲. 肿瘤细胞侵袭转移过程中红细胞免疫功能的改变. *中国免疫学杂志* 1997;13:284-285
- 7 许勤, 吴文溪, 马利民, 王学浩. 小鼠结肠腺癌肝转移模型的建立. *实用癌症杂志* 2000;15:456-457
- 8 Mareel M. When and why does cancer metastasize? An overview of current viewpoints of the molecular mechanism of invasiveness. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1994;56:105-125
- 9 Beynon HL, Davies KA, Haskard DO, Walport MJ. Erythrocyte complement receptor type 1 and interactions between immune complexes, neutrophils, and endothelium. *J Immunol* 1994;56:3160-3167
- 10 Miyaike J, Iwasaki Y, Takahashi A, Shimomura H, Taniguchi H, Koide N, Matsuura K, Ogura T, Tobe K, Tsuji T. Regulation of circulating immune complexes by complement receptor type 1 on erythrocytes in chronic viral liver diseases. *Gut* 2002;51:591-596
- 11 王好生, 王留兴, 盖英第, 王苏芝, 付利, 何先全, 匡希文. 肿瘤发生发展过程中红细胞免疫功能的变化. *中国肿瘤临床* 1996;23:353-355
- 12 郭峰. 红细胞免疫研究概况. *中华微生物和免疫学杂志* 1995;15:181-182
- 13 宋京翔, 卿三华, 黄祥成, 齐德林. 精氨酸增强的胃肠外营养对结肠癌患者术后免疫功能的影响. *第一军医大学学报* 2002;22:545-547

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

胰腺癌组织中 PTCHmRNA 的表达及其临床意义

陈志荣, 李兆申, 屠振兴, 高军, 龚燕芳, 金晶, 满晓华

陈志荣, 李兆申, 屠振兴, 高军, 龚燕芳, 金晶, 满晓华, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433

通讯作者: 陈志荣, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科. czr88188@163.com

电话: 021-25070556

收稿日期: 2005-03-07 接受日期: 2005-04-01

摘要

目的: 研究胰腺癌组织 PTCHmRNA 的表达及其与胰腺癌分化程度、大小和浸润转移的关系。

方法: 收集 28 例手术切除的新鲜胰腺癌及癌旁胰腺组织, 利用 RT-PCR 方法分别检测癌组织和癌旁胰腺组织 PTCHmRNA 的表达情况。

结果: 28 例胰腺癌组织中 20 例胰腺癌组织有 PTCH mRNA 表达(阳性率 71.4%); 28 例癌旁胰腺组织中无 PTCHmRNA 的表达; 胰腺癌组织和癌旁组织其 PTCH mRNA 阳性表达率差异有显著性($P < 0.001$); PTCH mRNA 阳性表达率与肿瘤分化程度有关($P = 0.035$), 与肿瘤的大小、淋巴及远处转移无关($P > 0.05$)。

结论: PTCH mRNA 在胰腺癌组织中有较高的阳性表达率, 检测其表达有助于胰腺癌的诊断, 并可作为判断胰腺癌恶性程度的重要指标。

陈志荣, 李兆申, 屠振兴, 高军, 龚燕芳, 金晶, 满晓华. 胰腺癌组织中 PTCHmRNA 的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1147-1150
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1147.asp>

0 引言

胰腺癌是较常见而恶性程度高的消化系肿瘤, 近年来其发生率在国内外呈上升趋势. 胰腺癌的预后较差, 早期诊断困难. 最新研究认为 Hedgehog 信号通路与胰腺癌发生和发展密切相关. PTCH (patched) 是 hedgehog 信号通路中的一个跨膜蛋白质受体. 国外对 PTCH 在胰腺癌的表达情况报道较少, 国内尚未有相关文献报道. 我们检测了胰腺癌组织中 PTCH mRNA 的表达情况, 并和癌旁组织的表达情况比较, 探讨其与胰腺癌临床病理指标的关系, 旨在为胰腺癌的临床诊断、治疗及预后提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本 人新鲜胰腺癌组织和人新鲜癌旁胰腺组织各 28 例均来自第二军医大学附属长海医院胰腺外科 2004-02/2004-10 手术病例, 其中男性 17 例, 女性 11 例, 年龄 42-78 岁, 平均 55 岁. 所有病例均经手术及病理学确

- McLeod R, Zuraw L, Zwaal C. Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline. *BMC Cancer* 2003;3:26-26
- 2 Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999;230:309-318
- 3 Povoski SP, Fong Y, Sgouros SC, Kemeny NE, Downey RJ, Blumgart LH. Role of chest CT in patients with negative chest X-rays referred for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg Oncol* 1998;5:9-15
- 4 郭峰, 钱宝华, 张乐之. 现代红细胞免疫学. 上海: 第二军医大学出版社, 2002:172-175
- 5 杨运高, 陈先明, 傅江南, 周登峰, 江海燕. 大鼠红细胞免疫功能低下模型的研究. *中国中医基础医学杂志* 2002;8:204-206
- 6 甘润良, 章岳山, 匡希文, 胡平玲. 肿瘤细胞侵袭转移过程中红细胞免疫功能的改变. *中国免疫学杂志* 1997;13:284-285
- 7 许勤, 吴文溪, 马利民, 王学浩. 小鼠结肠腺癌肝转移模型的建立. *实用癌症杂志* 2000;15:456-457
- 8 Mareel M. When and why does cancer metastasize? An overview of current viewpoints of the molecular mechanism of invasiveness. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1994;56:105-125
- 9 Beynon HL, Davies KA, Haskard DO, Walport MJ. Erythrocyte complement receptor type 1 and interactions between immune complexes, neutrophils, and endothelium. *J Immunol* 1994;56:3160-3167
- 10 Miyaike J, Iwasaki Y, Takahashi A, Shimomura H, Taniguchi H, Koide N, Matsuura K, Ogura T, Tobe K, Tsuji T. Regulation of circulating immune complexes by complement receptor type 1 on erythrocytes in chronic viral liver diseases. *Gut* 2002;51:591-596
- 11 王好生, 王留兴, 盖英第, 王苏芝, 付利, 何先全, 匡希文. 肿瘤发生发展过程中红细胞免疫功能的变化. *中国肿瘤临床* 1996;23:353-355
- 12 郭峰. 红细胞免疫研究概况. *中华微生物和免疫学杂志* 1995;15:181-182
- 13 宋京翔, 卿三华, 黄祥成, 齐德林. 精氨酸增强的胃肠外营养对结肠癌患者术后免疫功能的影响. *第一军医大学学报* 2002;22:545-547

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

胰腺癌组织中 PTCHmRNA 的表达及其临床意义

陈志荣, 李兆申, 屠振兴, 高军, 龚燕芳, 金晶, 满晓华

陈志荣, 李兆申, 屠振兴, 高军, 龚燕芳, 金晶, 满晓华, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433

通讯作者: 陈志荣, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科. czr88188@163.com

电话: 021-25070556

收稿日期: 2005-03-07 接受日期: 2005-04-01

摘要

目的: 研究胰腺癌组织 PTCHmRNA 的表达及其与胰腺癌分化程度、大小和浸润转移的关系。

方法: 收集 28 例手术切除的新鲜胰腺癌及癌旁胰腺组织, 利用 RT-PCR 方法分别检测癌组织和癌旁胰腺组织 PTCHmRNA 的表达情况。

结果: 28 例胰腺癌组织中 20 例胰腺癌组织有 PTCH mRNA 表达(阳性率 71.4%); 28 例癌旁胰腺组织中无 PTCHmRNA 的表达; 胰腺癌组织和癌旁组织其 PTCH mRNA 阳性表达率差异有显著性($P < 0.001$); PTCH mRNA 阳性表达率与肿瘤分化程度有关($P = 0.035$), 与肿瘤的大小、淋巴及远处转移无关($P > 0.05$)。

结论: PTCH mRNA 在胰腺癌组织中有较高的阳性表达率, 检测其表达有助于胰腺癌的诊断, 并可作为判断胰腺癌恶性程度的重要指标。

陈志荣, 李兆申, 屠振兴, 高军, 龚燕芳, 金晶, 满晓华. 胰腺癌组织中 PTCHmRNA 的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(9):1147-1150
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1147.asp>

0 引言

胰腺癌是较常见而恶性程度高的消化系肿瘤, 近年来其发生率在国内外呈上升趋势. 胰腺癌的预后较差, 早期诊断困难. 最新研究认为 Hedgehog 信号通路与胰腺癌发生和发展密切相关. PTCH (patched) 是 hedgehog 信号通路中的一个跨膜蛋白质受体. 国外对 PTCH 在胰腺癌的表达情况报道较少, 国内尚未有相关文献报道. 我们检测了胰腺癌组织中 PTCH mRNA 的表达情况, 并和癌旁组织的表达情况比较, 探讨其与胰腺癌临床病理指标的关系, 旨在为胰腺癌的临床诊断、治疗及预后提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本 人新鲜胰腺癌组织和人新鲜癌旁胰腺组织各 28 例均来自第二军医大学附属长海医院胰腺外科 2004-02/2004-10 手术病例, 其中男性 17 例, 女性 11 例, 年龄 42-78 岁, 平均 55 岁. 所有病例均经手术及病理学确

诊,均有完整的手术记录资料及临床资料。

1.1.2 试剂及引物 3S Trizol 总 RNA 抽提纯化、RT-PCR 试剂盒和所有引物购自上海生物工程公司。采用 Oligov 6.44 软件设计并结合有关文献确定 PTCH 的引物。上游: 5' -GAATTCGCTTCCCGTGCTTTTGTCTT-3' 下游: 5' -GTCGACCTGCAGCTCAATGACTTC-3', 产物长度 789 bp; 内参照 β -actin: 上游: 5' -CCTAGCACCATGAAGATCAA-3' 下游: 5' -AGCCATGCAAATGTCTCAT-3' 产物长度 250 bp。

1.2 方法 采用 RT-PCR 法检测胰腺癌组织和癌旁胰腺组织 PTCH mRNA 的表达。

1.2.1 胰腺癌和癌旁组织总 RNA 抽提 按照 3S Trizol 总 RNA 抽提纯化试剂盒说明书进行。取冻存的胰腺癌或癌旁胰腺组织 50-100 mg 在液氮中研成粉末加入 Trizol 1 mL 混匀振荡, 冰上置 5 min, 4℃、12 000 g 离心 20 min, 取上清加 550 μ L 氯仿 4℃下 12 000 g 离心 20 min, 取上清加 350 μ L 异戊醇 4℃下 12 000 g 离心 20 min, 弃上清, 加 700 mL/L 乙醇 1 mL, 4℃、12 000 g 离心 20 min, 弃上清, 加入 500 μ L RNW 溶液 12 000 g 室温离心 1 min, 弃上清, 加入 500 μ L RNW 溶液 12 000 g 室温离心 1 min, 弃上清, 1 000 r/min 室温离心 1 min 小心取出柱子, 放到无菌 RNase-free 1.5 mL 离心管里, 在柱内膜的中央小心加入 DEPC-H₂O 50 μ L, 50℃下放置 2 min, 1 000 r/min 室温离心 1 min 后收集管内的溶液即为 RNA 样品, 用紫外分光光度计测定细胞系总 RNA 纯度和含量。

1.2.2 RT-PCR 按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行, 采用一步反应法: 0.2 mL Eppendorf 管每管加入 10 \times 反应缓冲液 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 10 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 5 μ L, RNase 抑制剂 (4 \times 10⁷ U/L) 1 μ L, AMV RTaseXL (5 \times 10⁷ U/L) 1 μ L, AMV-Optimized Taq 酶 (5 \times 10⁷ U/L) 1 μ L, 上、下游特异性引物各 1 μ L, 实验样品 1 μ L, RNaseFreeH₂O 24 μ L, 每管总反应体积 50 μ L。反应条件为: 50℃ 60 min, 94℃ 2 min, 94℃ 40 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 后三步反应进行 30 个循环, 结束前 72℃ 10 min 以充分延伸, 产物置 4℃保存。

1.2.3 PCR 产物电泳 取 PCR 产物 5 μ L, 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶中加 0.5 mg/L 溴乙锭, 缓冲液为 0.5 \times TBE, 5V/cm, 45 min。在反射紫外灯下观察电泳条带, 用数码相机摄影并进行光密度扫描分析, 以 β -actin 为内参照, 结果以 PCR 产物 / β -actin 比值 (T/N) 表示。

统计学处理 各组结果以均数 \pm 标准差表示, 应用 SPSS10.0 统计软件进行 χ^2 检验, 按 $n = 28$, 计算确切概率 P 值。

2 结果

2.1 胰腺癌和癌旁胰腺组织 PTCH mRNA 的表达 所有胰腺癌和癌旁胰腺组织抽总 RNA 后经 10 g/L 琼脂糖凝胶电

泳鉴定, 出现 5S、18S、28S 三条带, 总 RNA 抽提成功。经 RT-PCR 检测, 28 例胰腺癌组织中 20 例胰腺癌组织有 PTCH mRNA 表达 (阳性率 71.4%); 28 例癌旁胰腺组织中无 PTCH mRNA 的表达; 胰腺癌组织和癌旁组织其 PTCH mRNA 阳性表达率差异有显著性 ($P < 0.001$)

2.2 胰腺癌和癌旁胰腺组织 PTCH mRNA 表达的 RT-PCR 图, 见图 1。

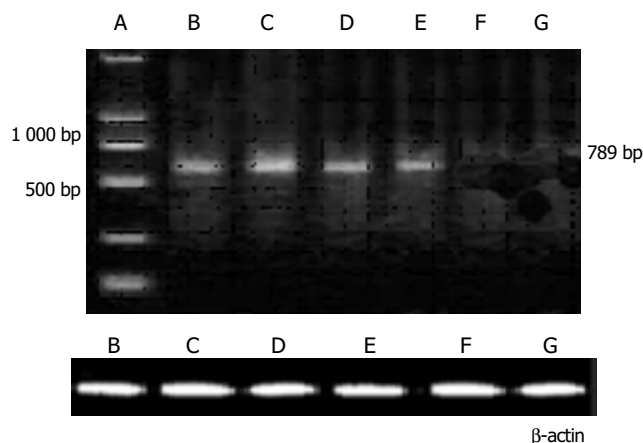


图1 胰腺癌和癌旁胰腺组织 PTCH mRNA 表达的电泳图。A: Mark, B、C、D、E: 胰腺癌, F、G: 癌旁胰腺组织。

2.3 PTCH mRNA 表达与胰腺癌临床病理特征的关系 28 例胰腺癌病例中, 胰头 20 例 (71.4%), 胰体尾 8 例 (28.6%)。肿瘤大小: ≤ 3 cm 13 例, > 3 cm 15 例。病理组织学分类: 浸润性导管癌 26 例 (92.8%), 黏液性囊腺癌 2 例 (7.2%)。结果显示, PTCH mRNA 表达的阳性率在高分化胰腺癌组是 40%, 在中、低分化胰腺癌组是 83.33%。胰腺癌组织中 PTCH mRNA 表达与胰腺癌的分化程度显著有关, 中至低分化胰腺癌组织 PTCH mRNA 表达阳性率明显高于高分化胰腺癌组织 ($P = 0.035$), 而与病灶的大小、淋巴转移、远处转移无关 (表 1)。

表1 PTCHmRNA 表达与胰腺癌临床病理特征的关系

临床特征	<i>n</i>	PTCHmRNA 阳性	PTCHmRNA (T/N)	<i>P</i>
肿瘤直径 (cm)				
≤ 3	13	9	0.56 \pm 0.15	1
> 3	15	11	0.49 \pm 0.20	
分化程度				
高分化	10	4	0.23 \pm 0.12	0.035
中低分化	18	15	0.76 \pm 0.23	
淋巴转移				
无	13	9	0.58 \pm 0.16	1
有	15	11	0.60 \pm 0.13	
远处转移				
无	23	17	0.52 \pm 0.14	0.606
有	5	3	0.55 \pm 0.12	

3 讨论

近 40 a 来胰腺癌的发病率呈上升态势^[1]. 胰腺癌发病以发达国家为主, 病死数约占所有癌症死亡人数的 5%, 列癌肿死因的第 5 位, 仅次于肺癌、结直肠癌、乳腺癌和前列腺癌. 随着人口结构的改变和经济水平的发展, 发展中国家胰腺癌的发病率亦有所增长. 胰腺癌确诊后的中位生存期为 3-6 mo, 5 a 生存率仅为 1-4%, 死亡率几乎与发病率同步上升^[2]. 最新研究^[3-4]认为 hedgehog 信号通路 与胰腺癌发生和发展密切相关. 在胚胎发育时期, Hedgehog (Hh) 信号转导通路对许多发育过程是必须的. Hh 分泌蛋白家族成员以浓度依赖方式控制细胞的增殖、分化和组织模式的形成^[5]. 虽然在胚胎形成后, Hedgehog 信号转导通路的活性消失, 最近有报道显示 Hh 通路的活化可导致胰腺癌. Hh 信号途径最早是在对果蝇的早期胚胎形成相关基因的筛选中被鉴定^[6]. 由 Hh 配体、2 个跨膜蛋白质受体 PTCH (patched) 和 Smo (smoothened) 组成的受体复合物, 以及下游的转录因子 Gli 蛋白 (Gli1, Gli2, Gli3) 等组成. Hh 配体; Hh 最早在果蝇中被鉴定为体节极性基因, 果蝇中只有一种 Hh. 在哺乳动物中存在三种 Hh 成员: Shh (sonic hedgehog)、Ihh (Indian hedgehog) 和 Dhh (desert hedgehog), 三种 Hh 均编码分泌蛋白^[5]. 在发育组织和成体组织中, 不同 Hh 的表达存在复杂的调控关系, 三种 Hh 蛋白可以相互替代, 但是他们都有自己独特的功能. 信号蛋白 Shh 具有自身催化裂解功能, 在肢体、体节和神经管的形成中起作用; Ihh 专门参与软骨细胞的发育; Dhh 在精细胞的发育中起重要作用. 受体复合物: PTCH 为 Shh 的受体, 属于跨膜蛋白, 在哺乳动物存在两种 PTCH 家族成员, 即 PTCH1 和 PTCH2, 他们均能结合所有 Hh 蛋白 (Shh、Ihh 和 Dhh). Smo 属于 G 蛋白偶联的受体, 是一种跨膜蛋白^[7-8]. 虽然对配体-受体信号转导的精确细节仍不明了, 目前模型推测在没有 Hh 配体信号刺激下, PTCH 抑制 Smo 的活性. 当 Hh 与 PTCH 结合后, 解除了 PTCH 对 Smo 的抑制^[9], 释放的 Smo 进入胞内, 引发细胞内信号下传, 激活下游转录因子 Gli 家族, 调节多种靶基因的表达. Hh 信号途径在胚胎发育过程中作用被广泛研究^[5], 但他在成体组织中的作用研究甚少. 越来越多的证据显示在某些成体组织仍存在 Hh 活性. 成体组织中 Hh 活性的失调可能与肿瘤的形成有关^[7]. 有证据证明由 Hh 信号途径激活而诱导产生的肿瘤存在 Hh 信号途径中激活因子的变异. 已经确认在基底细胞癌 (BCC)、乳腺癌和成神经管细胞瘤存在 Shh 的活化^[7]. 最近的研究表明增强的 Hh 信号通路还能引起其他器官包括肺、胃肠道和胰腺的肿瘤^[3-4]. Berman *et al*^[4]报道: 在来源于食管、胃、胆道、胰腺和结肠肿瘤的 38 个细胞系中有 37 个细胞系检测到 Shh 和 Ihh 的 mRNA 表达. Hh 的靶基因 PTCH 和 Gli 作为 Hh 通路活性的指标, 在 6 个食管癌细胞系中有 4 个细胞系 (4/6), 在 6 个胃癌细胞系中有 4 个细胞系 (4/6), 在 6 个胰腺癌细胞系中有 5 个细胞系 (5/6), 在 9 个胆管癌

细胞系中有 4 个细胞系 (4/9) 存在 PTCH 和 Gli 的共同表达, 但在 11 个结肠癌细胞系中无 1 个细胞系检测到 PTCH 的表达. 为在体内研究 Hh 信号通路的活性, 用新鲜切下的胃和胰腺肿瘤为材料, RT-PCR 检测 PTCH mRNA 的表达水平, 发现在胰腺肿瘤组织中, 其 PTCH mRNA 的表达水平是正常胰腺组织的 4 4 8 倍, 在胃肿瘤组织中, 其 PTCH mRNA 的表达水平是正常胃组织的 129 倍. 在成人胰腺组织, 虽然 Ptch1 的表达水平低于通过免疫组化能够检测到的水平, 但 Hh 信号通路活化参与胰腺癌的进展, 从胰腺上皮内肿瘤 (PanIN) 到胰腺癌, Hh 信号转导成员的表达是逐渐增强的^[3]. 在转基因鼠上, 由与胰腺和十二指肠相似框基因 1 (Pdx1) 启动子控制的 Shh 的异位表达, 导致了胰腺出现 PanIN 病变的形成^[3]. PanIN 病变以胰腺腺管细胞形态学改变、黏液积聚、乳头状增生、细胞核肿大和极性消失为特点. 此外, 在这些转基因鼠上, 还发现了 Erbb2 的过度表达和原癌基因 Kras 的突变^[3], Erbb2 的过度表达和原癌基因 Kras 的突变以前被认为与胰腺癌相关. 进一步通过免疫组化对 Hh 信号通路的活性进行检测, 发现在正常胰腺组织中无 PTCH 和 Smo 的表达, 但在转基因鼠和人胰腺癌组织中均有过度表达. 最近的研究发现, Hh 信号通路的失调不仅引起肿瘤的产生而且对肿瘤的发展和维持是非常重要的, 因为转化的细胞继续依赖 Hh 的活性而生长. 对 26 个原发或转移性胰腺癌的细胞系进行 Hh 信号通路的活性检测, 发现全部的细胞系均有 2 个或多个 Hh 途径成员的表达, 包括 PTCH1、Smo、HIP 和 GLI1^[3].

本研究结果显示, 28 例胰腺癌组织中 20 例胰腺癌组织有 PTCH mRNA 表达 (阳性率 71.4%); 28 例胰腺癌旁组织无 PTCH mRNA 的表达; 胰腺癌组织和癌旁组织其 PTCH mRNA 阳性表达率差异有显著性 ($P < 0.001$); 说明大约 70% 左右胰腺癌组织中存在 hedgehog 信号通路成员 PTCH mRNA 的表达, 也即存在 hedgehog 信号通路的活化, 而胰腺癌旁组织无 hedgehog 信号通路成员 PTCH mRNA 的表达, 也说明了在胰腺癌旁组织 hedgehog 信号通路是关闭的. PTCH mRNA 阳性表达率与肿瘤分化程度有关 ($P = 0.035$), 与肿瘤的大小、淋巴及远处转移无关 ($P > 0.05$). 说明在有 hedgehog 信号通路活化参与发生的胰腺癌较无 hedgehog 信号通路参与发生的胰腺癌其恶性程度高、分化增殖快. 由于 hedgehog 信号通路活化参与胰腺癌发生的确切机制还不清楚, 比如, 在有的胰腺癌组织中检测到 Smo mRNA 的表达, 而没有检测到 PTCH mRNA 的表达, 有的胰腺癌组织中同时检测到 Smo mRNA 和 PTCH mRNA 的表达, 还有的胰腺癌组织中只检测到 PTCH mRNA 的表达. 有关 PTCH 表达于肿瘤生物学行为的关系以及 PTCH 作用机制有待进一步的临床观察和深入研究.

4 参考文献

- 1 Rosenberg L. Pancreatic cancer: a review of emerging therapies. *Drugs* 2000;59:1071-1089

- 2 Regine WF, John WJ, Mohiuddin M. Current and emerging treatments for pancreatic cancer. *Drugs Aging* 1997;11:285-295
- 3 Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851-856
- 4 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A. Wide spread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumour. *Nature* 2003;425:846-851
- 5 Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001;15:3059-3087
- 6 Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980;287:795-801
- 7 Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature Rev Cancer* 2002;2:361-372
- 8 Murone M, Luoh SM, Stone D. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused. *Nature Cell Biol* 2000;2:310-312
- 9 Kalderon D. Transducing the hedgehog signal. *Cell* 2000;103:371-374

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

β -catenin 的表达与早期胃癌多发性的关系

王轶淳, 孙明军, 傅炜昕, 傅宝玉

王轶淳, 孙明军, 中国医科大学附属第一医院内镜中心 辽宁省沈阳市 110001
傅炜昕, 中国医科大学实验技术中心 辽宁省沈阳市 110001
傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 王轶淳, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院内镜中心. susanwyichun@yahoo.com
电话: 024-23256666-6108 传真: 024-22703576
收稿日期: 2004-09-29 接受日期: 2004-10-11

摘要

目的: 探讨 β -catenin 在早期胃癌中的表达与早期胃癌的多发性和单发性的关系。

方法: 用免疫组织化学方法检测 59 例早期胃癌患者胃癌组织中 β -catenin 的表达情况。

结果: 早期胃癌中存在 β -catenin 的异常表达, 多发组的阳性率为 60.00%, 单发组的阳性率为 13.79%, 均高于对照组。多发组的阳性细胞百分率为 $(58.25 \pm 10.54)\%$, 单发组为 $(29.91 \pm 5.14)\%$, 两组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。

结论: 在早期胃癌中存在 β -catenin 的异常表达, 与早期胃癌的多发性有关, β -catenin 阳性的早期胃癌患者出现多发性胃癌的危险性高于 β -catenin 阴性者。

王轶淳, 孙明军, 傅炜昕, 傅宝玉. β -catenin 的表达与早期胃癌多发性的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1150-1153
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1150.asp>

0 引言

β -catenin 是细胞中的一种多功能蛋白质, 可以位于细胞膜、细胞质以及细胞核, 细胞膜上的 β -catenin 是

细胞连接的重要组成部分, 细胞质中的 β -catenin 可以形成游离的蛋白池, 细胞核中的 β -catenin 则可以与转录因子 Tcf/Lef 家族构成复合物^[1], 作为转录因子激活靶基因的转录。大量研究表明, β -catenin 与结肠癌、前列腺癌、黑色素瘤、肝癌等多种肿瘤的发生有关^[2-5], 对其与早期胃癌的关系的研究, 尚未见报道。在对早期胃癌患者行内镜下胃癌切除术 (EMR) 后发现, 有一些患者存在胃癌的多发性, 即在肿瘤切除后, 胃内再次有胃癌的发生, 而且与原来切除的肿瘤位置不同。针对这种胃癌的多发者及单发者进行有关 β -catenin 的研究, 以期发现二者在 β -catenin 的表达方面的差异, 为有胃癌多发倾向的患者提供一个重点监控的依据。

1 材料和方法

1.1 材料 内镜下切除的早期胃癌标本 59 例 (为日本东北大学医学部附属医院病理室提供), 经苏木素-伊红染色证实癌组织限于黏膜层或者黏膜下层, 分为两组, 其中单发组 29 例, 为 1995 年行内镜下胃癌切除术后, 经 5 a 随访胃内无新的癌灶发生者, 其中男性 21 例, 女性 8 例, 年龄 53-80 (平均 69.4) 岁, 镜下分型: IIa 型 9 例, IIc 型 14 例, IIa+IIc 型 6 例; 多发组 30 例, 为 1995-2000 年期间接受 EMR 治疗 2 次或 2 次以上者, 其中 2 次者为 25 例, 3 次者为 5 例, 而且每次切除的癌灶部位均不同, 其中男性 23 例, 女性 7 例, 年龄 51-82 (平均 69.6) 岁, 镜下分型: I 型 1 例次, IIa 型 24 例次, IIc 型 18 例次, IIa+IIc 型 22 例次; 对照组 10 例, 为正常胃黏膜活检组织标本, 其

- 2 Regine WF, John WJ, Mohiuddin M. Current and emerging treatments for pancreatic cancer. *Drugs Aging* 1997;11:285-295
- 3 Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851-856
- 4 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A. Wide spread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumour. *Nature* 2003;425:846-851
- 5 Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001;15:3059-3087
- 6 Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980;287:795-801
- 7 Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature Rev Cancer* 2002;2:361-372
- 8 Murone M, Luoh SM, Stone D. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused. *Nature Cell Biol* 2000;2:310-312
- 9 Kalderon D. Transducing the hedgehog signal. *Cell* 2000;103:371-374

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

β -catenin 的表达与早期胃癌多发性的关系

王轶淳, 孙明军, 傅炜昕, 傅宝玉

王轶淳, 孙明军, 中国医科大学附属第一医院内镜中心 辽宁省沈阳市 110001
傅炜昕, 中国医科大学实验技术中心 辽宁省沈阳市 110001
傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 王轶淳, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院内镜中心. susanwyichun@yahoo.com
电话: 024-23256666-6108 传真: 024-22703576
收稿日期: 2004-09-29 接受日期: 2004-10-11

摘要

目的: 探讨 β -catenin 在早期胃癌中的表达与早期胃癌的多发性和单发性的关系。

方法: 用免疫组织化学方法检测 59 例早期胃癌患者胃癌组织中 β -catenin 的表达情况。

结果: 早期胃癌中存在 β -catenin 的异常表达, 多发组的阳性率为 60.00%, 单发组的阳性率为 13.79%, 均高于对照组。多发组的阳性细胞百分率为 $(58.25 \pm 10.54)\%$, 单发组为 $(29.91 \pm 5.14)\%$, 两组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。

结论: 在早期胃癌中存在 β -catenin 的异常表达, 与早期胃癌的多发性有关, β -catenin 阳性的早期胃癌患者出现多发性胃癌的危险性高于 β -catenin 阴性者。

王轶淳, 孙明军, 傅炜昕, 傅宝玉. β -catenin 的表达与早期胃癌多发性的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1150-1153
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1150.asp>

0 引言

β -catenin 是细胞中的一种多功能蛋白质, 可以位于细胞膜、细胞质以及细胞核, 细胞膜上的 β -catenin 是

细胞连接的重要组成部分, 细胞质中的 β -catenin 可以形成游离的蛋白池, 细胞核中的 β -catenin 则可以与转录因子 Tcf/Lef 家族构成复合物^[1], 作为转录因子激活靶基因的转录。大量研究表明, β -catenin 与结肠癌、前列腺癌、黑色素瘤、肝癌等多种肿瘤的发生有关^[2-5], 对其与早期胃癌的关系的研究, 尚未见报道。在对早期胃癌患者行内镜下胃癌切除术 (EMR) 后发现, 有一些患者存在胃癌的多发性, 即在肿瘤切除后, 胃内再次有胃癌的发生, 而且与原来切除的肿瘤位置不同。针对这种胃癌的多发者及单发者进行有关 β -catenin 的研究, 以期发现二者在 β -catenin 的表达方面的差异, 为有胃癌多发倾向的患者提供一个重点监控的依据。

1 材料和方法

1.1 材料 内镜下切除的早期胃癌标本 59 例 (为日本东北大学医学部附属医院病理室提供), 经苏木素-伊红染色证实癌组织限于黏膜层或者黏膜下层, 分为两组, 其中单发组 29 例, 为 1995 年行内镜下胃癌切除术后, 经 5 a 随访胃内无新的癌灶发生者, 其中男性 21 例, 女性 8 例, 年龄 53-80 (平均 69.4) 岁, 镜下分型: IIa 型 9 例, IIc 型 14 例, IIa+IIc 型 6 例; 多发组 30 例, 为 1995-2000 年期间接受 EMR 治疗 2 次或 2 次以上者, 其中 2 次者为 25 例, 3 次者为 5 例, 而且每次切除的癌灶部位均不同, 其中男性 23 例, 女性 7 例, 年龄 51-82 (平均 69.6) 岁, 镜下分型: I 型 1 例次, IIa 型 24 例次, IIc 型 18 例次, IIa+IIc 型 22 例次; 对照组 10 例, 为正常胃黏膜活检组织标本, 其

中男性7例,女性3例,年龄54-80(平均66.5)岁。

1.2 方法 40 g/L 甲醛固定、石蜡包埋的、经EMR切除的早期胃癌组织及正常胃黏膜活检组织标本,制备5 μ m厚的连续切片,采用苏木素-伊红染色,光镜下观察胃癌浸润的深度及分化程度。对连续切片的胃癌组织进行 β -catenin的免疫组织化学染色,采用SP法(β -catenin鼠抗人单克隆抗体购自Transduction Laboratories A BD Company, SP免疫组化试剂盒为DAKO公司产品),在枸橼酸钠溶液中经120℃、5 min 抗原修复, β -catenin的工作浓度为1:200,以已知阳性切片作为阳性对照,阴性对照以PBS代替一抗。结果判定: β -catenin免疫组织化学染色以细胞核中出现棕黄色颗粒且着色细胞数大于10%为阳性,全片未见着色或着色细胞数小于10%为阴性。由两位医师在共览显微镜下观察,计数1 000个肿瘤细胞中细胞核 β -catenin染色阳性的细胞数,以百分比计算细胞核染色阳性率,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。

统计学处理 采用SPSS9.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 病理学改变 58例为高分化型管状腺癌,1例为中分化型管状腺癌,其中51例的癌组织限于黏膜层,单发组中有3例、多发组中有5例的胃癌浸润深度限于黏膜下层。

2.2 β -catenin的表达和分布 对照组的细胞膜有 β -catenin的正常表达,细胞质及细胞核无 β -catenin的阳性表达。胃癌组的胃癌区细胞膜无 β -catenin的表达,而细胞核中有 β -catenin表达,与正常细胞不同;多发组中18例细胞核明显深染(图1A),提示有 β -catenin的阳性表达,阳性率为60.00%,4例未见细胞核染色,仅见细胞质染色;单发组中4例细胞核深染(图1B),提示有 β -catenin的阳性表达,阳性率为13.79%,1例未见细胞核染色,可见细胞质染色。两组比较差异有显著性($P < 0.01$)。

2.3 早期胃癌 β -catenin阳性细胞百分率 对照组 β -catenin阳性细胞百分率为0.00%;在多发组有阳性表达的18例中 β -catenin染色阳性细胞所占的比率为(58.25 \pm 10.54)%;单发组有阳性表达的4例中, β -catenin染色阳性细胞所占的比率为(29.91 \pm 5.14)%,两组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

β -catenin是一种多功能蛋白质,具有细胞黏附和信号传导功能^[1, 6-7]。细胞内绝大多数的 β -catenin与E-cadherin相结合,通过 α -catenin与肌动蛋白细胞骨架相连,参与细胞间的黏附和细胞运动。当E-cadherin-catenin复合物中的任一结构发生变化时,都会影响细胞间连接。同时细胞中 β -catenin的过度沉积可以促使细胞过度增生^[8-9]。 β -catenin的生成与降解处于一种动态平衡状态,细胞中的糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)可以使 β -catenin的N端丝氨酸残基和苏氨酸残基磷酸化,通过蛋白分解系统降解 β -catenin,使细胞中的 β -catenin稳定在一个较低的水平。当Wnt蛋白表达高时,与细胞膜上的受体结合,通过对adenomatous polyposis coli(APC)、GSK-3 β 等因素的抑制作用,使细胞内单聚体的 β -catenin增多,与Tcf或者Lef结合,进入细胞核,而Tcf/Lef是DNA结合蛋白,进入细胞核内后,作为转录因子与相应的DNA结合,促进靶基因(如C-myc、cyclinD₁、MMP-7等)^[10-13]的持续转录,从而完成Wnt信号的传导。另一方面,APC蛋白与 β -catenin结合,可以促进GSK-3 β 对 β -catenin的磷酸化^[14-15]。而 β -catenin基因本身的异常,如 β -catenin的外显子3的N端在调节 β -catenin的机制中,是一个非常重要的序列,如果该序列缺失或者突变,则出现 β -catenin的降解障碍,导致 β -catenin的蓄积。因此,APC的缺陷、 β -catenin基因本身的突变以及Wnt途径中其他的变化,均可以导致 β -catenin的蓄积。胃癌的发生发展是一个多因素多步骤的过程,涉及多种癌基因、抑癌基因、端粒及端粒酶、细胞黏附因子等^[16-21]。有研究^[22]表明, β -catenin的异常表达与预后不良有相关性。胃癌组织中 β -catenin在细胞膜表达的减弱与分化不良及存活时间短有关系^[23]。本研究表明,在早期胃癌中存在 β -catenin的异常表达。与正常胃组织相比,在胃癌细胞膜的表达缺失。考虑该蛋白质表达的减弱或缺失,可能导致 α -catenin不能与cadherin相连接,影响细胞间的正常连接,从而使肿瘤细胞的黏附能力下降,获得转移、侵袭的能力。

β -catenin的异常表达在肿瘤发展中的效应可能不同。Nhieu *et al*的研究^[24]发现,肝癌中 β -catenin明

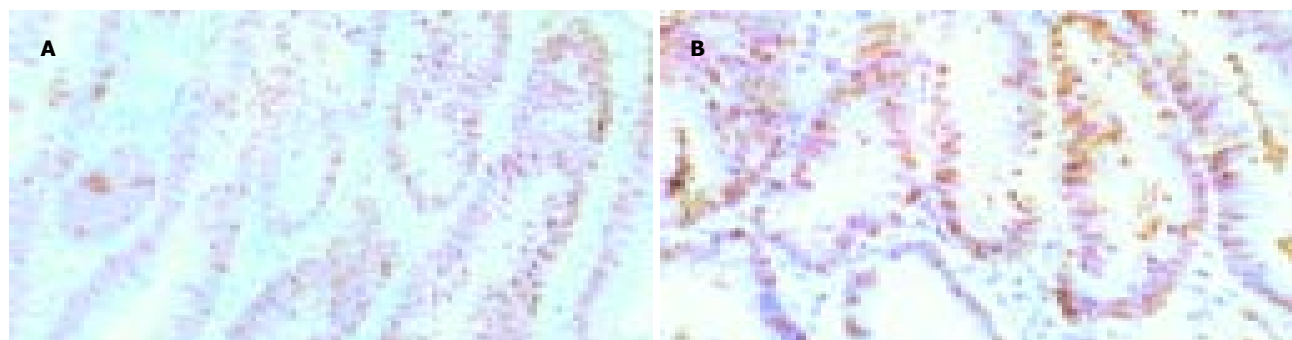


图1 早期胃癌 β -catenin染色, $\times 400$ 。A: 多发组; B: 单发组。

显著蓄积于细胞核,与 β -catenin基因的突变有相关性。突变的 β -catenin在细胞核的蓄积可能增加肿瘤复发的危险性,预后不好。对不同分期卵巢癌中 β -catenin的表达与组织学分型以及疾病转归的关系的研究^[25]发现,细胞核表达 β -catenin是预后良好的标志,仅有细胞膜表达的,预后不好。有研究指出,Wnt信号传导通路与G蛋白通路等其他通路之间有交互作用^[26],可以形成复杂的网络,提示 β -catenin的异常表达在肿瘤发展过程中有多重效应^[27-29]。本研究结果表明,正常胃组织中无 β -catenin在细胞核的阳性表达,而胃癌组织的细胞核中 β -catenin呈阳性,表达明显增强,提示存在 β -catenin的蓄积。多发组 β -catenin的阳性细胞所占的比率明显高于单发组,两组比较差异有显著性,提示 β -catenin的异常表达与早期胃癌的多发性有关, β -catenin阳性的早期胃癌患者,出现多发性胃癌的危险性高于 β -catenin阴性者,为加强对细胞核 β -catenin表达异常的早期胃癌患者进行严格的定期随访提供了依据。另外, β -catenin是Wnt通路中的关键环节,其与上游及下游因子之间的关系非常复杂^[30-33]。本次实验中多发组有4例的两次胃癌切除标本 β -catenin的表达不同,一次为阳性,另一次为阴性,考虑可能是两次肿瘤的发生途径不同。实验结果还显示,多发组中有4例、单发组中有1例存在 β -catenin在细胞质中的表达,而细胞核中呈阴性反应,考虑在这些胃癌的发生过程中,不是通过 β -catenin的蓄积进而进入细胞核引起癌基因的激活,而是存在其他的致癌途径。

我们未对是否存在 β -catenin基因异常进行检测, β -catenin的蓄积是其基因本身的异常还是Wnt途径中其他因素异常所致,目前尚不清楚,有待进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, Kim SY, Lee HK, Kim PJ, Oh ST, Yoo NJ, Lee JY. Frequent somatic mutation of the β -catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res* 1999;59:4257-4260
- 2 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-1790
- 3 Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP. β -catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998;58:2520-2523
- 4 Chan E, Gat U, McNiff JM, Fuchs E. A common human skin tumor is caused by activating mutations in β -catenin. *Nat Genet* 1999;21:410-413
- 5 Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Nakamura Y. Activation of the β -catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res* 1998;58:2524-2527
- 6 Gumbiner BM. Signal transduction by β -catenin. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:634-640
- 7 Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:280-287
- 8 Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Zile MH. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2001;7:542-546
- 9 Jiang Y, Zhou XD, Liu YK, Wu X, Huang XW. Association of hTcf-4 gene expression and mutation with clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:804-807
- 10 He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-1512
- 11 Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426
- 12 Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999;155:1033-1038
- 13 Monga SP, Monga HK, Tan X, Mule K, Peditakis P, Michalopoulos GK. Beta-catenin antisense studies in embryonic liver culture: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology* 2003;124:202-216
- 14 Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β -catenin. *J Biol Chem* 1997;272:24735-24738
- 15 Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P. Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. *Mol Cell Biol* 1996;16:2128-2134
- 16 Li YL, He XM, Zheng HC, Wu DY, Yang XF, Xin Y, Fu BY. Expression of PTEN encoding product in malignant lesions of gastric mucosa and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1294-1296
- 17 Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- 18 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 19 Su JM, Gui L, Zhou YP, Zha XL. Expression of focal adhesion kinase and alpha5 and beta1 integrins in carcinomas and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:613-618
- 20 Liu DH, Zhang XY, Fan DM, Huang YX, Zhang JS, Huang WQ, Zhang YQ, Huang QS, Ma WY, Chai YB, Jin M. Expression of vascular endothelial growth factor and its role in oncogenesis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:500-505
- 21 Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-536
- 22 Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology* 1997;112:46-54
- 23 Ramesh S, Nash J, McCulloch PG. Reduction in membranous expression of β -catenin and increased cytoplasmic E-cadherin expression predict poor survival in gastric cancer. *Br J Cancer* 1999;81:1392-1397
- 24 Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES, Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated β -catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* 1999;155:703-710
- 25 Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suarez A, Armas A. beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol* 1999;155:527-536
- 26 Gleason JE, Korswagen HC, Eisenmann DM. Activation of Wnt signaling bypasses the requirement for RTK/Ras signaling during *C. elegans* vulval induction. *Genes Dev* 2002;16:1281-1290
- 27 Tsukashita S, Kushima R, Bamba M, Nakamura E, Mukaisho K, Sugihara H, Hattori T. Beta-catenin expression in intramucosal neoplastic lesions of the stomach. Comparative analysis of adenoma/dysplasia, adenocarcinoma and sig-

- net-ring cell carcinoma. *Oncology* 2003;64:251-258
- 28 Li YJ, Ji XR. Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:368-372
- 29 Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudloff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 2003;22:1536-1545
- 30 Ebert MP, Yu J, Hoffmann J, Rocco A, Rocken C, Kahmann S, Muller O, Korc M, Sung JJ, Malfertheiner P. Loss of beta-catenin expression in metastatic gastric cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1708-1714
- 31 Lowy AM, Fenoglio-Preiser C, Kim OJ, Kordich J, Gomez A, Knight J, James L, Groden J. Dysregulation of beta-catenin expression correlates with tumor differentiation in pancreatic duct adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2003;10:284-290
- 32 Miyoshi K, Hennighausen L. Beta-catenin: a transforming actor on many stages. *Breast Cancer Res* 2003;5:63-68
- 33 Su XK, Zhao XM, Li JQ, Cui XJ, Xie XH, Yang HY, Xu FB, Shi M. Role of β -catenin and cyclin D1 expression in intrahepatic dissemination of liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1362-1364

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

黄芩甙对 ConA 致肝损伤小鼠肝组织 MDA 含量的影响

汪晓军, 马 赞, 张奉学, 朱宇同, 郭兴伯, 李秀惠

汪晓军, 李秀惠, 首都医科大学附属北京佑安医院中西医结合科
北京市 100054

马赞, 首都医科大学中医学院中医系 北京市 100013
张奉学, 朱宇同, 郭兴伯, 广州中医药大学热带医学研究所
广东省广州市 510405

通讯作者: 汪晓军, 100054, 北京市丰台区右安门外西头条 8 号, 首都医科大学附属北京佑安医院中西医结合科. w_xiaojun@126.com
电话: 010-63292211-2688 传真: 010-63296491
收稿日期: 2005-03-12 接受日期: 2005-04-01

摘要

目的: 观察黄芩甙对模型小鼠血清 ALT、AST 和肝组织 MDA 含量的影响。

方法: 除正常组灌服及尾静脉注射生理盐水外, 其余各组小鼠分别于首日上、下午和次日下午各灌胃给药 1 次 0.2 mL/只, 联苯双酯为 150 g/L, 大、中、小及注射剂组分别为 200、100、50、50 g/L。末次给药后 4-6 h 各组动物一次性尾静脉注射 ConA 20 mg/kg, 观察血清 ALT、AST 和肝组织 MDA 含量的变化。

结果: 除空白组外的各组小鼠血清 ALT、AST 值黄芩甙大 (2 321.3 \pm 406.2; 1 638.5 \pm 353.4)、中 (1 890.2 \pm 467.3; 1 550.3 \pm 437.3)、小剂量组 (1 584.7 \pm 399.6; 1 302.9 \pm 353.1) 以及注射剂组 (2 570.0 \pm 406.7; 2 186.4 \pm 443.9) 较模型组 (4 499.9 \pm 334.2; 3 967.6 \pm 392.7) 均显著降低 ($P < 0.01$), 说明各治疗组均有降低转氨酶的作用。在降低 ALT 作用方面, 黄芩甙大剂量与注射剂组的 ALT 降低不及联苯双酯组 ($P < 0.05$), 黄芩甙中、小剂量降低 ALT 的作用与联苯双酯组 (1 612.8 \pm 309.2) 较为接近 ($P > 0.05$)。在降低 AST 作用方面, 黄芩甙大、中、小剂量的作用无明显差异并与联苯双酯较为接近 ($P > 0.05$), 同时可以肯定的是, 黄芩甙注射剂也有明显的降低 AST 的作用, 但效果不如黄芩甙大、中、小剂量和联苯双酯组 ($P < 0.05$),

$P < 0.05$, $P < 0.05$)。肝组织匀浆中的 MDA 含量, 以黄芩甙大 (2.61 \pm 0.3)、中 (2.11 \pm 0.4)、小剂量组 (2.60 \pm 0.5) 及注射剂 (2.66 \pm 0.5) 和联苯双酯组 (2.81 \pm 0.3) 均较模型组 (4.66 \pm 0.5) 显著降低 ($P < 0.01$), 黄芩甙中剂量组的肝匀浆 MDA 含量最低, 而黄芩甙大、小剂量组及注射剂组的肝匀浆 MDA 含量低于联苯双酯组, 但组间比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

结论: 黄芩甙可降低血清 ALT、AST 和肝组织 MDA 含量且优于联苯双酯, 这可能是其抗 ConA 肝损伤机理的重要方面。

汪晓军, 马赞, 张奉学, 朱宇同, 郭兴伯, 李秀惠. 黄芩甙对 ConA 致肝损伤小鼠肝组织 MDA 含量的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1153-1155
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1153.asp>

0 引言

黄芩甙 (baicalin, BC) 是中药黄芩 (*scutellaria baicalensis georgi*) 中的一种主要成分, 黄芩具有清热燥湿、泻火解毒的功能, 可用于湿热所致的多种病症。据报道黄芩甙有较好的解热、抗菌消炎、解毒、抗氧化、抗病毒、抗感染、调节免疫等药理作用, 以往国内临床主要用于抗菌消炎和抗感染, 近年来多运用于各种疾病见有湿热邪毒证候, 如感冒、发热、呼吸系统炎症、慢性肝炎、黄疸、胆囊疾病、肾脏疾病等。由于肝组织损伤与病毒感染、炎症、过氧化反应、自身免疫系统失衡等息息相关, 因此应用黄芩甙防治免疫原因造成的肝损害对治疗病毒性肝炎的研究有重要意义。我们建立 ConA 致小鼠肝损伤的动物模型, 以联苯双酯为对照, 通过对肝损伤小鼠血清的 AST、ALT, 肝组织的 MDA 含量的检测, 探讨黄芩甙可能的保肝降酶、抗氧化、防止肝损伤的作用和机理。

- net-ring cell carcinoma. *Oncology* 2003;64:251-258
- 28 Li YJ, Ji XR. Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:368-372
- 29 Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudloff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 2003;22:1536-1545
- 30 Ebert MP, Yu J, Hoffmann J, Rocco A, Rocken C, Kahmann S, Muller O, Korc M, Sung JJ, Malfertheiner P. Loss of beta-catenin expression in metastatic gastric cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1708-1714
- 31 Lowy AM, Fenoglio-Preiser C, Kim OJ, Kordich J, Gomez A, Knight J, James L, Groden J. Dysregulation of beta-catenin expression correlates with tumor differentiation in pancreatic duct adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2003;10:284-290
- 32 Miyoshi K, Hennighausen L. Beta-catenin: a transforming actor on many stages. *Breast Cancer Res* 2003;5:63-68
- 33 Su XK, Zhao XM, Li JQ, Cui XJ, Xie XH, Yang HY, Xu FB, Shi M. Role of β -catenin and cyclin D1 expression in intrahepatic dissemination of liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1362-1364

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

黄芩甙对 ConA 致肝损伤小鼠肝组织 MDA 含量的影响

汪晓军, 马 赞, 张奉学, 朱宇同, 郭兴伯, 李秀惠

汪晓军, 李秀惠, 首都医科大学附属北京佑安医院中西医结合科
北京市 100054

马赞, 首都医科大学中医药学院中医系 北京市 100013
张奉学, 朱宇同, 郭兴伯, 广州中医药大学热带医学研究所
广东省广州市 510405

通讯作者: 汪晓军, 100054, 北京市丰台区右安门外西头条 8 号, 首都医科大学附属北京佑安医院中西医结合科. w_xiaojun@126.com
电话: 010-63292211-2688 传真: 010-63296491
收稿日期: 2005-03-12 接受日期: 2005-04-01

摘要

目的: 观察黄芩甙对模型小鼠血清 ALT、AST 和肝组织 MDA 含量的影响。

方法: 除正常组灌服及尾静脉注射生理盐水外, 其余各组小鼠分别于首日上、下午和次日下午各灌胃给药 1 次 0.2 mL/只, 联苯双酯为 150 g/L, 大、中、小及注射剂组分别为 200、100、50、50 g/L。末次给药后 4-6 h 各组动物一次性尾静脉注射 ConA 20 mg/kg, 观察血清 ALT、AST 和肝组织 MDA 含量的变化。

结果: 除空白组外的各组小鼠血清 ALT、AST 值黄芩甙大 (2 321.3 \pm 406.2; 1 638.5 \pm 353.4)、中 (1 890.2 \pm 467.3; 1 550.3 \pm 437.3)、小剂量组 (1 584.7 \pm 399.6; 1 302.9 \pm 353.1) 以及注射剂组 (2 570.0 \pm 406.7; 2 186.4 \pm 443.9) 较模型组 (4 499.9 \pm 334.2; 3 967.6 \pm 392.7) 均显著降低 ($P < 0.01$), 说明各治疗组均有降低转氨酶的作用。在降低 ALT 作用方面, 黄芩甙大剂量与注射剂组的 ALT 降低不及联苯双酯组 ($P < 0.05$), 黄芩甙中、小剂量降低 ALT 的作用与联苯双酯组 (1 612.8 \pm 309.2) 较为接近 ($P > 0.05$)。在降低 AST 作用方面, 黄芩甙大、中、小剂量的作用无明显差异并与联苯双酯较为接近 ($P > 0.05$), 同时可以肯定的是, 黄芩甙注射剂也有明显的降低 AST 的作用, 但效果不如黄芩甙大、中、小剂量和联苯双酯组 ($P < 0.05$),

$P < 0.05$, $P < 0.05$)。肝组织匀浆中的 MDA 含量, 以黄芩甙大 (2.61 \pm 0.3)、中 (2.11 \pm 0.4)、小剂量组 (2.60 \pm 0.5) 及注射剂 (2.66 \pm 0.5) 和联苯双酯组 (2.81 \pm 0.3) 均较模型组 (4.66 \pm 0.5) 显著降低 ($P < 0.01$), 黄芩甙中剂量组的肝匀浆 MDA 含量最低, 而黄芩甙大、小剂量组及注射剂组的肝匀浆 MDA 含量低于联苯双酯组, 但组间比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

结论: 黄芩甙可降低血清 ALT、AST 和肝组织 MDA 含量且优于联苯双酯, 这可能是其抗 ConA 肝损伤机理的重要方面。

汪晓军, 马赞, 张奉学, 朱宇同, 郭兴伯, 李秀惠. 黄芩甙对 ConA 致肝损伤小鼠肝组织 MDA 含量的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1153-1155
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1153.asp>

0 引言

黄芩甙 (baicalin, BC) 是中药黄芩 (*scutellaria baicalensis georgi*) 中的一种主要成分, 黄芩具有清热燥湿、泻火解毒的功能, 可用于湿热所致的多种病症。据报道黄芩甙有较好的解热、抗菌消炎、解毒、抗氧化、抗病毒、抗感染、调节免疫等药理作用, 以往国内临床主要用于抗菌消炎和抗感染, 近年来多运用于各种疾病见有湿热邪毒证候, 如感冒、发热、呼吸系统炎症、慢性肝炎、黄疸、胆囊疾病、肾脏疾病等。由于肝组织损伤与病毒感染、炎症、过氧化反应、自身免疫系统失衡等息息相关, 因此应用黄芩甙防治免疫原因造成的肝损害对治疗病毒性肝炎的研究有重要意义。我们建立 ConA 致小鼠肝损伤的动物模型, 以联苯双酯为对照, 通过对肝损伤小鼠血清的 AST、ALT, 肝组织的 MDA 含量的检测, 探讨黄芩甙可能的保肝降酶、抗氧化、防止肝损伤的作用和机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验药物 黄芩甙($C_{21}H_{18}O_{11}$), 分子质量为 446.35 u, 由朱宇同教授馈赠, 经聚酰胺薄层层析、紫外可见光谱证实纯度达到 98.9% 以上。

1.1.2 实验动物 雄性 Balb/c 小鼠 95 只, 体重 20-22 g, 8-9 周龄, 购自第一军医大学实验动物中心。

1.1.3 主要试剂 ConA 为美国华盛顿生物药品公司生产; 联苯双酯自北京协和药厂生产。ALT、AST 试剂盒为上海荣盛生物技术有限公司生产。MDA 和双缩脲蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.1.4 主要仪器 玻璃匀浆器; 752 型紫外光栅分光光度计; HH-S11.2 电热恒温水浴器; 小型三用水箱; TD5 台式离心机; TLL-D 台式冷冻离心机、台式高速离心机。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 小鼠适应性喂养 3 d 后, 将动物随机分为 7 组, 分别为正常组 10 只、病理组 15 只、联苯双酯组 14 只、黄芩甙大剂量、中剂量、小剂量及注射剂组各 14 只。

1.2.2 模型复制 按文献[1]方法, 除正常对照组灌服及尾静脉注射生理盐水外, 其余各组小鼠分别于首日上、下午和次日下午各灌胃给药 1 次 0.2 mL/只, 联苯双酯为 150 g/L, 大、中、小及注射剂组分别为 200、100、50、50 g/L。末次给药后 4-6 h 各组动物一次性尾静脉注射 ConA 20 mg/kg。

1.2.3 标本采集 尾静脉注射 ConA 12 h 后, 摘眼球取全血, 低温条件下处死动物, 摘取肝脏观察大体外观后, 取同一肝叶用 40 g/L 中性甲醛溶液固定, 其余部分 -20℃ 冻存储备用。

1.2.4 小鼠肝组织匀浆制备 将 Tris 1.21 g 及 EDTA-2Na 37.23 mg 加蒸馏水 500 mL, 再用 200 mmol/L HCl 进行滴定至 pH 7.4, 然后加入 3.42 g 蔗糖, 再加水至 1 000 mL, 分装、高压灭菌后即成为匀浆递质, 放 4℃ 冰箱中备用。取冰冻小鼠肝组织, 用冰盐水漂洗, 吸水纸吸干, 称取 0.2 g 放入 5-10 mL 小烧杯中。加入的匀浆递质质量为肝组织块重量 9 倍 (W:V = 1:9)。用滴管取总量 2/3 的匀浆递质移到小烧杯内, 小烧杯置冰水

中, 尽快剪碎组织块并倒入匀浆器中, 用剩余的 1/3 匀浆递质冲洗小烧杯并倒入匀浆管, 再将匀浆器下端插入盛有冰水混合物的烧杯中, 将捣杆垂直充分研磨数 10 次使组织匀浆化, 继以 3 000-4 000 r/min 离心 10-15 min, 轻轻吸取适量上清液进行各种测定。

1.2.5 一般情况观察 精神、活动、饮食、皮毛、体重。

1.2.6 ALT、AST 测定 (赖氏法) 摘眼球取血后, 将血液放置约 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 轻轻吸取上清, 按试剂盒说明以 752 分光光度计比色法测定和计算出相应 ALT 和 AST 的酶活力单位值。

1.2.7 肝组织 MDA 含量的检测 按照说明书步骤, 将样品和各种试剂依次加入试管, 用保鲜膜封闭管口后刺一小孔, 95℃ 水浴 40 min, 取出后流水冷却, 3 500-4 000 rpm 离心 10 min, 取上清, 532 nm 波长、1 cm 光径、蒸馏水调零, 比色法测各管吸光度值, 根据计算公式求出各样本中的 MDA 含量。肝组织匀浆的蛋白含量测定采用双缩脲法。

统计学处理 采用单因素多个均数比较的方差分析统计法, 在作方差齐性检验后, 进行各组数据两两之间的均数比较, 使用 SPSS10.0 统计学软件处理。

2 结果

2.1 一般情况 实验期间正常组动物精神充沛, 活跃灵活, 饮食正常, 皮毛整洁, 无死亡; 其余各组在用药后均有少量死亡 (黄芩甙中剂量和注射剂组各死亡 3 只, 小剂量组和联苯双酯组各死亡 2 只), 以模型组和黄芩甙大剂量组明显 (各死亡 4 只), 同时各组有不同程度的精神萎靡, 活动迟钝, 饮食减少, 皮毛凌乱等表现。实验期间, 黄芩甙中、小剂量及注射剂组和联苯双酯组动物的精神、饮食等整体情况明显优于病理组和黄芩甙大剂量组, 但较正常组稍差。

2.2 各组血清 ALT 及 AST 比较 (表 1) 与空白组比较, 各组的 ALT、AST 和 MDA 均明显高于空白组 ($P < 0.01$), 说明造模成功。黄芩甙大、中、小剂量组以及注射剂组均能显著降低小鼠血清 ALT、AST。根据以上数据比较可知, 黄芩甙有肯定的降低 ALT、AST 作用, 并且不同剂量和不同给药方式的作用效果有一定差别, 黄芩甙中、小剂量同时

表 1 实验末各组小鼠血清 ALT、AST 和 MDA 含量比较 (mean ± SD)

组别	n	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	MDA(nmol/mgprot)
空白对照组	10	349.2 ± 169.5	316.7 ± 223.9	1.98 ± 0.6 ^d
病理模型组	10	4 499.9 ± 334.2 ^b	3 967.6 ± 392.7 ^b	4.66 ± 0.5 ^b
联苯双酯组	12	1 612.8 ± 309.2 ^{bcd}	1 397.6 ± 483.9 ^{bcdg}	2.81 ± 0.3 ^{bcdg}
大剂量组	10	2 321.3 ± 406.2 ^{bcdk}	1 638.5 ± 353.4 ^{bcdg}	2.61 ± 0.3 ^{bdk}
中剂量组	11	1 890.2 ± 467.3 ^{bcdgi}	1 550.3 ± 437.3 ^{bcdg}	2.11 ± 0.4 ^{dghi}
小剂量组	12	1 584.7 ± 399.6 ^{bcdgi}	1 302.9 ± 353.1 ^{bcdg}	2.60 ± 0.5 ^{bdk}
注射剂组	11	2 570.0 ± 406.7 ^{bcdk}	2 186.4 ± 443.9 ^{bcdk}	2.66 ± 0.5 ^{bdk}

^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$; ^d $P < 0.01$ vs 病理模型组; ^e $P < 0.05$; ^f $P < 0.01$ vs 联苯双酯组; ^g $P < 0.05$; ^h $P < 0.01$ vs 注射剂组; ⁱ $P < 0.05$; ^j $P < 0.01$ vs 大剂量组; ^k $P < 0.05$; ^l $P < 0.01$ vs 中剂量组; 未标明则为 $P > 0.05$ 。

降低ALT、AST的作用优于其大剂量和注射剂,并且比较接近目前公认的降转氨酶药联苯双酯。同时,黄芩甙大、中、小剂量组及注射剂和联苯双酯组肝匀浆中的MDA含量均较模型组显著降低,黄芩甙大、小剂量组及注射剂组的肝匀浆MDA含量却低于联苯双酯组,但组间比较无显著差异($P>0.05$),而黄芩甙中剂量组的肝匀浆MDA含量最低,说明其降低肝匀浆MDA含量的作用最佳。

3 讨论

中药黄芩是唇形科植物黄芩的根,主含黄酮类成分,已分离出约40种黄酮,主要有黄芩甙、黄芩素(baicalin)、汉黄芩素(wogonin)等,其中以黄芩甙的含量最丰富。现代药理学研究表明^[2],黄芩可不同程度的抑制花生四烯酸(AA)代谢的多个环节,具有显著的抗炎和抑制多型变态反应的作用;黄芩能改善和调节脂质代谢,具有显著的抗氧化作用,能抑制过氧化脂质的生成,清除自由基;其次,黄芩有较好的保肝、促进胆汁分泌的作用,同时有显著的降压活性,以及解热、利尿、抗癌、镇静、抗病原微生物、解毒等功用。黄芩甙具有黄芩的基本作用,并体现出其更显著的抗氧化、抗病毒、调节免疫、解热、抗感染等药理作用。

刀豆蛋白A(concanavalin A, ConA)是一种在人体内对肝细胞有特异性毒性作用的植物凝集素,是一种能在体外激活T细胞的丝裂原,他进入循环后首先活化肝细胞中的T淋巴细胞,继而激活肿瘤坏死因子(TNF)和白介素2等细胞因子,引发炎症反应,可诱导淋巴细胞、巨噬细胞的细胞毒作用,通过肝细胞凋亡等多种途径损伤肝细胞^[3]。与其他实验动物模型相比,ConA肝损伤模型被认为更加近似的模拟人类病毒性肝炎和自身免疫性肝病等病理过程^[4-5],其病变与人类慢性肝炎非常接近,并且有肝脏特异性和靶向性。

本实验结果显示,模型组较正常组ALT、AST显著升高,统计学比较有显著性差异,结合病理组织学检查,说明ConA所致小鼠肝损伤模型的复制较为成功。黄芩甙大、中、小剂量组以及注射剂组均能显著降低由ConA所致的小鼠血清ALT、AST的升高。黄芩甙中、小剂量降低ALT的作用与联苯双酯较为接近,黄芩甙大剂量与注射剂也有明显的降低ALT的作用,但作用效果不如黄芩甙中、小剂量和联苯双酯组。在降低AST作用方面,黄芩甙大、中、小剂量的作用无明显差异并与联苯双酯较为接近,同时可以肯定的是,黄芩甙注射剂也有明显的降低AST的作用,但效果不如黄芩甙大、中、小剂量和联苯双酯组。由此可知,黄芩甙有肯定的降低ALT、AST作用,并且不同剂量和不同给药方式的作用效果有一定差别,本实验结果提示,黄芩甙中、小剂量同时降低ALT、AST的作用优于其大剂量和注射剂,并且比较接近目前公认的降转氨酶药联苯双酯。

肝组织匀浆中的MDA含量,以黄芩甙大、中、小剂量组及注射剂和联苯双酯组均较模型组显著降低,黄芩甙

中剂量组的肝匀浆MDA含量最低,而黄芩甙大、小剂量组及注射剂组的肝匀浆MDA含量低于联苯双酯组,但组间比较无显著差异,结果提示黄芩甙中剂量组降低肝匀浆MDA含量的作用最佳。

肝细胞是肝脏中数目最丰富和最主要的细胞,也是各种活性氧(reactive oxygen species, ROS)攻击的主要目标,氧自由基的损伤作用是肝炎发生的重要机制之一。机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)引发脂质过氧化反应,生成的脂质过氧化物如:MDA、酮基、羟基、氢过氧基或内过氧基,以及新的氧自由基等,脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂即非自由基性的脂类分解产物,而且通过链式或链式支链式反应放大活性氧作用。肝细胞膜在受损伤的同时可产生大量新的活性氧基团,促发脂质过氧化的链式反应,因此而产生的脂质过氧化物可以损伤肝脏中的各种细胞,故肝细胞膜的脂质过氧化是肝细胞损伤时的主要作用机制之一。脂类分解产物中的一部分是无害的,但一部分能引起细胞代谢及功能障碍甚至细胞死亡。氧自由基不但通过生物膜中的多不饱和脂肪酸(PUFA)的过氧化引起细胞损伤,还能通过脂质过氧化物的分解产物引起细胞损伤。因而测试MDA的含量可反映体内脂质氧化的程度,间接反映出细胞损伤的程度。

以上表明,黄芩甙的不同剂量组和不同剂型组均能降低血清ALT、AST,可以有效降低肝组织匀浆的MDA含量。因此推测,降低转氨酶、抗脂质过氧化,防止过氧化损伤,减少过氧化脂质的生成等可能是黄芩甙抗ConA致肝损伤作用机理的重要方面。

虽然本研究结果证实黄芩甙的抗肝损伤与降酶、抗氧化作用密切相关,但ConA诱导的是典型的T细胞依赖性肝损害,多种细胞因子参与了肝损害病理过程,黄芩甙本身还具有抗炎、抗变态反应、调节免疫、抗病毒、解毒、利胆等药理学作用,黄芩甙抗ConA肝损伤的作用是否也与这些因素有关。因此,黄芩甙的具体和确切的生物学作用还有待于将来做深入研究。

4 参考文献

- 1 赵冬梅,刘耕陶. 双环醇对刀豆蛋白A所致小鼠肝细胞核DNA损伤的保护作用. 中华医学杂志, 2001;81:844-848
- 2 王浴生,邓文龙,薛春生. 中药药理与应用. 第二版. 北京:人民卫生出版社, 1998:972-982
- 3 Ksontini R, Colagiovanni DB, Josephs MD, Edwards CK 3rd, Tannahill CL, Solorzano CC, Norman J, Denham W, Clare-Salzler M, MacKay SL, Moldawer LL. Disparate roles for TNF- α and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 1998;160:4082-4089
- 4 Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995;21:190-198
- 5 Küsters S, Gantner F, Küstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by Concanavalin A. *Gastroenterology* 1996;111:462-471

CA125 在结核性腹膜炎患者中的临床意义

徐美华, 张桂英, 张 鹏

徐美华, 张桂英, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410008
张鹏, 岳阳四化建医院内科 湖南省岳阳市 414000
通讯作者: 徐美华, 410008, 湖南省长沙市开福区湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院消化科, meihuaxu2001@yahoo.com.cn
电话: 0731-4327007 传真: 0731-4327331
收稿日期: 2005-01-21 接受日期: 2005-02-26

摘要

目的: 观察结核性腹膜炎患者血清、腹水中 CA125 浓度及抗结核治疗 2 wk 后血清中 CA125 浓度的变化情况, 探讨 CA125 在结核性腹膜炎中的临床意义。

方法: 结核性腹膜炎患者 31 例, 分别静脉抽血分离血清, 正规四联抗痨治疗 2 wk 后静脉抽血复查; 同天抽取患者腹水送检。应用化学发光方法测定 CA125 浓度, 以 CA125 > 35 ng/L 为阳性。

结果: 31 例结核性腹膜炎患者, 血清中 CA125 阳性率为 100%, 正规四联抗痨治疗前后其血清中 CA125 浓度分别为 375.6 ± 145.9 ng/L、 106.8 ± 64.8 ng/L, 二者相比有显著差异 ($P < 0.05$)。腹水中 CA125 阳性率为 100%, 平均浓度为 398.6 ± 165.2 ng/L。

结论: 结核性腹膜炎患者血清及腹水中 CA125 升高, 提示 CA125 可作为判断结核性腹膜炎的标记物; 正规四联抗痨治疗 2 wk 后血清中 CA125 明显降低, 腹水基本吸收, 提示 CA125 亦可作为判断结核性腹膜炎疗效追踪的指标。

徐美华, 张桂英, 张鹏. CA125 在结核性腹膜炎患者中的临床意义. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1156-1157
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1156.asp>

0 引言

CA125(carbohydrate antigen 125, CA125) 是一种高分子糖蛋白, 主要用于监测卵巢上皮细胞癌。他在多种良恶性疾病, 如肝硬化腹水、自发性细菌性腹膜炎、恶性腹水、结核性腹膜炎等均有升高^[1-4], CA125 可作为检测腹水、甚至观察疗效的一个指标^[5]。我们前瞻性观察结核性腹膜炎患者血清及腹水中 CA125 浓度, 并进一步观察正规四联抗痨治疗后血清 CA125 水平的变化, 探讨 CA125 作为判断结核性腹膜炎的标记物以及作为疗效追踪指标的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选择自 2002-04/2004-10 期间我院住院的 31 例结核性腹膜炎患者, 男 16 例, 女 15 例, 平均年龄 (31.60 ± 8.12) 岁。结核性腹膜炎诊断根据《内科学》

第 5 版诊断标准: 典型病例根据临床症状、体征、腹水常规、其他化验结果及 PPD 皮试强阳性; 或正规四联抗痨治疗(雷米封 0.3 QD, 利福平 0.45 QD, 乙胺丁醇 0.75 QD, 左氧氟沙星 0.2 静滴 Bid) 2 wk 以上有效; 或腹膜病理活检确诊。全部病例检测抗痨治疗 2 wk 前后血清中 CA125 浓度; 因抗痨后腹水基本吸收, 2 wk 后无法腹腔穿刺取得标本复查, 故只检测治疗前腹水 CA125 浓度。

采用美国拜尔公司提供的 Acs180:SE 全自动化化学发光仪, 用化学发光方法测定 CA125 的浓度, 严格按照试剂盒说明进行操作。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 清晨空腹静脉采血 3 mL, 分离血清, 当日检测。抽取腹水后当日送检。

统计学处理 计量资料采用 mean \pm SD 表示; 治疗前后对比采用配对 *t* 检验方法。所有数据均用 SPSS 10.0 统计软件进行。

2 结果

结核性腹膜炎患者治疗前血清及腹水中 CA125 浓度升高的阳性率均为 100%, 结核性腹膜炎患者抗痨治疗前后血清中 CA125 分别为 375.6 ± 145.9 ng/L、 106.8 ± 64.8 ng/L, $P < 0.05$; 腹水中 CA125 平均浓度 398.6 ± 185.2 ng/L。

3 讨论

CA125 是从乳头状浆液性卵巢癌中提取的 OVCA₄₃₃ 抗原, 为不均一的高分子质量 (20-100 ku) 糖蛋白, 由用人类卵巢浆液性囊腺癌细胞给家兔做免疫接种, 通过淋巴细胞杂交获得的单克隆抗体识别而命名^[6]。CA125 可存在于各种胚胎体腔上皮来源的组织中, 如间皮细胞组织等, 以及上述二者组织衍生物所发生的肿瘤包括卵巢上皮癌、输卵管癌等。在正常人血清中 CA125 含量甚微。因其是一种相对分子质量较小的糖蛋白, 一旦上述组织受到炎症刺激或癌变时, 便可释放到浆膜腔液中并进入体循环, 导致血清及浆膜腔液中存在较高水平的 CA125^[7-8]。

CA125 作为肿瘤标记物特别是卵巢癌已被广泛认可, 为一种鉴别良恶性疾病非侵入性检测手段。然而这种肿瘤相关抗原不具有组织或肿瘤的特异性, 国外已有文献报道 CA125 升高同样见于多种良性疾病如妇科子宫内膜异位症、异位妊娠、子宫纤维瘤、良性卵巢囊肿、盆腔炎及结核, 还有肝硬化腹水、自发性细菌性腹膜炎、恶性腹水、心力衰竭等, 特别是结核性腹膜炎患者^[9-11]。

有报道结核性腹膜炎患者血清CA125可作为结核活动及治疗疗效的观察指标^[12-13]。国内外已有报道结核性腹膜炎患者血清、腹水CA125升高,经抗结核治疗后血清CA125浓度的降低^[14-15]。

目前国内结核感染呈上升趋势,而对于结核性腹膜炎尚缺乏准确可靠的诊断指标,特别对于女性患者更容易误诊为妇科恶性疾患^[16-17]。虽然腺苷脱氨酶(ADA)、TB抗体的检测对诊断结核性腹膜炎准确率达90%以上,TB-PCR的准确性亦达到74%,但由于实验条件的限制,广泛开展较少^[18];加之腹水浓缩涂片找抗酸杆菌阳性率极低,因此寻找新的灵敏度高、特异性强的诊断指标显得非常重要。

我们的研究结果显示:结核性腹膜炎患者中血清、腹水中均存在较高水平的CA125,腹水中CA125阳性率达100%,提示临床上CA125检测对于诊断结核性腹膜炎有着重要的意义。本组结核性腹膜炎患者经抗结核治疗2 wk或2 wk以上,复查B超腹水明显减少,不能穿刺抽取腹水复查CA125,但复查血清CA125较前明显下降,提示CA125亦可以作为一项判断抗结核性腹膜炎治疗疗效追踪的观察指标。同时腹水中CA125阳性率达100%,其平均浓度明显升高,伴随着血清中CA125的升高,二者之间存在一定的相关性,提示腹水中的CA125以一定的比例被吸收入血循环导致血清CA125水平升高,推测腹膜间皮组织受到损害时大量CA125释放到腹水中,然后进入血液中,从而导致腹水及血清中CA125水平明显升高,但其升高的机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 张志康,杨建和. 结核性胸水患者治疗前后检测血清 CA125 的临床价值. 临床内科杂志 2001;20:443-444
- 2 汤武亨,陈国光. 肝硬化腹水患者肿瘤抗原 CA125 升高的临床意义. 临床医学 2003;23:13-14
- 3 黄培新,钟敏章,刘恒路,郭传勇. 血清 CA125 检测对肝硬化腹水的诊断价值. 同济大学学报(医学版) 2003;24:409-412
- 4 朱焕兴,杨永青. 血清、腹水中 AFP、CEA 及 CA125 水平对良恶性腹水的诊断价值. 放射免疫学杂志 2003;16:329-330
- 5 刘明涛,韩国宏,吴开春,樊代明. 肝硬化患者血清 CA125 水平变化的临床意义. 现代医学 2004;32:33-34
- 6 杨建和,张蔚华. CA125 在恶性及结核性胸水中鉴别诊断价值的探讨. 医师进修杂志 2000;23:27-28
- 7 张哲,陆文斌. 非妇科疾病胸、腹水患者血清 CA125 水平的测定. 中国实验诊断学 2000;4:233
- 8 王珂,马耀梅,刘文欣,张燮良,李文录. CA125 在女性原发性腹膜癌诊断及监测中的应用. 天津医科大学学报 2001;8:218-220
- 9 Zuckerman E, Lanir A, Sabo E, Rosenvald-Zuckerman T, Matter I, Yeshurun D, Eldar S. Cancer antigen 125: a sensitive marker of ascites in patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1613-1618
- 10 Meden H, Fattahi-Meibodi A. CA 125 in benign gynecological conditions. *Int J Biol Markers* 1998;13:231-237
- 11 陈伟忠,谢渭芬,林勇,周玉坤. CA125 在恶性及结核性腹水中的鉴别诊断意义. 世界华人消化杂志 2002;10:243-244
- 12 Mas MR, Comert B, Saglamkaya U, Yamanel L, Kuzhan O, Ateskan U, Kocabalkan F. CA-125, a new marker for diagnosis and follow-up of patients with tuberculous peritonitis. *Dig Liver Dis* 2000;32:595-597
- 13 Thakur V, Mukherjee U, Kumar K. Elevated serum cancer antigen 125 levels in advanced abdominal tuberculosis. *Med Oncol* 2001;18:289-291
- 14 Wu JF, Li HJ, Lee PI, Ni YH, Yu SC, Chang MH. Tuberculous peritonitis mimicking peritonitis carcinomatosis: a case report. *Eur J Pediatr* 2003;162:853-855
- 15 Piura B, Rabinovich A, Leron E, Yanai-Inbar I, Mazor M. Peritoneal tuberculosis-an uncommon disease that may deceive the gynecologist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:230-234
- 16 Nebhani M, Boumzgou K, Brams S, Laghzaoui M, El Attar H, Bouhya S, Aderdour MA, Iraqi M. Pelvic tuberculosis mimicking bilateral ovarian tumor. A case report. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004;33:145-147
- 17 Li XJ, Wu LY, Li XG, Sun YC. Analysis of 20 cases of pelvic tuberculosis initially suspected of ovarian carcinoma. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi* 2003;26:462-464
- 18 杨建功,秦亦芳,何小峰. CA125 检测对结核性浆膜腔积液的诊断价值. 现代诊断与治疗 2002;13:303-304

编辑 张海宁

胆囊切除术围手术期免放胃管的体会

陈 静, 张德巍

陈静, 张德巍, 中国医科大学附属第四医院普通外科

辽宁省沈阳市 110005

通讯作者: 陈静, 110005, 辽宁省沈阳市和平区南七马路 102 号, 中国医科大学附属第四医院普通外科.

电话: 024-23390457

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-03

摘要

目的: 探讨胆囊切除术胃管应用的必要性和合理性.

方法: 回顾性分析 1995-07/2004-11 胆囊切除术 124 例, 分为置胃管组 64 例, 未置胃管组 60 例, 置胃管组术前常规放置胃管, 未置胃管组术前不放置胃管, 观察两组对术后并发症、术后肛门排气时间、进半流食时间及离床活动时间的影响.

结果: 两组均无切口裂开、肺部感染并发症. 置胃管组与未置胃管组相比术后腹胀、呕吐、切口感染无明显差异($P>0.05$), 术后肛门排气时间及进半流食时间无明显差异($P>0.05$), 恶心明显增多(14 vs 5, $\chi^2 = 4.428$, $P = 0.028$), 离床活动时间明显延迟(3.11 ± 0.75 d vs 1.53 ± 0.34 d, $t = 3.994$, $P = 0.0005$). 置胃管组咽喉疼痛、声嘶明显增多, 未置胃管组无此并发症.

结论: 胆囊切除术前不下胃管并不能增加术后并发症, 不影响术后胃肠功能恢复, 因此安全可行.

陈静, 张德巍. 胆囊切除术围手术期免放胃管的体会. 世界华人消化杂志 2005; 13(9): 1158-1159

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1158.asp>

0 引言

传统观点认为胆囊切除术前应放置胃管, 但放置胃管常常会给患者带来许多不适和痛苦, 有些患者甚至因此拒绝手术. 为了进一步探讨放置胃管对胆囊切除术及患者的影响, 现将我院 1995-07/2004-11 胆囊切除术 124 例作一回顾性分析.

1 材料和方法

1.1 材料 本组 124 例, 男 59 例, 女 69 例, 年龄 31-82 岁, 平均 48.34 ± 16.41 岁. 急性结石性胆囊炎 58 例, 急性非结石性胆囊炎 6 例, 慢性结石性胆囊炎 46 例, 慢性非结石性胆囊炎 5 例, 胆囊息肉 9 例. 急诊胆囊切除 64 例, 择期胆囊切除 60 例, 硬膜外麻醉 81 例, 全麻 43 例. 手术时间 40-150 min, 平均 68.15 ± 18.64 min. 置胃管组 64 例, 未置胃管组 60 例, 两组病例在性别、年龄、诊断、手术方式及手术时间等均无明显差别($P>0.05$).

1.2 方法 置胃管组术晨常规放置胃管, 术后持续胃肠减压至肛门排气时拔管, 拔管时间 1-5 d, 平均 3.1 d. 未置胃管组术晨不下胃管.

统计学处理 采用 SPSS12.0 分析软件, 对计数资料采用 χ^2 检验, 对计量资料采用 t 检验. $P<0.05$ 被认定有统计学差异.

2 结果

2.1 术后并发症 腹胀: 置胃管组 9 例, 未置胃管组 11 例 ($P>0.05$). 恶心: 置胃管组 14 例, 未置胃管组 5 例 ($\chi^2 = 4.428$, $P = 0.028<0.05$). 呕吐: 置胃管组 2 例, 未置胃管组 3 例 ($P>0.05$). 切口感染: 置胃管组 3 例, 未置胃管组 3 例 ($P>0.05$). 两组均无切口裂开、肺部感染并发症. 置胃管组置胃管本身带来的咽喉疼痛 50 例, 声嘶 5 例, 未置胃管组无此并发症, 置胃管患者均因胃管对鼻咽部刺激而感到不适, 影响睡眠.

2.2 术后肛门排气时间、进半流食时间及离床活动时间 术后肛门排气时间: 置胃管组 72.30 ± 15.18 h, 未置胃管组 70.94 ± 13.52 h ($P>0.05$). 进半流食时间: 置胃管组 5.12 ± 0.45 d, 未置胃管组 4.98 ± 0.51 d ($P>0.05$). 离床活动时间: 置胃管组 3.11 ± 0.75 d, 未置胃管组 1.53 ± 0.34 d ($t = 3.994$, $P = 0.0005<0.05$).

3 讨论

腹部手术常规放置胃管一直被临床普遍采用, 大部分外科医生认为放置胃管有利于手术视野的暴露, 减少术后并发症如恶心、呕吐、误吸和吻合口漏等^[1]. 但随着外科技术的不断提高, 近年来国内外许多作者对腹部手术常规放置胃管提出异议, 并认为剖腹术后常规放置胃管与不放胃管相比在术后吻合口漏、切口感染、胃肠功能恢复及住院时间上无明显差异^[2-6], 不放置胃管能够减少术后发热及肺部并发症, 加快胃肠功能恢复, 使患者更舒适, 减少痛苦^[7-11], 而留置胃管能够增加咽痛和恶心, 增加胃肠反流^[12], 增加肺部并发症及术后发热^[13-14], Chung *et al*^[15]报道胃癌根治术后放置胃管主要表现在咽痛和对睡眠的影响, 并建议在手术麻醉时放置胃管, 术后如无出血等并发症可立即拔除胃管. 本研究显示两组患者术后均无切口裂开及肺部感染并发症, 患者发生呕吐和切口感染者相似, 无统计学意义, 表明胆囊切除术后不置胃管并不能增加术后切口裂开、切口感染、肺部感染及呕吐并发症. 两组术后腹胀均较多但多为轻中度, 置胃管者比不置胃管者略多, 但无统计学意义, 考虑腹胀是由于开

腹术中腹部脏器的暴露,手术创伤及麻醉等造成术后近期胃肠蠕动减弱甚至消失,但胆囊切除手术范围小,对胃肠道刺激小,术后胃肠功能恢复快,两组病例均经术后早期活动及腹部热敷或口服胃肠动力药物后缓解.两组患者肛门排气时间和进半流食时间相似,无统计学意义,表明不置胃管并不能延迟胃肠功能恢复.与胃管直接有关的并发症如恶心、咽喉疼痛、声嘶等在置胃管组发生率较高,主要是留置胃管时对咽喉的刺激造成.另外由于携带胃管的不便使置胃管组术后离床活动时间明显晚于不置胃管组.

我们的资料表明胆囊切除术不留置胃管并不增加手术后并发症,相反留置胃管可导致咽喉疼痛,声嘶、恶心、影响睡眠等副作用,甚至引起患者畏惧手术、拒绝手术等.因此我们认为对于胆囊炎症较轻的病例行胆囊切除术不放置胃管是安全可行的,但对于胆囊炎症重、有腹膜炎体征、手术创伤范围较大的病例行胆囊切除术不放胃管应持谨慎态度.

4 参考文献

- 1 Soybel DI. Nasogastric decompression following laparotomy. *Gastroenterology* 1996;110:645-646
- 2 Lee JH, Hyung WJ, Noh SH. Comparison of gastric cancer surgery with versus without nasogastric decompression. *Yonsei Med J* 2002;43:451-456
- 3 Inman BA, Harel F, Tiguert R, Lacombe L, Frasset Y. Routine nasogastric tubes are not required following cystectomy with urinary diversion: a comparative analysis of 430 patients. *J Urol* 2003;170:1888-1891
- 4 Huerta S, Arteaga JR, Sawicki MP, Liu CD, Livingston EH. Assessment of routine elimination of postoperative nasogastric decompression after Roux-en-Y gastric bypass. *Surgery* 2002;132:844-848
- 5 Sands DR, Wexner SD. Nasogastric tubes and dietary advancement after laparoscopic and open colorectal surgery. *Nutrition* 1999;15:347-350
- 6 张连新. 择期剖腹手术后免插胃管的临床研究. *中国医师杂志* 2002;4:23-24
- 7 Yoo CH, Son BH, Han WK, Pae WK. Nasogastric decompression is not necessary in operations for gastric cancer: prospective randomised trial. *Eur J Surg* 2002;168:379-383
- 8 Akbaba S, Kayaalp C, Savkilioglu M. Nasogastric decompression after total gastrectomy. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1881-1885
- 9 Nelson R, Edwards S, Tse B. Prophylactic nasogastric decompression after abdominal surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;25:CD004929
- 10 Feo CV, Romanini B, Sortini D, Ragazzi R, Zamboni P, Pansini GC, Liboni A. Early oral feeding after colorectal resection: a randomized controlled study. *ANZ J Surg* 2004;74:298-301
- 11 Gouzi JL, Moran B. Nasogastric tubes after elective abdominal surgery is not justified. *J Chir (Paris)* 1998;135:273-274
- 12 Manning BJ, Winter DC, McGreal G, Kirwan WO, Redmond HP. Nasogastric intubation causes gastroesophageal reflux in patients undergoing elective laparotomy. *Surgery* 2001;130:788-791
- 13 Schwartz CI, Heyman AS, Rao AC. Prophylactic nasogastric tube decompression: is its use justified? *South Med J* 1995;88:825-830
- 14 Nathan BN, Pain JA. Nasogastric suction after elective abdominal surgery: a randomised study. *Ann R Coll Surg Engl* 1991;73:291-294
- 15 Chung HY, Yu W. Reevaluation of routine gastrointestinal decompression after gastrectomy for gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1190-1192

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

胆胰和胃与养胃冲剂治疗幽门螺杆菌相关性慢性胃炎的组织病理学观察

闫素珍, 白洁, 史美瑗, 赵利, 王文鸽, 袁楠, 王哲平, 王翠云

■素珍, 白洁, 史美瑗, 赵利, 王文鸽, 袁楠, 王哲平, 王翠云, 华北煤炭医学院附属开滦医院中西医结合肝胆科, 河北省唐山市 063000

通讯作者: 闫素珍, 063000, 河北省唐山市新华东道 57 号, 华北煤炭医学院附属开滦医院中西医结合肝胆科. ysz@domain.com
电话: 0315-3025921 传真电话: 0315-2820311
收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-03-22

摘要

目的: 研究胆胰和胃冲剂对幽门螺杆菌(*H pylori*)相关性慢性胃炎的组织学治疗效果.

方法: 100 例 *H pylori* 感染的慢性胃炎随机分为治疗组和对

照组, 治疗组 54 例, 予胆胰和胃冲剂治疗; 对照组 46 例, 予养胃冲剂治疗, 疗程均为 1 mo. 治疗前及治疗结束后 1 wk 内做胃镜, 行疗效判定.

结果: 治疗组和对照组的症状有效率分别为 94.4% 和 80.4%; 胃镜有效率为 96.3% 和 69.6%; 病理有效率为 88.9% 和 65.2%, *H pylori* 根除率为 83.3% 和 50.0%, 统计学分析两组差异有显著性($P < 0.05$).

结论: 胆胰和胃冲剂治疗慢性胃炎有较好的疗效.

腹术中腹部脏器的暴露,手术创伤及麻醉等造成术后近期胃肠蠕动减弱甚至消失,但胆囊切除手术范围小,对胃肠道刺激小,术后胃肠功能恢复快,两组病例均经术后早期活动及腹部热敷或口服胃肠动力药物后缓解.两组患者肛门排气时间和进半流食时间相似,无统计学意义,表明不置胃管并不能延迟胃肠功能恢复.与胃管直接有关的并发症如恶心、咽喉疼痛、声嘶等在置胃管组发生率较高,主要是留置胃管时对咽喉的刺激造成.另外由于携带胃管的不便使置胃管组术后离床活动时间明显晚于不置胃管组.

我们的资料表明胆囊切除术不留置胃管并不增加手术后并发症,相反留置胃管可导致咽喉疼痛,声嘶、恶心、影响睡眠等副作用,甚至引起患者畏惧手术、拒绝手术等.因此我们认为对于胆囊炎症较轻的病例行胆囊切除术不放置胃管是安全可行的,但对于胆囊炎症重、有腹膜炎体征、手术创伤范围较大的病例行胆囊切除术不放胃管应持谨慎态度.

4 参考文献

- 1 Soybel DI. Nasogastric decompression following laparotomy. *Gastroenterology* 1996;110:645-646
- 2 Lee JH, Hyung WJ, Noh SH. Comparison of gastric cancer surgery with versus without nasogastric decompression. *Yonsei Med J* 2002;43:451-456
- 3 Inman BA, Harel F, Tiguert R, Lacombe L, Frasset Y. Routine nasogastric tubes are not required following cystectomy with urinary diversion: a comparative analysis of 430 patients. *J Urol* 2003;170:1888-1891
- 4 Huerta S, Arteaga JR, Sawicki MP, Liu CD, Livingston EH. Assessment of routine elimination of postoperative nasogastric decompression after Roux-en-Y gastric bypass. *Surgery* 2002;132:844-848
- 5 Sands DR, Wexner SD. Nasogastric tubes and dietary advancement after laparoscopic and open colorectal surgery. *Nutrition* 1999;15:347-350
- 6 张连新. 择期剖腹手术后免插胃管的临床研究. *中国医师杂志* 2002;4:23-24
- 7 Yoo CH, Son BH, Han WK, Pae WK. Nasogastric decompression is not necessary in operations for gastric cancer: prospective randomised trial. *Eur J Surg* 2002;168:379-383
- 8 Akbaba S, Kayaalp C, Savkilioglu M. Nasogastric decompression after total gastrectomy. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1881-1885
- 9 Nelson R, Edwards S, Tse B. Prophylactic nasogastric decompression after abdominal surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;25:CD004929
- 10 Feo CV, Romanini B, Sortini D, Ragazzi R, Zamboni P, Pansini GC, Liboni A. Early oral feeding after colorectal resection: a randomized controlled study. *ANZ J Surg* 2004;74:298-301
- 11 Gouzi JL, Moran B. Nasogastric tubes after elective abdominal surgery is not justified. *J Chir (Paris)* 1998;135:273-274
- 12 Manning BJ, Winter DC, McGreal G, Kirwan WO, Redmond HP. Nasogastric intubation causes gastroesophageal reflux in patients undergoing elective laparotomy. *Surgery* 2001;130:788-791
- 13 Schwartz CI, Heyman AS, Rao AC. Prophylactic nasogastric tube decompression: is its use justified? *South Med J* 1995;88:825-830
- 14 Nathan BN, Pain JA. Nasogastric suction after elective abdominal surgery: a randomised study. *Ann R Coll Surg Engl* 1991;73:291-294
- 15 Chung HY, Yu W. Reevaluation of routine gastrointestinal decompression after gastrectomy for gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1190-1192

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

胆胰和胃与养胃冲剂治疗幽门螺杆菌相关性慢性胃炎的组织病理学观察

闫素珍, 白洁, 史美瑗, 赵利, 王文鸽, 袁楠, 王哲平, 王翠云

■素珍, 白洁, 史美瑗, 赵利, 王文鸽, 袁楠, 王哲平, 王翠云, 华北煤炭医学院附属开滦医院中西医结合肝胆科, 河北省唐山市 063000

通讯作者: 闫素珍, 063000, 河北省唐山市新华东道 57 号, 华北煤炭医学院附属开滦医院中西医结合肝胆科. ysz@domain.com
电话: 0315-3025921 传真电话: 0315-2820311
收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-03-22

摘要

目的: 研究胆胰和胃冲剂对幽门螺杆菌(*H pylori*)相关性慢性胃炎的组织学治疗效果.

方法: 100 例 *H pylori* 感染的慢性胃炎随机分为治疗组和对

照组, 治疗组 54 例, 予胆胰和胃冲剂治疗; 对照组 46 例, 予养胃冲剂治疗, 疗程均为 1 mo. 治疗前及治疗结束后 1 wk 内做胃镜, 行疗效判定.

结果: 治疗组和对照组的症状有效率分别为 94.4% 和 80.4%; 胃镜有效率为 96.3% 和 69.6%; 病理有效率为 88.9% 和 65.2%, *H pylori* 根除率为 83.3% 和 50.0%, 统计学分析两组差异有显著性($P < 0.05$).

结论: 胆胰和胃冲剂治疗慢性胃炎有较好的疗效.

闫素珍, 白洁, 史美媛, 赵利, 王文鸽, 袁楠, 王哲平, 王翠云. 胆胰和胃与养胃冲剂治疗 HP 相关性慢性胃炎的组织病理学观察. 世界华人消化杂志 2005; 13(9):1159-1161
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1159.asp>

0 引言

近年来我们应用胆胰和胃冲剂治疗慢性胃炎在改善临床症状方面取得了满意疗效, 在此基础上进一步从内镜下、病理组织学方面进行对照观察, 现报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例选择 经门诊对有上腹痛、泛酸、嗝气、上腹胀满等上消化道症状者, 经胃镜胃黏膜活检组织快速尿素酶试验及病理学检查证实为 *H pylori* 阳性之慢性胃炎患者 100 例, 符合 2000-05 全国慢性胃炎研讨会共识意见慢性胃炎的诊断标准^[1]. 排除标准: (1) 消化性溃疡患者; (2) 胃癌、手术史、严重并发症患者; (3) 有明显心、肝、肾功能不全患者; (4) 长期服用胃黏膜保护剂或正在服用非甾体类抗炎药及皮质激素类药物者. 所有患者按就医顺序随机分为治疗组 (54 例)、对照组 (46 例), 两组患者的性别、年龄、临床主要症状、内镜和病理诊断, 经统计学分析均无显著性差异 ($P>0.05$) 具有可比性.

1.1.2 仪器与药物 纤维胃镜: 日本 OLYMPUS-XQ20; 光学显微镜: 日本产 OLYMPUS-CH2; 胆胰和胃冲剂: 由唐山市凤山制药厂加工生产, 制作工艺按国家药典规定中药冲剂质量标准. 养胃冲剂: 正大青春宝药业有限公司生产.

1.2 方法 治疗组以胆胰和胃冲剂 (20 g/袋) 餐前服用 3 次/d; 对照组以养胃冲剂 (20 g/袋) 餐前服用, 3 次/d, 疗程均为 1 mo, 治疗期间不加服其他药物. 两组治疗结束后 1 wk 内复查胃镜、胃黏膜组织活检及检测 *H pylori*. 观察 *H pylori* 根除情况、临床症状、内镜和胃黏膜病理的疗效.

1.2.1 *H pylori* 诊断标准和内镜下、病理组织学诊断标准 *H pylori* 诊断标准: 做 1 min 尿素酶试验, 阳性者行病理切片 HE 染色, 找到 *H pylori* 者定为感染阳性. 内镜诊断标准: 轻度: 局部炎症、充血、水肿、少量渗出; 中度: 局部炎症、中度糜烂、渗出; 重度: 局部炎症、重度糜烂、渗出. 病理组织学诊断标准: 根据悉尼系统做胃黏膜的组织学分型. (1) 慢性炎症: 轻度: 慢性炎症细胞较少并局限于黏膜浅层, 不超过黏膜层的 1/3; 中度: 超过黏膜层的 1/3 达到 2/3; 重度: 占据黏膜全层. (2) 活动性炎症: 在慢性炎症基础上有中性粒细胞浸润. (3) 萎缩: 胃的固有腺体数减少. 轻度: 固有腺体数减少不超过原有腺体的 1/3; 中度: 1/3-2/3; 重度: 超过 2/3, 仅残留少数腺体, 甚至完全消失. (4) 肠化: 黏膜有无肠腺化生. 轻度: 肠化部分占腺体和表面上皮总面积的 1/3 以下; 中度: 1/3-2/3; 重度: 2/3 以上.

1.2.2 疗效判定标准 参照文献[2] *H pylori* 根除: 复查时尿素酶试验及病理学检查均为阴性则判定为 *H pylori* 根除. 症状疗效标准: 症状全部消失为临床治愈; 2-3 项主要症状消失为显效; 症状减少或减轻为有效; 症状无变化或加重为无效. 内镜疗效标准: 胃黏膜基本正常为临床治愈; 胃黏膜糜烂及出血消失, 充血减轻, 炎症范围明显缩小为显效; 炎症范围缩小或减轻为有效; 胃镜所见无变化或加重为无效. 病理组织学疗效标准: 5 处取材部位的病理均明显进步为痊愈; 3-4 处进步为显效; 1-2 处进步为有效; 5 处均无进步或加重为无效.

统计学处理 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用 t 检验.

2 结果

2.1 *H pylori* 根除情况比较 治疗组和对照组根除率分别为 83.3% (45/54) 和 50.0% (23/46), 治疗组根除率高于对照组. 统计学分析两组差异有显著性 ($P<0.05$).

2.2 治疗后主要症状改善情况 治疗后患者的临床症状均有所改善, 但治疗组优于对照组, 两组比较有统计学意义, ($P<0.05$ 表 1).

表1 治疗后两组主要症状比较(n, %)

组别	n	治愈	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	54	26(48.1)	17(31.5)	8(14.8)	3(5.6)	51(94.4)
对照组	46	13(28.3)	17(37.0)	14(30.4)	9(19.6)	37(80.4)

$\chi^2 = 4.62, P<0.05$.

2.3 治疗后内镜疗效 患者治疗后, 内镜下疗效观察, 治疗组总有效率明显高于对照组 ($P<0.01$, 表 2).

表2 两组患者治疗后内镜疗效比较(n, %)

组别	n	治愈	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	54	28(51.9)	18(33.3)	6(11.1)	2(3.7)	52(96.3)
对照组	46	10(21.7)	11(23.9)	11(23.9)	14(30.4)	32(69.6) ^b

$\chi^2 = 13.21, ^bP<0.01$.

2.4 治疗后病理组织学比较 所有患者经过治疗, 病理组织学疗效治疗组明显优于对照组, 总有效率相比具有显著性差异 ($P<0.01$, 表 3).

表3 两组病理组织学疗效比较(n, %)

组别	n	治愈	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	54	8(14.0)	15(27.8)	25(46.3)	6(11.1)	48(88.9)
对照组	46	4(8.7)	6(13.0)	20(40.8)	16(34.8)	30(65.2) ^b

$\chi^2 = 8.11, ^bP<0.01$.

3 讨论

慢性胃炎是临床常见病多发病,系各种原因所致的胃黏膜炎性病变,目前 *H pylori* 感染已被公认为是慢性胃炎的主要原因之一, *H pylori* 可引起胃黏膜氧自由基水平升高,是造成胃黏膜损伤的重要机理之一^[3]. 西药治疗慢性胃炎,主要是铋剂或质子泵抑制剂加两种抗生素联合应用,但疗效并不理想,且有一定副作用,停药后易复发,在中医本病属胃脘痛,多由饮食不节、情志所伤,或由脾胃素虚兼夹外邪,导致脾胃升降失调,气机紊乱而造成的本虚标实之证,中药治疗慢性胃炎的药物甚多,但从整体调节,标本兼治的药物甚少. 胆胰和胃冲剂的研制,考虑到中医的胃脘痛包括临床上常见的胆囊炎、胃炎和胰腺炎,胆囊、胃、胰腺是机体消化系统的重要“功能单位”,是脏腑中主疏泄、传水谷的主要组成部分,他们之间相互影响,互为因果,构成复杂的病理生理关系,因此不但重视了胃脘痛既有少阳之邪,又有阳明之实的特点,而且兼顾了异病同源、互为因果、异病同治的原则. 在大柴胡汤的基础上调整组方,其主要成分为:柴胡、黄连、黄芩、大黄、香附、枳壳、陈皮、郁金、元胡、木香等. 胆胰和胃冲剂组方集中体现了活血化淤,疏肝理气,利胆清热,健脾和胃等多种效用^[4]. 其中柴胡具有解除胃肠道痉挛,抑制胃酸分泌,提高组织抗缺血的能力,又有预防应激性溃疡的作用,同时对机体免疫有增强作用^[5]. 黄芩、黄连有清热、解毒,有抗 *H pylori* 的作用^[6]. 大黄破积滞、行淤血、实验证明提取液有增加胃黏膜血流量,改善缺血、缺氧状态,有利于胃肠黏膜损伤的恢复,并对 *H pylori* 的根治率达 90%^[7]. 陈皮、枳壳宽胸畅膈、和胃降逆. 元胡、木香有行气、止痛作用. 郁金清气化

痰、散淤血之药,其性轻扬,能散郁滞,顺逆气,故治胸胃膈痛,两肋胀满,饮食不思等症. 甘草调和诸药,补中益气,现代研究表明其主要成分为生胃酮,有保护胃黏膜屏障的作用^[8]. 已有的研究表明,胆胰和胃冲剂有提高机体免疫力,减少炎症递质的释放^[9],改善胃肠黏膜血流,缓解组织缺血、缺氧状态,可明显增强胃黏膜氧自由基的清除能力,减轻氧自由基对胃黏膜的损害,增强组织的抗损伤能力^[10]. 我们采用对照方法,与养胃冲剂对比,胆胰和胃冲剂治疗 *H pylori* 相关性慢性胃炎,在临床症状、内镜改变及病理组织学方面均有较好的治疗效果,并且对 *H pylori* 有更好根除作用,统计学上有显著性差异. 进一步验证了此药在临床上的有效性和实用性,同时也表明中药治疗慢性胃炎的方法值得深入研究.

4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会.《全国慢性胃炎研讨会共识意见》. 中华消化杂志 2002;20:199-201
- 2 国家中药管理局. 中医病证诊断疗效标准. 南京: 南京大学出版社, 1994:79-80
- 3 李涛, 王秀玲. 氧自由基与胃肠疾病研究进展. 国外医学. 消化系统疾病分册 1997;17:204-205
- 4 郭振武. 胆胰和胃冲剂的研制与临床. 实用胆囊外科. 天津: 天津科技出版社, 1996:183-186
- 5 史青, 聂淑琴, 黄璐琦. 柴胡属植物化学成分及药理研究新进展. 中国实验方剂学杂志 2002;8:53
- 6 毕玉环. 黄芩的药理和临床应用. 中级医刊 1998;33:53-54
- 7 瞿佐发. 大黄的药理作用及临床应用. 陕西中医 2002;23:552-553
- 8 郭振武, 邓茂君, 安新, 史美媛, 孙树山. 胆胰和胃冲剂治疗胃脘痛病 609 例观察. 综合临床医学 1993;9:265-267
- 9 曹立瀛, 刘四清, 王保强, 李勇, 郭振武. 胆胰和胃冲剂对大鼠急性胰腺炎早期小肠黏膜抗氧化损伤的保护. 中国中西医结合外科杂志 2002;8:150-152
- 10 安新, 郭振武. 胆胰和胃冲剂抗自由基损害的临床观察. 中国中西医结合外科杂志 2000;6:247-248

编辑 张海宁

- 3 Katz HI, Waalen J, Leach EE. Acitretin in psoriasis: an overview of adverse effects. *J Am Acad Dermatol* 1999;41(3 Pt2): S7-S12
- 4 Roenigk HH Jr. Liver toxicity of retinoid therapy. *J Am Acad Dermatol* 1988;19(1Pt2):199-208
- 5 Ellis CN, Voorhees JJ. Etretnate therapy. *J Am Acad Dermatol* 1987;16(2 Pt1):267-291
- 6 Kreiss C, Amin S, Nalesnik MA, Chopra K, Shakil AO. Sever cholestatic hepatitis in a patient taking acitretin. *Am J Gastroenterol* 2002;97:775-777
- 7 McClure SL, Valentine J, Gordon KB. Comparative tolerability of systemic treatments for plaque-type psoriasis. *Drug Saf* 2002;25:913-927
- 8 Camuto P, Shupack J, Orbuch P, Tobias H, Sidhu G, Feiner H. Long-term effects of etretinate on the liver in psoriasis. *Am J Surg Pathol* 1987;11:30-37

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊, 2003 年度中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 24 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

《世界华人消化杂志》、《世界胃肠病学杂志(英文版)》 变更刊期获得批复

本刊讯 山西省新闻出版局于 2005-02-18 及 2005-02-25 发布文件, 分别批准《世界胃肠病学杂志(英文版)》、《世界华人消化杂志》变更刊期.

根据晋新出报刊发[2005]5 号文件, 《世界胃肠病学杂志(英文版)》自 2005-01-01 起改为周刊发行, 每月 7、14、21、28 日出版.

根据晋新出报刊发[2005]15 号文件, 《世界华人消化杂志》自 2005-01-01 起改为半月刊发行, 每月 1、15 日出版.

2005 上海国际胃肠病学学术会议通知

本刊讯 由上海第二医科大学附属仁济医院、上海市消化疾病研究所和美国 Johns Hopkins 大学胃肠科主办的 2005 上海国际胃肠病学学术会议定于 2005-07-07/2005-07-09 在上海国际会议中心举行. 本次会议使用的语言为英语, 配有同声翻译.

1 投稿内容

胃食管反流病和 Barrett 食管、炎症性肠病、胃肠道肿瘤和肝细胞癌、幽门螺杆菌及其相关性疾病、脂肪肝、慢性肝炎和门静脉高压、胰腺疾病等.

2 议秘书处

上海市消化疾病研究所, 上海市山东中路 145 号, 邮编 200001, 电话: 021-63200874, 传真: 021-63266027, Email: cjge@shl63.net

欢迎消化科、外科、肿瘤科、放射科、病理科及其他相关学科医师踊跃报名参加会议.

• 病例报告 •

阿维A致严重肝损害1例

吕世超, 梁淑文, 刘加全, 刘军连, 赵梓纲

吕世超, 刘军连, 赵梓纲, 中国人民解放军第306医院皮肤科
北京市 100101
梁淑文, 中国人民解放军第306医院消化科 北京市 100101
刘加全, 山东省诸城市皮肤病防治所 山东省诸城市 262200
通讯作者: 吕世超, 100101, 北京市朝阳区德外大街安翔北里9号, 中国人民解放军第306医院皮肤科. lvshichao@sina.com
电话: 010-66356984
收稿日期: 2005-03-18 接受日期: 2005-04-08

摘要

报告1例阿维A(Acitretnin)治疗银屑病时致严重肝损害的极少见病例, 并复习了国内外相关文献. 尽管阿维A的肝损害较少见且轻微, 但对具有特异性体质的患者来说, 可能会引起严重肝损害. 因此, 在应用该药时, 应定期进行肝功能监测, 特别是对具有危险因素的患者更要重视.

吕世超, 梁淑文, 刘加全, 刘军连, 赵梓纲. 阿维A致严重肝损害1例. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1162-1163
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1162.asp

1 病例报告

患者, 男性, 50岁. 因患银屑病20 a, 来皮肤科门诊就诊. 给予阿维A(重庆华邦制药厂生产)每天30 mg随午餐顿服, 1 wk后剂量增加到40 mg. 患者治疗前肝功正常. 治疗20 d时自觉乏力, 纳差, 厌油腻, 腹胀, 肝区不适再次就诊. 既往无肝炎患者接触及肝病史, 无其他系统疾病史, 无药物过敏史, 无嗜酒史. 查体: 体重: 75 KG, 体温正常. 皮肤、巩膜无黄染, 浅表淋巴结无肿大, 无肝掌及蜘蛛痣, 心、肺未见阳性体征. 腹平软, 无腹部静脉曲张, 无压痛, 肝脾肋下未触及, 莫菲氏征阴性, 肝区无叩痛, 移动性浊音阴性. 实验室检查: ALT 13 936.1 nkat/L, AST 14 452.9 nkat/L, ALP、GGT、胆红素轻度升高. 甲、乙、丙、戊型肝炎抗体均阴性, 抗核抗体、抗平滑肌抗体阴性, 血浆铜蓝蛋白正常, 尿胆红素土, 尿胆原

+. 腹部B超轻度脂肪肝. 诊断为药物性肝损害. 立即停用阿维A, 积极给予保肝治疗. 4 d后复查肝功能好转, 2 wk后基本正常(表1).

2 讨论

阿维A治疗重症银屑病已有10余年历史, 治疗效果良好. 常见的副作用有: 皮肤黏膜的改变、血脂代谢异常、骨骼系统损害、致畸等. 肝损害不常见. 国内报道其引起ALT轻度升高发生率为10-20%左右^[1-2], 未见引起严重肝损害的报道. 美国的临床资料发现肝功各项指标升高的患者约占阿维A治疗银屑病患者的1/3, 其中3.8%的患者高于正常值, 罕见引起严重的肝损伤^[3-5]. 但最近国外报道了首例口服阿维A治疗银屑病引起严重胆汁郁积肝炎的病例^[6]. 我们报告病例的病史、临床表现、化实验室检查、治疗效果支持药物性肝炎的诊断.

阿维A引起ALT、AST异常较LDH、ALP更常见^[7], 既往肝炎病史、糖尿病、肥胖、嗜酒是维甲酸类药物导致肝损伤的危险因素^[3, 8]. 国外学者认为, 当肝功异常指标超过正常值3倍时, 应停用阿维A; 当超过正常值而小于3倍时, 应减少阿维A的剂量^[7]. 出现药物性肝炎后除采取停药或减量措施外, 还应使用保肝药物, 对于严重患者, 必要时考虑使用激素治疗. 阿维A引起药物性肝炎的机理不清楚, 可能和特异性体质有关^[6].

根据本例经验和国内外相关报道, 我们认为应用阿维A治疗重症银屑病时, 治疗前及治疗后每2 wk应做肝功能检查, 特别是对具有危险因素的患者更要重视肝功能检查.

3 参考文献

- 1 陈晴燕, 黄精华, 张欣, 梁秀宇, 杜阳. 阿维A治疗银屑病89例临床副作用分析. 临床皮肤科杂志 2002;31:436-437
- 2 王家璧, 马东来, 黄精华, 连石. 阿维A治疗严重银屑病32例. 中华皮肤科杂志 2001;34:410

表1 口服阿维A前后肝功能变化

项目	治疗前	治疗后					
		13 d	20 d	24 d	26 d	30 d	34 d
AST(nkat/L)	550.1	550.1	13 936.1	12 269.1	3 750.8	1 033.5	583.5
ALT(nkat/L)	466.8	533.4	14 452.9	13 639.4	5 101.0	983.5	633.5
ALP(nkat/L)	800.2	966.9	2 183.8	2 001.6	1 650.3	1 366.9	733.5
GGT(nkat/L)	216.7	200.0	1 016.9	983.5	700.1	383.4	450.1
TBIL(μmol)	11.0	16.8	26.6	22.4	19.1	17.1	12.3
DBIL(μmol)	4.3	5.4	10.8	8.6	7.7	6.9	4.0

- 3 Katz HI, Waalen J, Leach EE. Acitretin in psoriasis: an overview of adverse effects. *J Am Acad Dermatol* 1999;41(3 Pt2): S7-S12
- 4 Roenigk HH Jr. Liver toxicity of retinoid therapy. *J Am Acad Dermatol* 1988;19(1Pt2):199-208
- 5 Ellis CN, Voorhees JJ. Etretnate therapy. *J Am Acad Dermatol* 1987;16(2 Pt1):267-291
- 6 Kreiss C, Amin S, Nalesnik MA, Chopra K, Shakil AO. Sever cholestatic hepatitis in a patient taking acitretin. *Am J Gastroenterol* 2002;97:775-777
- 7 McClure SL, Valentine J, Gordon KB. Comparative tolerability of systemic treatments for plaque-type psoriasis. *Drug Saf* 2002;25:913-927
- 8 Camuto P, Shupack J, Orbuch P, Tobias H, Sidhu G, Feiner H. Long-term effects of etretinate on the liver in psoriasis. *Am J Surg Pathol* 1987;11:30-37

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊, 2003 年度中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 24 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

《世界华人消化杂志》、《世界胃肠病学杂志(英文版)》 变更刊期获得批复

本刊讯 山西省新闻出版局于 2005-02-18 及 2005-02-25 发布文件, 分别批准《世界胃肠病学杂志(英文版)》、《世界华人消化杂志》变更刊期.

根据晋新出报刊发[2005]5 号文件, 《世界胃肠病学杂志(英文版)》自 2005-01-01 起改为周刊发行, 每月 7、14、21、28 日出版.

根据晋新出报刊发[2005]15 号文件, 《世界华人消化杂志》自 2005-01-01 起改为半月刊发行, 每月 1、15 日出版.

2005 上海国际胃肠病学学术会议通知

本刊讯 由上海第二医科大学附属仁济医院、上海市消化疾病研究所和美国 Johns Hopkins 大学胃肠科主办的 2005 上海国际胃肠病学学术会议定于 2005-07-07/2005-07-09 在上海国际会议中心举行. 本次会议使用的语言为英语, 配有同声翻译.

1 投稿内容

胃食管反流病和 Barrett 食管、炎症性肠病、胃肠道肿瘤和肝细胞癌、幽门螺杆菌及其相关性疾病、脂肪肝、慢性肝炎和门静脉高压、胰腺疾病等.

2 议秘书处

上海市消化疾病研究所, 上海市山东中路 145 号, 邮编 200001, 电话: 021-63200874, 传真: 021-63266027, Email: cjge@shl63.net

欢迎消化科、外科、肿瘤科、放射科、病理科及其他相关学科医师踊跃报名参加会议.