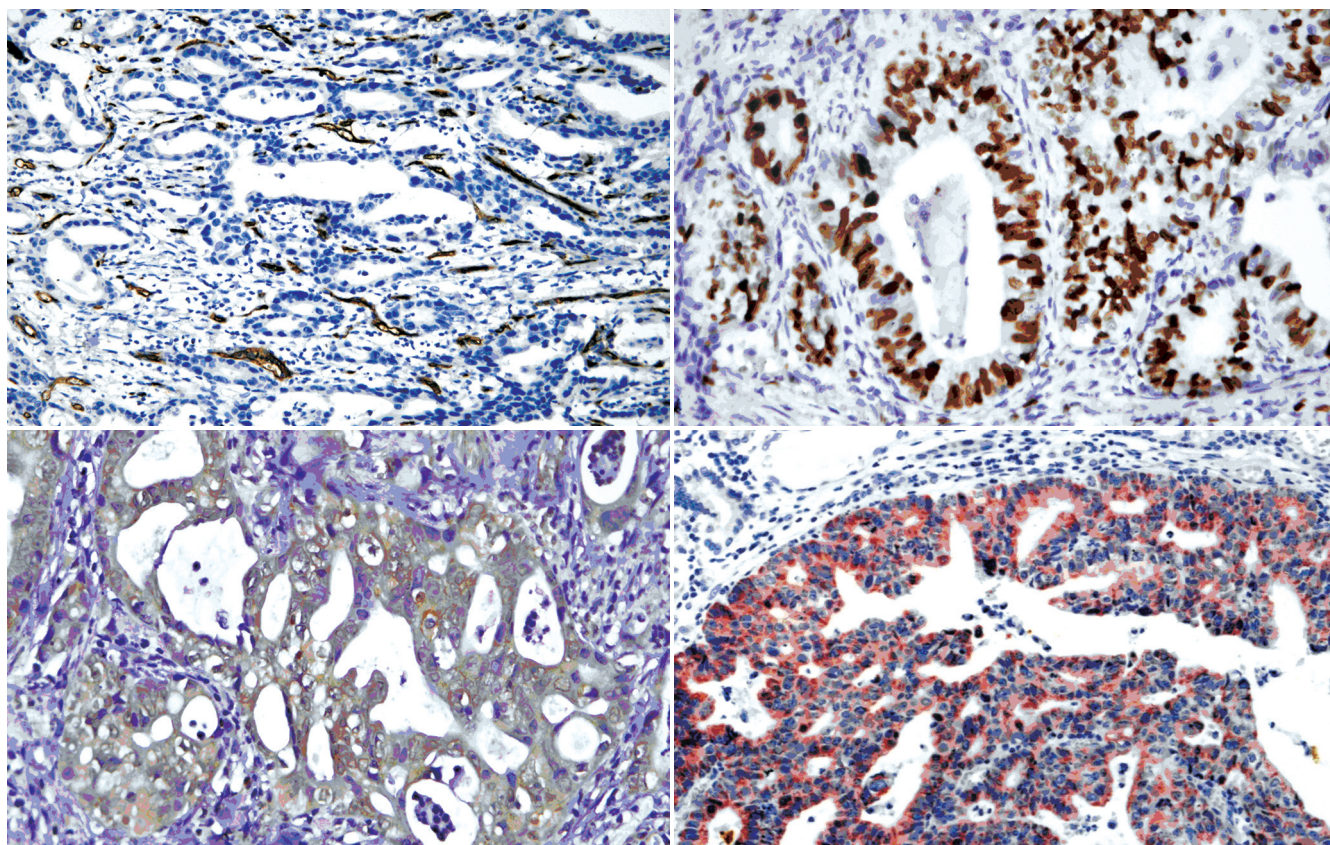


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006年9月8日 第14卷 第25期 (Volume 14 Number 25)



25 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《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。

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授	北京
黄象谦教授	天津
黄志强教授	北京
裘法祖教授	武汉
王宝恩教授	北京
危北海研究员	北京
吴孟超教授	上海
杨春波教授	福州
周殿元教授	广州

### 名誉总编辑

潘伯荣教授	西安
-------	----

### 社长/总编辑

马连生教授	北京
-------	----

### 副总编辑

陈士葆教授	上海
房殿春教授	重庆
姜洪池教授	哈尔滨
王苑本教授	天津
吴云林教授	上海
徐克成教授	广州
杨思凤教授	吉林
姚希贤教授	石家庄
岳茂兴教授	北京
张万岱教授	广州
周学文教授	沈阳

### 常务编委

程英升副教授	上海
高毅主任医师	广州
江学良主任医师	上海
李岩教授	沈阳
刘连新教授	哈尔滨
吕宾教授	杭州
罗和生教授	武汉
聂青和副教授	西安
王小众教授	福州

### 编委

白爱平主治医师	广州
别平教授	重庆
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨
蔡淦教授	上海
蔡开琳副教授	武汉
曹浩副教授	上海
曹志成院士	香港
陈海龙教授	大连

陈红松副研究员	北京
陈积圣教授	广州
陈建荣副教授	南通
陈立波副教授	武汉
陈凇教授	北京
陈其奎教授	广州
陈强谱教授	滨州
陈仕珠主任医师	西安
陈卫昌教授	苏州
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
程树群副教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群副研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
巩鹏副教授	大连
谷俊朝主任医师	北京
关玉盘教授	北京
管冬元副教授	上海
郭克建教授	沈阳
郭晓钟教授	沈阳
郭新宁教授	银川
韩天权教授	上海
郝春秋副教授	西安
郝俊鸣副主任医师	北京
何超教授	杭州
何裕隆教授	广州
何振平教授	重庆
洪天配教授	北京

侯晓华教授	武汉
黄恒青主任医师	福州
黄金华副教授	广州
黄晓东副主任医师	武汉
黄颖秋教授	本溪
黄裕新教授	西安
黄志勇副教授	武汉
季国忠副教授	南京
季加孚教授	北京
姜慧卿教授	石家庄
蒋龙元副教授	广州
金瑞教授	北京
匡安仁教授	成都
兰平教授	广州
蓝宇教授	北京
劳绍贤教授	广州
李定国教授	上海
李东辉教授	厦门
李方儒教授	天津
李国威教授	西安
李继强教授	上海
李靖副教授	重庆
李军祥教授	北京
李奇林教授	广州
李胜研究员	济南
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李旭副教授	广州
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李瑗教授	南宁
李玉民教授	兰州
李增山副教授	西安
李兆申教授	上海
李志霞教授	北京
李宗芳教授	西安
梁力建教授	广州
林胜璋副教授	温州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘彬彬副研究员	上海
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘纪教授	重庆
刘铁夫教授	哈尔滨
刘颖斌副教授	杭州
刘占举教授	郑州
刘正稳教授	西安
刘作金副教授	重庆
龙致贤教授	北京



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

鲁华玉研究员	北京	唐采白副教授	徐州	严律南教授	成都
陆才德教授	宁波	唐芙爱教授	郑州	阎晓初副教授	重庆
陆伦根教授	上海	唐霓副研究员	重庆	杨冬华教授	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨广顺教授	上海
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨建勇教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨林副研究员	广州
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	杨维良教授	哈尔滨
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	杨希山教授	广州
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	杨永生教授	北京
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	姚登福教授	南通
梅林教授	北京	万军教授	北京	姚树坤教授	石家庄
孟庆华教授	北京	汪波副主任医师	北京	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
宁琴教授	武汉	汪思应教授	合肥	阴赓宏研究员	北京
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	于红刚副教授	武汉
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	余宏宇教授	上海
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	于健春教授	北京
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	于颖彦教授	上海
潘秀珍教授	福州	王健生副教授	西安	郁宝铭教授	上海
彭波副教授	西安	王鲁副教授	上海	喻荣彬副教授	南京
彭吉润主任医师	北京	王效民教授	厦门	张柏和教授	上海
彭曦副研究员	重庆	王晓艳副教授	长沙	张方信主任医师	兰州
彭心宇教授	石河子	王新月教授	北京	张吉翔教授	南昌
彭志海教授	上海	王学美研究员	北京	张锦生教授	上海
秦波教授	重庆	王正康教授	北京	张军教授	西安
秦成勇教授	济南	王志刚副主任医师	上海	张青云研究员	北京
秦环龙教授	上海	王忠裕教授	大连	张群华教授	上海
钱建民教授	上海	卫洪波教授	广州	张水军教授	郑州
秦仁义教授	武汉	魏经国教授	西安	张绪清副教授	重庆
卿三华教授	广州	魏来教授	北京	张学教授	北京
邱双健副教授	上海	闻勤生教授	西安	张宗明教授	北京
邱伟华副主任医师	上海	吴德全教授	哈尔滨	赵桂珍教授	沈阳
任超世研究员	天津	吴建国教授	武汉	赵景民教授	北京
任建安教授	南京	吴君主任医师	贵阳	赵连三教授	成都
任建林教授	厦门	吴萍主任医师	徐州	赵平副教授	上海
邵成浩讲师	上海	吴志勇教授	上海	郑民华教授	上海
邵先玉教授	泰安	席启主任医师	大同	郑鹏远教授	郑州
邵永孚教授	北京	夏建川研究员	广州	智发朝教授	广州
沈洪教授	南京	向德兵讲师	重庆	周伯平教授	深圳
沈琳副教授	北京	肖恩华教授	长沙	周丁华主任医师	北京
沈薇教授	重庆	谢晓华副教授	广州	周国雄主任医师	南通
施诚仁教授	上海	徐爱民副教授	上海	周士胜教授	大连
施瑞华教授	南京	徐迎新研究员	北京	周霞秋教授	上海
石统东副教授	重庆	许春舫主任医师	苏州	周晓东研究员	广州
宋世兵主任医师	北京	徐存拴教授	新乡	庄林主任医师	昆明
宋振顺教授	西安	徐大华副主任医师	北京	朱传武副主任医师	苏州
孙诚谊教授	贵阳	徐德忠教授	西安	朱春兰主任医师	哈尔滨
孙殿兴主任医师	石家庄	徐列明教授	上海	朱立元教授	深圳
孙家邦教授	北京	徐小元教授	北京	朱人敏教授	南京
孙秀发教授	武汉	许玲副教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
孙学英教授	哈尔滨	许文燮教授	上海	左国营副主任药师	昆明
邵升副教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江		
谭学瑞教授	汕头	闫惠平研究员	北京		

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 9 月 8 日 第 14 卷 第 25 期 (总第177期)

## 述 评

2473 Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径: 大肠癌治疗的新靶点 向德兵, 王东, 谢家印

## 基 础 研 究

- 2480 单甲氧基聚乙二醇对大鼠胰岛的免疫修饰作用  
赵刚, 崔静, 黎少山, 殷涛, 胡伟国, 吴河水, 王春友
- 2484 CGRP在大鼠胃痛觉过敏形成机制中的作用  
章菲菲, 莫剑忠, 吕有灵, 陈胜良, 吕鸣, 张珏莹, 杨龙
- 2488 丹参对内皮素-1介导的肝星状细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化的影响机制  
姚冬梅, 房澍名, 杨川杰, 修贺明, 苏素文, 姚希贤
- 2493 反义肝素酶基因对胰腺癌细胞体外增殖和侵袭的抑制作用  
杨彦, 崔明, 陈陵, 段体德

## 临 床 研 究

- 2499 表面增强的激光解析电离飞行时间质谱技术在肝细胞癌血清学诊断中的应用  
田宇彬, 刘华, 孙桂荣, 孔心涓, 张翠萍, 王斌
- 2504 肝细胞核因子4 $\alpha$ 和3 $\beta$ 在人主要器官中的表达  
龙云, 唐红, 刘聪, 何芳, 刘丽, 赵连三, 黄飞骏
- 2510 炎症性肠病肠上皮细胞基质金属蛋白激酶对NAP-2的影响  
吕小平, 詹灵凌, 姜海行, 唐国都
- 2516 SKP2在大肠癌组织中的表达及预后意义  
孙立春, 隋广杰, 刘亚琴
- 2521 转化生长因子 $\beta_1$ 和结缔组织生长因子在肝纤维化中的表达  
丁宁, 李岩

## 文 献 综 述

- 2527 ASPP蛋白家族的研究进展 李彦, 姜政
- 2531 肠道产丁酸细菌及其丁酸产生机制的研究进展 于卓腾, 杭苏琴, 姚文, 朱伟云
- 2535 食管癌术后放疗的临床应用价值 卢绪菁, 王建华
- 2538 转化生长因子 $\beta$ 与肿瘤转移的研究进展 俞清翔
- 2542 重症急性胰腺炎时肾损害的研究进展 王国品

## 研 究 快 报

- 2546 PGE<sub>2</sub>对胃癌MKN28细胞VEGF表达的影响  
肖炜明, 施瑞华, 丁岩冰, 吴健, 童建东, 严志刚
- 2551 逆转录病毒介导双靶区反义RNA在转基因小鼠肝细胞中的表达及对HBV DNA复制的影响  
张政, 席宏丽, 公维波, 李文刚, 于敏, 曾争, 徐小元

## 临 床 经 验

- 2556 血管紧张素 II 1型受体基因A1166C位点基因多态性与肝硬化的关系  
黄玉波, 董庆鸣, 宋淑静, 魏红山, 刘志英, 成军, 毛羽
- 2560 探讨老年胃癌患者胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA联合检测的临床价值  
李明, 刘顺英, 李卫东, 江洁, 潘金泉, 叶正龙, 常尉文, 张文清
- 2563 血清总胆汁酸在婴幼儿巨细胞病毒肝炎中的动态变化及临床意义  
刘薇, 蒋玉红, 王亚秋, 李伟
- 2566 生物反馈训练可以提高超低位直肠癌内括约肌切除术后排便功能  
丛进春, 张宏, 陈春生, 刘恩卿

## 病 例 报 告

- 2571 胆道解剖变异影像与临床手术对比4例  
马龙滨, 赵志华, 李宾, 何津, 王新元



附 录	2573 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	2578 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>2479 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》</p> <p>2483 专家门诊</p> <p>2503 2006中国结直肠肛门外科学术会议通知</p> <p>2509 第六届亚太消化疾病周(APDW)会议通知</p> <p>2515 世界华人消化杂志关于作者署名的声明</p> <p>2520 全国消化系疾病的诊疗进展学习班通知</p> <p>2526 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知</p> <p>2530 第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知</p> <p>2541 2007中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知</p> <p>2550 中国中西医结合学会第九次全国中西医结合影像学术交流大会</p> <p>2562 2006年国际会议</p> <p>2570 第三届亚洲大洋洲光生物学大会</p>
封面故事	<p>Yu Chen, Sheng Zhang, Yu-Peng Chen, Jian-Yin Lin.</p> <p>Increased expression of angiogenin in gastric carcinoma in correlation with tumor angiogenesis and proliferation.</p> <p><i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(32): 5135-5139</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/5135.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/5135.asp</a></p>
国际会议	<p>71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006</p> <p>14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation <a href="http://www.uegw2006.de">www.uegw2006.de</a></p> <p>XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 <a href="mailto:amg@gastro.org.mx">amg@gastro.org.mx</a> <a href="http://www.gastro.org.mx">www.gastro.org.mx</a></p>

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(旬刊)

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2006-09-08  
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生  
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁  
中文编辑 潘伯荣 张海宁 张焕兰 王晓瑜  
电子编辑 张敏 李琪  
本期审读 张焕兰

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市2345信箱)  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《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。

## 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号  
82-262

国外代号  
M 4481

国内定价  
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证  
1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# World Chinese Journal of Digestology

**September 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 25**

<b>EDITORIAL</b>	2473 Wnt/beta-catenin signal pathway: a novel target for treatment of colorectal cancer <i>Xiang DB, Wang D, Xie JY</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	2480 Immune modification of rat islet by methoxy-polyethylene glycol <i>Zhao G, Cui J, Li SS, Yin T, Hu WG, Wu HS, Wang CY</i> 2484 Role of calcitonin gene-related peptide in gastric hypersensitivity in rats <i>Zhang FF, Mo JZ, Lv YL, Chen SL, Lv M, Zhang JY, Yang L</i> 2488 Effects of radix salviae miltiorrhizae on endothelin-1-induced calcium changes in hepatic stellate cells <i>Yao DM, Fang SM, Yang CJ, Xiu HM, Su SW, Yao XX</i> 2493 Inhibitory effects of antisense hapanase gene on proliferation and invasion of human pancreatic cancer cell line SW1990 <i>in vitro</i> <i>Yang Y, Cui M, Chen L, Duan TD</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	2499 Application of surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology in the diagnosis of hepatocellular carcinoma <i>Tian ZB, Liu H, Sun GR, Kong XJ, Zhang CP, Wang B</i> 2504 Expression of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ and 3 $\beta$ in human tissues <i>Long Y, Tang H, Liu C, He F, Liu L, Zhao LS, Huang FJ</i> 2510 Effect of matrix metalloproteinase on the neutrophil chemokine neutrophil activating peptide-2 of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease <i>Lv XP, Zhan LL, Jiang HX, Tang GD</i> 2516 Expression and prognostic significance of S-phase kinase associated protein 2 in colorectal carcinomas tissues <i>Sun LC, Sui GJ, Liu YQ</i> 2521 Expression of transforming growth factor- $\beta_1$ and connective tissue growth factor in hepatic fibrosis <i>Ding N, Li Y</i>
<b>REVIEW</b>	2527 Advance in apoptosis stimulating protein of P53 family <i>Li Y, Jiang Z</i> 2531 Intestinal butyrate-producing bacterium and its mechanisms <i>Yu ZT, Hang SQ, Yao W, Zhu WY</i> 2535 Clinical values of postoperative radiation therapy for esophageal carcinoma <i>Lu XJ, Wang JH</i> 2538 Relationship between transforming growth factor- $\beta$ and tumor metastasis <i>Yu QX</i> 2542 Progress in intercurrent renal damage of severe acute pancreatitis <i>Wang GP</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	2546 Effects of prostaglandin E <sub>2</sub> on expression of vascular endothelial growth factor in human gastric cancer cell line MKN28 <i>Xiao WM, Shi RH, Ding YB, Wu J, Tong JD, Yan ZG</i>

	<p>2551 Retrovirus-mediated expression of dual-target antisense RNA in liver cells of transgenic mice and its influence on replication of hepatitis B virus <i>Zhang Z, Xi HL, Gong WB, Li WG, Yu M, Zeng Z, Xu XY</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>2556 A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor gene and its role in pathogenesis in liver cirrhosis <i>Huang YB, Dong QM, Song SJ, Wei HS, Liu ZY, Cheng J, Mao Y</i></p> <p>2560 Clinical value of combined detection of tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>, carbohydrate antigen 19-9 and carcinoembryonic antigen in gastric fluid of elderly patients with gastric cancer <i>Li M, Liu SY, Li WD, Jiang J, Pan JQ, Ye ZL, Chang WW, Zhang WQ</i></p> <p>2563 Dynamic changes and clinical significance of serum total bile acid in infantile cytomegalovirus hepatitis <i>Liu W, Jiang YH, Wang YQ, Li W</i></p> <p>2566 Biofeedback therapy can improve the anal sphincter function in patients with intersphincteric resection for low rectal cancer <i>Cong JC, Zhang H, Chen CS, Liu EQ</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>2571 Comparison between image and operative exhibitions of biliary passage anatomical abnormality: an analysis of 4 cases <i>Ma LB, Zhao ZH, Li B, He J, Wang XY</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>2573 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>2578 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Chen Y, Zhang S, Chen YP, Lin JY.</i> Increased expression of angiogenin in gastric carcinoma in correlation with tumor angiogenesis and proliferation. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(32): 5135-5139 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/5135.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/5135.asp</a></p>
<b>INTERNATIONAL MEETINGS</b>	<p>71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006</p> <p>14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation <a href="http://www.uegw2006.de">www.uegw2006.de</a></p> <p>XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 <a href="mailto:amg@gastro.org.mx">amg@gastro.org.mx</a> <a href="http://www.gastro.org.mx">www.gastro.org.mx</a></p>

**Indexed/Abstracted by** Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

**Founded** on January 15, 1993

**Renamed** on January 25, 1998

**Publication** date September 8, 2006

**Honorary-Editor-in-Chief**

Bo-Rong Pan

**President and Editor-in-Chief**

Lian-Sheng Ma

**Edited by** Editorial Board of

*World Chinese Journal of Digestology*

PO Box 2345, Beijing 100023, China

**Published by** The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

**Overseas Distributor**

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

**Code No.**M4481

**Mail-Order** Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

**ISSN** 1009-3079 CN 14-1260/R

**Copyright** © 2006 by The WJG Press



# Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径: 大肠癌治疗的新靶点

向德兵, 王东, 谢家印

向德兵, 王东, 谢家印, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心 重庆市 400042

向德兵, 2000年第三军医大学病理学硕士, 2004年第三军医大学肿瘤学博士生, 讲师, 主要从事大肠癌分子病理和分子靶向治疗研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30100228

重庆市科委应用基础基金资助项目, No. 20016824

通讯作者: 王东, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心。

dongwang64@hotmail.com

电话: 023-68757346 传真: 023-68757706

收稿日期: 2006-06-04 接受日期: 2006-06-24

## 摘要

大肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发病呈上升趋势, 严重威胁人民生命健康, 目前主要采取以手术和放化疗为主的综合治疗, 传统的化疗药物对患者的预后也只能起到有限的作用, 因此新的分子靶向治疗迫在眉睫。Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径在胚胎发育过程以及多种肿瘤的发生、发展中起重要作用。由于其在人类不同肿瘤中的广泛激活, 调节细胞的生长、迁移和分化, 已被公认为肿瘤发生过程中关键的信号通路之一, 尤其在大肠癌的发生、发展上, 目前研究表明, 约90%的大肠癌发生与该通路过度激活有关。近年研究发现, 一些非甾体抗炎药、植物类化合物、酪氨酸激酶抑制剂和血管生成抑制剂等能抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径过度激活, 以及针对该途径重要信号分子的小分子抑制剂和基因治疗等分子靶向治疗均显示了很好的抗癌前景。

**关键词:** 大肠癌;  $\beta$ -catenin; Wnt; 信号转导; 肿瘤治疗

向德兵, 王东, 谢家印. Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径: 大肠癌治疗的新靶点. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2473-2479  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2473.asp>

## 0 引言

Wnt信号转导途径是目前已知的胚胎发育所必须的信号转导途径, 同时在肿瘤的发生、发展中该途径也占据着重要的地位<sup>[1]</sup>。现已经证实, 该通路的过度激活与多种人类肿瘤的发生有密切的联系, 尤其在大肠癌的发生、发展上, 目前研究表明, 约90%的大肠癌发生与该通路过

度激活有关<sup>[2]</sup>。经典Wnt信号转导途径致癌的关键是该途径任何一个信号分子异常致 $\beta$ -catenin在胞质中累积, 继而进入核内激活Tcf-4转录因子, 启动靶基因转录, 因此经典Wnt信号转导途径又称为Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径。我们对Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径与大肠癌发生、发展的关系, 以及针对该信号途径的治疗策略做一概述。

## 1 经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径

经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号包括胞膜、胞质、胞核信号3部分, 可概括为: Wnt蛋白与胞膜上的卷曲蛋白(frizzled, Frz)受体及低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor related protein) LRP-5, LRP-6辅助受体结合; 同时Wnt和Frz受体的结合被WIF-1, Cerberus和FrzB竞争性抑制, 而Dickkopf家族(DKK-1, DKK-2)通过间接减少可利用的辅助受体LRP的数量来间接抑制Wnt与膜受体的结合<sup>[3-4]</sup>。胞膜上的Wnt信号活化后使胞质内散乱蛋白(dishevelled, Dsh)激活, Dsh被磷酸化, 抑制 $\beta$ -catenin降解复合体降解 $\beta$ -catenin;  $\beta$ -catenin降解复合体包括大肠腺瘤息肉蛋白(adenomatous polyposis coli, APC), 轴蛋白(axin), 糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 和酪蛋白激酶1 $\alpha/\epsilon$  (casein kinase, CK1 $\alpha$ )等,  $\beta$ -catenin降解复合体异常(如APC或axin突变等)和 $\beta$ -catenin基因本身突变均可致 $\beta$ -catenin降解障碍, 在胞质内积累继而进入细胞核, 激活转录因子Tcf-4/LEF, 启动靶基因转录(如c-myc, cyclinD1, MMP-7, FGF-18, EGFR等)<sup>[5-11]</sup>。

## 2 Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径在大肠癌发生、发展中的作用

**2.1 Wnt基因及其受体异常** Wnt基因家族至少包含19个富含半胱氨酸的糖化蛋白。Wnt蛋白在胞膜上和Frz的7次跨膜受体相结合, 同时结合LRP-5和LRP-6, 这是Wnt信号通路活化的重要起始信号。Wnt途径抑制剂WIF-1, Cerberus, FrzB

## ■背景资料

Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径与多种人类肿瘤的发生有密切的联系, 尤其在大肠癌的发生、发展上, 目前研究表明约90%的大肠癌发生与该信号途径过度激活有关。针对该信号途径的肿瘤治疗策略是目前研究的热点。

## ■研发前沿

针对Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的分子靶向治疗是将来研究的重点和热点,其中靶分子是该信号途径的关键分子 $\beta$ -catenin或核转录因子Tcf-4。如何在体内有效抑制该信号途径是今后研发的关键和难点。

等竞争性抑制Wnt与Frz结合,而Dickkopf家族(DKK-1, DKK-2)通过间接减少可利用的辅助受体LRP的数量来间接抑制Wnt与膜受体的结合。Wnt基因家族成员的Wnt-1, Wnt-3和Wnt-10b都是由MMTV诱发小鼠乳腺癌的过程中活化的癌基因。小鼠Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3a, Wnt-5a, Wnt-7基因在体外均具有转化细胞的能力。目前研究表明,Wnt基因及其受体异常与人类肿瘤的发生可能相关。例如,Wnt-2和Wnt-5a可能与大肠癌发生、发展有关<sup>[12]</sup>。DKK-1失活在大肠癌进展中也可能起重要作用<sup>[13]</sup>。

**2.2  $\beta$ -catenin基因异常**  $\beta$ -catenin基因(CTNNB1)定位于人染色体3P21.3-P22,该区域是人类基因组经常发生恶性改变的区域,基因全长23.2 kb,共有16个外显子,其mRNA长度为3362个核苷酸残基<sup>[14]</sup>。 $\beta$ -catenin基因(CTNNB1)外显子3的第33, 37, 41, 45位密码子编码区域构成的 $\beta$ -catenin蛋白的NH2末端,他是与复合体结合后发生磷酸化的位点,其缺失或突变会导致 $\beta$ -catenin不与复合体结合而免于降解,导致 $\beta$ -catenin在胞质的积聚,游离的 $\beta$ -catenin进入核内与Tcf-4结合,促进相应的靶基因转录,则可促使肿瘤的发生。在大肠腺瘤和大肠癌中有相当比例的肿瘤有 $\beta$ -catenin基因突变,且以外显子3最为常见。在APC基因完整的大肠癌中 $\beta$ -catenin基因外显子3的突变率高达50%<sup>[15]</sup>。在实验性毒物诱导的动物大肠癌中也可频繁检测到 $\beta$ -catenin基因突变<sup>[16]</sup>。

**2.3  $\beta$ -catenin降解复合体异常**  $\beta$ -catenin降解复合体的功能在于使 $\beta$ -catenin磷酸化,而后被泛素-蛋白酶体系统降解。APC基因最初是从家族性多发性息肉腺瘤综合征(familial adenomatous polyposis, FAP)患者中发现并克隆的,现在公认为是一个典型的抑癌基因。APC基因与结肠癌发生的关系极为密切,其突变后可导致结肠上皮细胞过度增生,形成息肉,最终导致肿瘤的形成。大约80%散发性结肠癌中可检测到APC基因缺失突变或失活,而APC基因的缺失或失活被公认为是结肠癌发生的早期事件<sup>[17]</sup>。axin基因也和APC基因一样起抑癌基因作用。研究发现,一些没有APC和 $\beta$ -catenin基因突变的大肠癌中出现了axin的突变,导致 $\beta$ -catenin的核累积,并与错配修复缺陷密切相关<sup>[18]</sup>。 $\beta$ -catenin降解复合体任何一个信号分子突变、缺失或功能异常等均可致 $\beta$ -catenin降解受阻从而在胞质内累积,随即游离的 $\beta$ -catenin进入核内,激活靶基因的表达。

**2.4 Tcf-4及其靶基因异常** Tcf家族包含4个不同

的蛋白Tcf-1, Tcf-2, Tcf-3, Tcf-4/Lef。在大肠正常上皮及肿瘤细胞中表达的主要是Tcf-4。人Tcf-4(hTcf-4)是人结肠上皮主要的家族成分<sup>[19]</sup>,其基因编码定位于染色体10q25.3,包括17个外显子和许多选择性结合位点<sup>[20]</sup>。Duval *et al*<sup>[21]</sup>在24株大肠癌细胞中发现有12株细胞Tcf-4发生突变,其中有半数发生在基因的3'末端,这些突变基因产物可能减少C-末端结合蛋白的结合,从而增强基因的转录活性,说明Tcf-4基因在结肠癌的发生中起重要作用。且各种原因过渡激活Wnt信号途径后均可致 $\beta$ -catenin在胞质内累积,游离的 $\beta$ -catenin进入核内与Tcf-4结合形成复合物,启动下游靶基因的异常转录从而促进肿瘤发生及细胞周期进程。这些靶基因多与细胞凋亡、细胞生长、血管生成及肿瘤侵袭转移有关,如c-myc, cyclinD1, MMP-7等。我们通过对 $\beta$ -catenin与c-myc, cyclinD1蛋白在大肠癌的表达情况进行相关分析,结果显示, $\beta$ -catenin与c-myc, cyclinD1表达均呈明显正相关,提示 $\beta$ -catenin异位表达可能是原癌基因c-myc和cyclinD1激活的原因之一,并在大肠癌发生、发展中起重要作用<sup>[22]</sup>。

## 3 Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径: 大肠癌治疗的新靶点

Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径目前是公认的与大肠癌等多种肿瘤发生、发展密切相关的信号途径,因此近年国内外学者从多方面研究了针对该信号途径的干预策略,包括多种非细胞毒性药物(如非甾体类抗炎药物,植物类化合物等)对该途径的调控作用,以及针对该途径重要信号分子的小分子抑制剂、分子靶向治疗和基因治疗等<sup>[23-25]</sup>。

**3.1 非甾体类抗炎药物NSAIDs** 在过去10 a里,大量的流行病学和临床研究资料表明,现有的许多非细胞毒性药物显示良好的抗癌前景,研究最多的是非甾体类抗炎药物,其中包括选择性COX-2抑制剂。许多肿瘤均高表达COX-2。大量研究表明,NSAIDs抗癌作用机制主要与其抑制肿瘤细胞COX-2表达有关,但同时也有较多研究表明,NSAIDs对不表达COX-2的肿瘤细胞也有较强的抑制作用,因此认为NSAIDs可能通过COX-2依赖和非依赖机制同时发挥抗癌作用。目前研究表明,Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径是多种NSAIDs作用的分子靶点(表1)<sup>[23-25]</sup>。Dihlmann *et al*<sup>[26]</sup>研究表明,消炎痛(indomethacin)和阿司匹林(aspirin)均可抑制大肠癌细胞 $\beta$ -catenin/Tcf转

表 1 NSAIDs对Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径调控作用

NSAIDs	对Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径调控作用	细胞/组织及参考文献
Indomethacin	抑制核 $\beta$ -catenin表达	大鼠大肠肿瘤 <sup>[29]</sup>
	抑制核 $\beta$ -catenin和cyclinD1表达	SW480细胞 <sup>[30]</sup>
	抑制总 $\beta$ -catenin表达	HT-29, HCA-7, SW480, HCT116细胞 <sup>[31]</sup>
	抑制 $\beta$ -catenin和cyclinD1表达, 抑制 $\beta$ -catenin/Tcf与DNA结合活性	SW480, HCT116细胞 <sup>[32]</sup>
	抑制cyclinD1表达	SW480, HCT116, LoVo细胞 <sup>[26]</sup>
Sulindac	抑制核 $\beta$ -catenin表达	大鼠大肠肿瘤 <sup>[29]</sup>
	抑制核 $\beta$ -catenin表达	FAP患者腺瘤 <sup>[28]</sup>
	增加膜 $\beta$ -catenin表达	APC $\Delta^{716}$ 小鼠 <sup>[33]</sup>
Sulindac sulfide	抑制 $\beta$ -catenin表达	Min <sup>+</sup> 小鼠 <sup>[34]</sup>
	抑制核 $\beta$ -catenin和cyclinD1表达	SW480细胞
	抑制磷酸化 $\beta$ -catenin, cyclinD1和Met表达, 抑制 $\beta$ -catenin/Tcf转录活性	DLD1和SW480细胞 <sup>[28]</sup>
Aspirin	抑制cyclinD1表达	SW480, HCT116, LoVo细胞 <sup>[26]</sup>
	抑制 $\beta$ -catenin/Tcf转录活性, 促进 $\beta$ -catenin磷酸化和非磷酸化降解	SW480细胞 <sup>[27]</sup>
	促进 $\beta$ -catenin降解	HCT116细胞 <sup>[35]</sup>
Rofecoxib	上调小肠息肉 $\beta$ -catenin膜表达	APC $\Delta^{716}$ 小鼠 <sup>[33]</sup>
Diclofenac	抑制核 $\beta$ -catenin和cyclinD1表达	SW480细胞 <sup>[30]</sup>
Celecoxib	减少肠隐窝细胞 $\beta$ -catenin及核 $\beta$ -catenin表达	致癌剂AOM处理的大鼠 <sup>[36]</sup> , Caco-2细胞 <sup>[37]</sup>
	促进 $\beta$ -catenin降解(蛋白酶体和Caspase依赖方式)	
Meloxicam	抑制核 $\beta$ -catenin表达	大鼠大肠肿瘤 <sup>[29]</sup>
Etodolac	上调E-cadherin蛋白和mRNA表达	Caco-2细胞 <sup>[38]</sup>
Nabumetone	抑制 $\beta$ -catenin表达	Min <sup>+</sup> 小鼠 <sup>[39]</sup>
	上调E-cadherin和GSK-3 $\beta$ 表达	
	抑制核 $\beta$ -catenin和cyclinD1表达	致癌剂AOM处理的大鼠 <sup>[39]</sup>
	上调E-cadherin和GSK-3 $\beta$ 表达	

■**相关报道**  
Kundu *et al*重点、全面综述了非甾体类抗炎药物(NSAIDs)对Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径调控作用。李琳娜 *et al*重点介绍了Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径在大肠癌发生、发展中的作用。

录活性和靶基因cyclinD1表达, 对 $\beta$ -catenin/Tcf复合物形成无影响。Dihlmann *et al*<sup>[27]</sup>研究也表明, 阿司匹林可增加大肠癌细胞 $\beta$ -catenin蛋白磷酸化, 从而促进 $\beta$ -catenin降解。在人体试验研究也发现, 舒林酸(sulindac)的抗癌活性与其抑制FAP患者腺瘤组织 $\beta$ -catenin核表达有关<sup>[28]</sup>。多种NSAIDs (indomethacin, meloxicam, sulindac等)在预防致癌剂诱发的动物大肠肿瘤发生上也起了重要作用, 其机制多与其抑制 $\beta$ -catenin核表达密切相关<sup>[29]</sup>。

3.2 植物类化合物 流行病学调查显示, 大肠癌的发病与饮食结构有关, 西方发达国家人群中其发病率明显高于那些以素食为主、进食较少肉类和动物脂肪的人群, 如东南亚地区的居民。许多植物多酚化合物, 抗氧化剂,  $\omega$ -3脂肪酸等对大肠癌有明显的预防和治疗作用, 并能提高放化疗敏感性, 减轻放化疗对正常组织的毒性反应<sup>[40-41]</sup>。已有研究证实, 姜黄素(curcumin)可抑制

大肠癌HCT116细胞的 $\beta$ -catenin/Tcf转录活性和 $\beta$ -catenin/Tcf与DNA结合活性, 促进caspase介导的 $\beta$ -catenin降解, 并下调靶基因c-myc表达<sup>[42]</sup>。绿茶和白茶均可抑制转基因小鼠C57BL/6J-APC (Min<sup>+</sup>)小肠肿瘤发生率, 其机制与下调 $\beta$ -catenin, cyclinD1和c-Jun蛋白表达密切相关<sup>[43]</sup>。绿花椰菜(broccoli)的成分之一菜菔硫烷(sulforaphane)可抑制大肠癌SW480细胞的 $\beta$ -catenin和cyclinD1表达, 下调cyclinD1启动子活性, 并诱导细胞生长受阻和凋亡<sup>[44]</sup>。植物类化合物 $\beta$ -拉帕醌呈剂量依赖方式诱导大肠癌HCT116细胞生长受阻和凋亡, 与其激活caspase-3, 促进 $\beta$ -catenin降解密切相关<sup>[45]</sup>。咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)是一种酚类抗氧化剂, 广泛存在于多种含树脂的植物和蜂胶中, 也能人工合成, 是蜂胶抗肿瘤作用的主要活性成分, 对肿瘤细胞具有选择性的抑制作用, 而对正常细胞几乎没有毒性作用。我们研究发现, CAPE呈剂量和



### ■创新盘点

本文较全面阐述了以Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径为靶点的大肠癌治疗进展,重点介绍了小分子抑制剂、病毒和基因治疗等分子靶向治疗策略。

时间依赖方式抑制大肠癌细胞增殖,诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞<sup>[46]</sup>,并抑制大肠癌细胞的 $\beta$ -catenin/Tcf转录活性和靶基因cyclinD1, c-myc表达<sup>[47]</sup>,且体内CAPE明显抑制大肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤的生长和促进细胞凋亡<sup>[48]</sup>。

**3.3 分子靶向治疗** 随着对肿瘤细胞信号传导途径研究的不断深入,人们对肿瘤细胞内部的癌基因和抑癌基因等的相互作用,以及他们对肿瘤微环境的影响已经越来越清楚,因此针对肿瘤的特异性分子靶点设计抗肿瘤治疗新方案成为可能。目前已经有mAb治疗、小分子抑制剂、新生血管抑制剂、基因与病毒治疗、细胞载体的靶向治疗等多个肿瘤靶向治疗药物问世。分子靶向药物通过阻断肿瘤细胞或相关细胞的信号转导,来控制细胞基因表达,从而抑制或杀死肿瘤细胞,靶向药物最大的优点是以肿瘤细胞或与之相关的细胞为靶点,选择性地抑制或杀死肿瘤细胞,而不损伤人体的正常细胞,因而是一类极具发展前景的肿瘤治疗药物。目前还没有针对Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的特异性靶向治疗药物,但一些其他靶向治疗药物及实验室研究均显示该信号途径可做为分子靶向治疗的潜在靶点。

**3.3.1 小分子抑制剂** 小分子抑制剂是分子靶向治疗研究的热点。研究表明, $\beta$ -catenin不仅受丝氨酸/苏氨酸磷酸化调节,而且也受生长因子介导的酪氨酸磷酸化调节<sup>[49-50]</sup>。酪氨酸激酶抑制剂格列卫(Glivec/Gleevec)是一种小分子蛋白,已用于慢性髓性白血病和胃肠道间质瘤的临床治疗。研究发现,格列卫能显著抑制大肠癌细胞增殖,并能下调Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径转录活性,使 $\beta$ -catenin从细胞核到细胞膜转位<sup>[51]</sup>,所以 $\beta$ -catenin也是格列卫的潜在靶点。因此格列卫有望进一步开发为大肠癌的辅助治疗药物。血管内皮抑素(endostatin)是一种由约184个氨基酸组成的多肽,这种天然蛋白质是胶原XVIII上的相对分子质量为20 kDa的C端片段。其在1997年从血管内皮细胞瘤细胞中被分离出来,是特异的血管生成抑制剂,体内外对多种肿瘤有明显的抑制作用。近年研究发现, endostatin不仅抑制血管生成,体内外对大肠癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤细胞也有直接的抑制作用,对大肠癌抑制作用最强<sup>[52]</sup>。Hanai *et al*<sup>[53]</sup>报道endostatin是Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的有效抑制剂,抑制内皮细胞和大肠癌DLD-1细胞株的Wnt/ $\beta$ -catenin信号转

录活性,促进 $\beta$ -catenin降解。Lepourcelet *et al*<sup>[54]</sup>通过高通量方法对7000种化合物文库中筛选,发现8种化合物能特异地抑制 $\beta$ -catenin与Tcf-4复合物形成,抑制 $\beta$ -catenin/Tcf-4转录活性,下调靶基因cyclinD1和c-myc表达,从而抑制大肠癌细胞增殖。但其临床应用前景仍需进一步探讨。

**3.3.2 病毒和基因治疗** 目前国内外肿瘤基因治疗研究领域,针对抑癌基因p53的重组人p53腺病毒是研究最为深入、进展最快的一种基因治疗产品,临床上也显示了较好的疗效。研究表明P53蛋白可上调泛素E3连接酶Siah-1的表达量和活性,促进和加强 $\beta$ -catenin的降解,阻止该信号途径转录因子Tcf-4的活化;或直接抑制Tcf-4的转录,从而抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径<sup>[55-57]</sup>。针对Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的病毒和基因治疗的靶分子主要是该信号途径的关键分子 $\beta$ -catenin和核转录因子Tcf-4。以 $\beta$ -catenin为靶点的基因治疗策略主要是反义寡核苷酸和RNA干扰(RNAi)。研究报道, $\beta$ -catenin反义寡核苷酸呈剂量依赖方式减少 $\beta$ -catenin mRNA和蛋白表达、Tcf-4转录活性和cyclinD1表达,体内外显著抑制APC基因突变的大肠癌细胞增殖<sup>[58-59]</sup>。van de Wetering *et al*<sup>[60]</sup>报道, $\beta$ -catenin siRNA明显抑制大肠癌LS174T细胞Tcf-4转录活性,并诱导细胞周期阻滞和促进细胞分化。Verma *et al*<sup>[61]</sup>用非病毒载体Oligofectamine转染 $\beta$ -catenin siRNA,体内外对APC基因突变或 $\beta$ -catenin基因突变的大肠癌细胞均有明显的增殖抑制作用。Brunori *et al*<sup>[62]</sup>利用大肠癌Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径异常激活的特点,构建了Tcf-限制复制型溶瘤腺病毒,病毒可在高 $\beta$ -catenin/Tcf-4转录活性的细胞中选择性复制而融解靶细胞,体外显示较好的抑制肿瘤生长作用。Malerba *et al*<sup>[63]</sup>构建了Tcf-限制复制型细小病毒,即将Tcf转录因子的结合位点插入P4启动子,P4启动子控制着小鼠细小病毒NS1, NS2蛋白的表达。发现细小病毒产物在出现Wnt信号的大肠癌细胞株中增加了300倍,但在无Wnt信号的其他细胞株中明显降低,显示较好的抗癌活性和安全性。针对转录因子的基因治疗还有一种新的decoy(圈套/诱骗)策略,即合成与顺式元件相一致的双链寡聚脱氧核苷酸(ODNs),竞争性抑制反式因子(转录因子)与顺式元件的结合,干扰转录因子的DNA结合活性。Seki *et al*<sup>[64]</sup>研究证实,含有Tcf-4顺式结合元件的18-mer双链Tcf-4 decoy ODNs显著抑制HEK293

细胞和大肠癌HCT116细胞Tcf-4转录活性, 抑制下游靶基因cyclinD1, c-myc和MMP-7表达; 抑制大肠癌HCT116细胞增殖, 而对正常的HEK293细胞增殖无影响, 因此对大肠癌等肿瘤的基因治疗显示了较好的应用前景。

总之, Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径与大肠癌的发生、发展密切相关, 针对该信号途径的分子靶向治疗策略有望为大肠癌的治疗提供新的有效途径, 非甾体类抗炎药物和植物类化合物等多种非细胞毒性药物也将为大肠癌的预防和综合治疗起到极其重要的作用。

#### 4 参考文献

- 1 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850
- 2 Thorstensen L, Lind GE, Lovig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO, Lothe RA. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* 2005; 7: 99-108
- 3 Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 2001; 7: 801-809
- 4 Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature* 2002; 417: 664-667
- 5 Taketo MM. Shutting down Wnt signal-activated cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 320-322
- 6 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
- 7 Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398: 422-426
- 8 Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5522-5527
- 9 Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, Li M, Miwa N, Lin YM, Nakamura Y. Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. *Cancer Res* 2003; 63: 6116-6120
- 10 Tan X, Apte U, Micsenyi A, Kotsagrelis E, Luo JH, Ranganathan S, Monga DK, Bell A, Michalopoulos GK, Monga SP. Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in liver. *Gastroenterology* 2005; 129: 285-302
- 11 Li YJ, Wei ZM, Meng YX, Ji XR. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2117-2123
- 12 Smith K, Bui TD, Poulsom R, Kaklamanis L, Williams G, Harris AL. Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 81: 496-502
- 13 Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Munoz A, Esteller M, Gonzalez-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006; 25: 4116-4121
- 14 Trent JM, Wiltshire R, Su LK, Nicolaides NC, Vogelstein B, Kinzler KW. The gene for the APC-binding protein beta-catenin (CTNNB1) maps to chromosome 3p22, a region frequently altered in human malignancies. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71: 343-344
- 15 Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1130-1134
- 16 Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Beta-Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 2005; 96: 69-76
- 17 Bright-Thomas RM, Hargest R. APC, beta-Catenin and hTCF-4; an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 107-117
- 18 Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000; 26: 146-147
- 19 Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997; 275: 1784-1787
- 20 Duval A, Busson-Leconiat M, Berger R, Hamelin R. Assignment of the TCF-4 gene (TCF7L2) to human chromosome band 10q25.3. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88: 264-265
- 21 Duval A, Rolland S, Tubacher E, Bui H, Thomas G, Hamelin R. The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; 60: 3872-3879
- 22 向德兵, 吴晓华, 李增鹏, 刘友生.  $\beta$ -catenin, cyclin D1 和 C-myc 在大肠癌组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 305-308
- 23 Luu HH, Zhang R, Haydon RC, Rayburn E, Kang Q, Si W, Park JK, Wang H, Peng Y, Jiang W, He TC. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 653-671
- 24 Dihlmann S, von Knebel Doeberitz M. Wnt/ $\beta$ -catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int J Cancer* 2005; 113: 515-524
- 25 Kundu JK, Choi KY, Surh YJ. beta-Catenin-mediated signaling: a novel molecular target for chemoprevention with anti-inflammatory substances. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765: 14-24
- 26 Dihlmann S, Siermann A, von Knebel Doeberitz M. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate beta-catenin/TCF-4

#### ■应用要点

分子靶向治疗是肿瘤治疗领域研究的重点方向之一, 是一类极具发展前景的肿瘤治疗策略。Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导途径与大肠癌等多种肿瘤的发生密切相关, 因此可做为分子靶向治疗的潜在靶点。

## ■名词解释

$\beta$ -catenin降解复合体:是由大肠腺瘤息肉蛋白(adenomatous polyposis coli, APC), 轴蛋白(axin), 糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )和酪蛋白激酶1 $\alpha/\epsilon$ (casein kinase, CK1 $\alpha$ )等组成, 其功能在于使 $\beta$ -catenin磷酸化, 而后被泛素-蛋白酶体系统降解。

- 27 signaling. *Oncogene* 2001; 20: 645-653
- 28 Dihlmann S, Klein S, Doeberitz Mv MK. Reduction of  $\beta$ -catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated  $\beta$ -catenin. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 509-516
- 29 Boon EM, Keller JJ, Wormhoudt TA, Giardiello FM, Offerhaus GJ, van der Neut R, Pals ST. Sulindac targets nuclear  $\beta$ -catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2004; 90: 224-229
- 30 Brown WA, Skinner SA, Vogliagis D, O'Brien PE. Inhibition of  $\beta$ -catenin translocation in rodent colorectal tumors: a novel explanation for the protective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2314-2321
- 31 Gardner SH, Hawcroft G, Hull MA. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on  $\beta$ -catenin protein levels and catenin-related transcription in human colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2004; 91: 153-163
- 32 Smith ML, Hawcroft G, Hull MA. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer* 2000; 36: 664-674
- 33 Hawcroft G, D'Amico M, Albanese C, Markham AF, Pestell RG, Hull MA. Indomethacin induces differential expression of  $\beta$ -catenin, gamma-catenin and T-cell factor target genes in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2002; 23: 107-114
- 34 Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo MM, Evans JF. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001; 61: 1733-1740
- 35 McEntee MF, Chiu CH, Whelan J. Relationship of  $\beta$ -catenin and Bcl-2 expression to sulindac-induced regression of intestinal tumors in Min mice. *Carcinogenesis* 1999; 20: 635-640
- 36 Lee EJ, Park HG, Kang HS. Sodium salicylate induces apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells through activation of p38MAPK. *Int J Oncol* 2003; 23: 503-508
- 37 Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Hara A, Shimizu M, Kuno T, Katayama M, Qiao Z, Mori H. Suppression of occurrence and advancement of  $\beta$ -catenin-accumulated crypts, possible premalignant lesions of colon cancer, by selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 617-623
- 38 Maier TJ, Janssen A, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch S. Targeting the  $\beta$ -catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J* 2005; 19: 1353-1355
- 39 Noda M, Tatsumi Y, Tomizawa M, Takama T, Mitsufuji S, Sugihara H, Kashima K, Hattori T. Effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the expression of E-cadherin-catenin complexes in gastrointestinal cell lines. *J Gastroenterol* 2002; 37: 896-904
- 40 Roy HK, Karoski WJ, Ratashak A, Smyrk TC. Chemoprevention of intestinal tumorigenesis by nabumetone: induction of apoptosis and Bcl-2 downregulation. *Br J Cancer* 2001; 84: 1412-1416
- 41 Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB. Chemo-sensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1630-1647
- 42 Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 768-780
- 43 Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S.  $\beta$ -catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 8414-8427
- 44 Orner GA, Dashwood WM, Blum CA, Diaz GD, Li Q, Dashwood RH. Suppression of tumorigenesis in the Apc(min) mouse: down-regulation of  $\beta$ -catenin signaling by a combination of tea plus sulindac. *Carcinogenesis* 2003; 24: 263-267
- 45 Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 893-903
- 46 Choi BT, Cheong J, Choi YH.  $\beta$ -Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF- $\kappa$ B in human colon cancer HCT-116 cells. *Anticancer Drugs* 2003; 14: 845-850
- 47 Wang D, Xiang DB, He YJ, Li ZP, Wu XH, Mou JH, Xiao HL, Zhang QH. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4008-4012
- 48 Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, Li Z, Xie J. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the  $\beta$ -catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 753-762
- 49 向德兵, 王东, 牟江洪, 仲召阳, 肖华亮, 张沁宏, 李增鹏. 咖啡酸苯乙酯对人大肠癌HCT116细胞裸鼠皮下移植瘤生长的影响. *解放军医学杂志* 2005; 30: 953-955
- 50 Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of  $\beta$ -catenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12103-12108
- 51 Danilkovitch-Miagkova A. Oncogenic signaling pathways activated by RON receptor tyrosine kinase. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3: 31-40
- 52 Zhou L, An N, Haydon RC, Zhou Q, Cheng H, Peng Y, Jiang W, Luu HH, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, Breyer B, He TC. Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the  $\beta$ -catenin signaling activity. *Cancer Lett* 2003; 193: 161-170
- 53 Dkhissi F, Lu H, Soria C, Opolon P, Griscelli F, Liu H, Khattar P, Mishal Z, Perricaudet M, Li H. Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 997-1008
- 54 Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, Kale S, Tang J, Hu G, Chan B, Ramchandran R, Jha V, Sukhatme VP, Sokol S. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. *J Cell Biol* 2002; 158: 529-539
- 55 Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivdasani RA. Small-molecule antagonists of the



- oncogenic Tcf/ $\beta$ -catenin protein complex. *Cancer Cell* 2004; 5: 91-102
- 55 Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N. Siah-1 mediates a novel  $\beta$ -catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* 2001; 7: 927-936
- 56 Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for  $\beta$ -catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 2001; 7: 915-926
- 57 Rother K, Johne C, Spiesbach K, Haugwitz U, Tschoep K, Wasner M, Klein-Hitpass L, Moroy T, Mossner J, Engeland K. Identification of Tcf-4 as a transcriptional target of p53 signalling. *Oncogene* 2004; 23: 3376-3384
- 58 Roh H, Green DW, Boswell CB, Pippin JA, Drebin JA. Suppression of  $\beta$ -catenin inhibits the neoplastic growth of APC-mutant colon cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6563-6568
- 59 Green DW, Roh H, Pippin JA, Drebin JA.  $\beta$ -catenin antisense treatment decreases  $\beta$ -catenin expression and tumor growth rate in colon carcinoma xenografts. *J Surg Res* 2001; 101: 16-20
- 60 van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FC, Brummelkamp TR, Agami R, Clevers H. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 2003; 4: 609-615
- 61 Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. Small interfering RNAs directed against  $\beta$ -catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1291-1300
- 62 Brunori M, Malerba M, Kashiwazaki H, Iggo R. Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway. *J Virol* 2001; 75: 2857-2865
- 63 Malerba M, Daeffler L, Rommelaere J, Iggo RD. Replicating parvoviruses that target colon cancer cells. *J Virol* 2003; 77: 6683-6691
- 64 Seki Y, Yamamoto H, Yee Ngan C, Yasui M, Tomita N, Kitani K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Albanese C, Kaneda Y, Pestell RG, Monden M. Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic  $\beta$ -catenin/T-cell factor pathway. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 985-994

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《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,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com。

# 单甲氧基聚乙二醇对大鼠胰岛的免疫修饰作用

赵刚, 崔静, 黎少山, 殷涛, 胡伟国, 吴河水, 王春友

## ■背景资料

胰岛移植作为治疗糖尿病的有效措施之一, 是目前细胞移植研究的热点之一. 特别是胰岛干细胞培养及分化研究的迅速进展, 使得免疫排斥反应成为胰岛移植临床应用的主要限制因素.

赵刚, 崔静, 黎少山, 殷涛, 胡伟国, 吴河水, 王春友, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022

赵刚, 博士, 讲师, 毕业于华中科技大学同济医学院, 现工作于附属协和医院胰腺外科中心, 主要从事胰腺疾病基础与临床研究.

湖北省卫生厅青年科技人才资助项目, No. QJX2005-4

通讯作者: 王春友, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心. chunyouwang52@126.com

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-07-19

## Immune modification of rat islet by methoxy-polyethylene glycol

Gang Zhao, Jing Cui, Shao-Shan Li, Tao Yin, Wei-Guo Hu, He-Shui Wu, Chun-You Wang

Gang Zhao, Jing Cui, Shao-Shan Li, Tao Yin, Wei-Guo Hu, He-Shui Wu, Chun-You Wang, Pancreatic Surgery Center of Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Supported by Young Scholar Foundation of Health Department of Hubei Province, No. QJX2005-4

Correspondence to: Chun-You Wang, Pancreatic Surgery Center of Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. chunyouwang52@126.com

Received: 2006-05-08 Accepted: 2006-07-19

## Abstract

**AIM:** To investigate the insulin secretion changes of rat islets after immune modification of methoxy-polyethylene glycol (mPEG).

**METHODS:** The islets isolated from Wistar rats were divided into control group and mPEG-treated groups (with 200, 300 and 400 g/L mPEG, respectively). After culture for 24 h, the viability of islets was detected by dithizone staining, and insulin secretion function was examined by glucose stimulation test. The islets from different groups were mixed with splenic lymphocyte from SD rats to evaluate the immunogenicity.

**RESULTS:** The viability of islets or the insulin secretion function in the three treatment groups was not significantly different from that in the control group. However, the cytotoxicity rates in mPEG-treated groups were markedly lower

than those in the control group (24.7%, 14.8%, 21.4% vs 69.5%,  $t = 2.378, 2.584, 2.472$ , all  $P < 0.05$ ). Furthermore, the cytotoxicity in the islets treated with 300 g/L mPEG was the lowest (14.8% vs 24.7%, 21.4%,  $t = 2.285, 2.383$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** mPEG can mask the immunogenicity of rat islets while hardly affect the viability and insulin secretion.

**Key Words:** Islet; Methoxy-polyethylene glycol; Immune modification

Zhao G, Cui J, Li SS, Yin T, Hu WG, Wu HS, Wang CY. Immune modification of rat islet by methoxy-polyethylene glycol. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2480-2483

## 摘要

**目的:** 研究单甲氧基聚乙二醇(mPEG 5000)对Wistar大鼠胰岛表面抗原的掩蔽作用及对胰岛素分泌功能的影响.

**方法:** 分离Wistar大鼠的胰岛, 对照组不进行任何处理, 处理组分别用200, 300, 400 g/L mPEG包裹, 培养24 h后分别用双硫腍染色检测胰岛细胞活性、葡萄糖刺激实验检测胰岛的分泌功能改变, 取SD大鼠脾淋巴细胞分别与上述各组胰岛进行混合培养, 通过杀伤实验检测胰岛免疫原性.

**结果:** 与对照组相比, 不同浓度mPEG包裹对大鼠胰岛活性及胰岛素分泌功能无明显影响, 不同浓度处理组的胰岛细胞杀伤率均明显低于对照组(24.7%, 14.8%, 21.4% vs 69.5%,  $t = 2.378, 2.584, 2.472$ ,  $P$ 均 $<0.05$ ), 但300 g/L mPEG处理组的杀伤率最低(14.8% vs 24.7%, 21.4%,  $t = 2.285, 2.383$ ,  $P$ 均 $<0.05$ ).

**结论:** mPEG有效掩蔽大鼠胰岛表面抗原, 且不影响胰岛细胞的活性及胰岛素分泌功能, 具有较好的免疫修饰作用.

**关键词:** 胰岛; 单甲氧基聚乙二醇; 免疫修饰

赵刚, 崔静, 黎少山, 殷涛, 胡伟国, 吴河水, 王春友. 单甲氧

## ■研发前沿

目前多用生物材料制成免疫隔离装置如中空纤维、血管内装置, 或以海藻酸钠-聚赖氨酸为基础的大包裹或微包裹, 通过免疫隔离作用有效地延长了胰岛移植存活时间, 但仍然存生物相容性不够, 物质交换和胰岛素分泌障碍等缺陷. 新型高分子生物材料mPEG给胰岛移植带来新的希望.

基聚乙二醇对大鼠胰岛的免疫修饰作用. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2480-2483

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2480.asp

## 0 引言

胰岛移植由于简单易行和安全性高的特点, 近年来在糖尿病的细胞治疗中受到愈来愈多的关注, 但强烈的移植排斥反应限制了胰岛移植在临床中的应用<sup>[1]</sup>. 我们采用有机高分子材料单甲氧基聚乙二醇(methoxy-polyethylene glycol, mPEG)包裹大鼠胰岛细胞, 利用mPEG对细胞表面抗原免疫掩蔽作用, 观察其对胰岛免疫原性及胰岛细胞生物活性的影响, 以探讨其用于胰岛移植时免疫修饰的可行性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Wistar和SD大鼠, 体质量250-300 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供; mPEG ( $M_n$  5000, mPEG-SPA)、V型胶原酶、链脲佐菌素(STZ)、RPMI 1640购自Sigma公司; Ficoll 400购自Pharmacia公司; 小牛血清购自Gibico公司.  $^{125}$ I-胰岛素放射免疫分析试剂盒购自北京原子能研究所. Wistar大鼠进行胰管原位插管, 灌注V型胶原酶(38℃, 0.5 g/L, 含7.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 的Hanks液, pH 7.8) 4 mL, 使胰腺充分膨胀, 原位消化5 min. 处死并完整摘除胰腺, 置于上述V型胶原酶溶液6 mL中, 将胰腺剪碎, 38℃水浴振荡消化30 min. 用Ficoll 400进行不连续密度梯度(250, 230, 200, 110 g/L)离心, 吸取23%-20%, 20%-11%界面细胞, 即为纯化的胰岛细胞. 经V型胶原酶消化分离, Ficoll 400密度梯度纯化, 制备的胰岛纯度为95%, 光镜下DTZ染色后, 胰岛细胞团染成腥红色或红色, 外分泌组织不着色, 呈圆形、椭圆形或不规则形. 分离纯化后的组织悬液用双硫脲(双硫脲10 mg, 无水乙醇3 mL, 250 g/L氨水50 mL)进行染色, 挑取100个当量(每1个胰岛当量相当于直径150  $\mu\text{m}$ 的胰岛细胞团)的胰岛细胞, 置于37℃, 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养<sup>[1]</sup>.

### 1.2 方法

**1.2.1 mPEG包裹胰岛** 将培养1 d的胰岛用PBS洗涤2次. 将洗涤后的胰岛悬浮于含有11 mmol/L葡萄糖的PBS 500  $\mu\text{L}$ 中(pH 8.0). 分别称取mPEG 0.10, 0.15, 0.20 g, 完全溶于上述悬液中, 使mPEG的终浓度为200 g/L(A组), 300 g/L(B组), 400 g/L(C组), 置于 $\text{CO}_2$ 的培养箱中反应1 h, PBS

表1 mPEG包裹对大鼠胰岛分泌功能的影响 (mean  $\pm$  SD,  $\mu\text{U/L}$ )

糖相	对照组	mPEG		
		200 g/L	300 g/L	400 g/L
低	6.63 $\pm$ 1.74	5.49 $\pm$ 1.56	5.91 $\pm$ 1.80	5.54 $\pm$ 1.27
高	25.85 $\pm$ 5.22	24.23 $\pm$ 4.86	25.29 $\pm$ 4.77	23.43 $\pm$ 4.31

洗涤1次后继续培养.

**1.2.2 葡萄糖刺激实验** 将不同组胰岛分别置低糖(含2.8 mmol/L葡萄糖)和高糖(含16.7 mmol/L葡萄糖+10 mmol/L氨茶碱),  $\text{CO}_2$ 的培养箱中孵育4 h, 放射免疫法检测培养液中的胰岛素含量.

**1.2.3 同种异体脾脏淋巴细胞对胰岛杀伤实验** 无菌取出SD大鼠脾脏组织, 碾磨法获取细胞悬液后用Tris- $\text{NH}_4\text{Cl}$ 溶解红细胞, 多次洗涤后获取淋巴细胞悬液并计数, 调节细胞浓度至 $1 \times 10^8/\text{L}$ . 以对照组和不同浓度mPEG处理组胰岛为靶细胞进行细胞毒实验, 分别以不同效靶比(12.5:1, 25:1, 50:1, 100:1)培养72 h, 倒置显微镜动态观察胰岛及淋巴细胞形态改变, 终止反应后加入100  $\mu\text{L}$ 乳酸脱氢酶(LDH)室温反应10-30 min, 在酶标仪570 nm处测A值以评定细胞杀伤率(%) = (杀伤组A值-阴性对照组A值)/(最大释放组A值-阴性对照组A值)  $\times 100\%$ <sup>[2]</sup>.

**统计学处理** 应用SPSS软件对各组试验数据进行统计学分析.

## 2 结果

**2.1 胰岛体外生物学活性** 培养3 d, 用葡萄糖刺激实验检测表明, 不同组胰岛细胞的胰岛素分泌功能无明显差异(表1).

**2.2 体外混合培养同种异体大鼠脾淋巴细胞与胰岛** 对照组16 h后胰岛周围出现明显的淋巴细胞聚集现象, 24 h后出现胰岛破坏, 48 h被破坏胰岛逐渐增多; 实验组16 h后胰岛周围未出现明显的淋巴细胞聚集现象. 连续观察72 h以上, 仅出现少量被破坏胰岛(图1). 细胞杀伤实验表明各处理组的最大杀伤率分别为24.7%, 14.8%, 21.4%, 均显著低于对照组(69.5%,  $t = 2.378$ , 2.584, 2.472,  $P < 0.05$ ); 其中300 g/L mPEG组杀伤率最低( $P < 0.05$ , 图2).

## 3 讨论

胰岛移植作为治疗糖尿病的有效措施之一, 正受到愈来愈多的关注, 然而移植排斥反应限制

## ■ 相关报道

文献报道, 将mPEG衍生物用于修饰红细胞的ABH血型抗原和淋巴细胞的HLA抗原, 有效降低红细胞的免疫原性, 但对于mPEG对胰岛免疫修饰的研究则甚少.

## ■ 创新盘点

与以往应用生物材料包裹胰岛细胞从而产生免疫隔离效应不同, 该研究应用mPEG的甲氧基团与胰岛表面MHC抗原分子的氨基酸残基结合, 使同种异体淋巴细胞不能识别胰岛表面MHC抗原分子, 从而发挥免疫修饰作用. 同时证实mPEG对与胰岛细胞的生物活性没有显著影响, 为mPEG的临床应用提供理论基础.



### ■应用要点

本研究从反应浓度的角度,初步探讨了最佳反应条件.为进一步改善免疫修饰作用,则应从反应时间,并以mPEG为基本基团加上不同改构残基等角度进行深入研究.

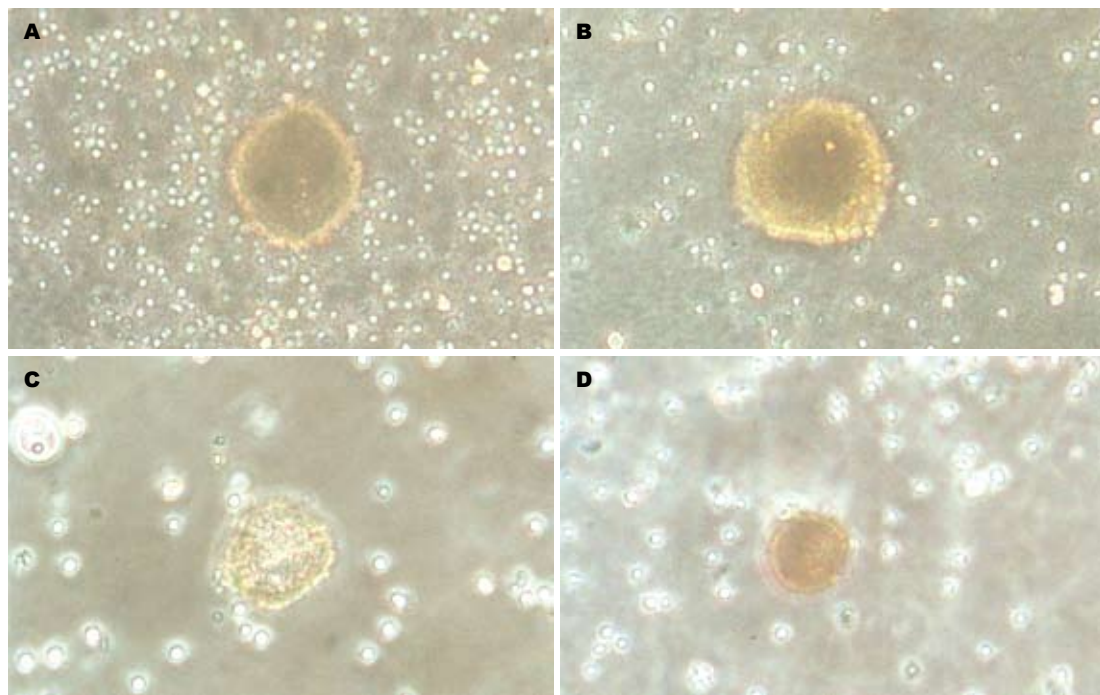


图1 同种异体脾脏淋巴细胞与Wistar大鼠胰岛混合培养结果(倒置显微镜×200). A: 对照; B: 200 g/L mPEG; C: 300 g/L mPEG; D: 400 g/L mPEG.

其在临床广泛应用. 近来研究表明, 利用生物材料制成免疫隔离装置如中空纤维、血管内装置、以海藻酸钠-聚赖氨酸为基础的大包裹或微包裹, 可有效隔离胰岛细胞与免疫细胞, 使免疫细胞不能直接损伤胰岛, 从而避免或缓解排斥反应的发生. 但他仍然存在着诸多缺陷: (1)材料的生物相容性不够, 使巨噬细胞在局部聚集发生纤维化进而造成隔离装置的降解; (2)尽管隔离装置为生物半透膜, 仍然在一定程度上存在着物质交换和胰岛素分泌障碍; (3)免疫球蛋白和补体仍然可能穿透生物材料并对胰岛造成损伤. 因此需要发展新的生物材料以进一步改善胰岛移植效果<sup>[3-4]</sup>. 最近研究发现, 有机高分子化合物mPEG具有与蛋白质大分子结合后遮蔽其抗原性的特点. mPEG是以聚乙二醇为骨架的线性高分子化合物, 具有许多优良的化学特性, 无免疫原性、低毒, 其惰性基团-甲氧基, 可与不同的氨基酸残基通过胺酯键形成稳定的化学连接<sup>[5]</sup>, 在细胞表面形成一层由线性单链mPEG构成的水化膜具有屏障作用, 可在细胞表面的受体与其相应的配体间形成空间位阻, 阻断受体与配体的结合和识别. 文献报道, 将mPEG衍生物用于修饰红细胞的ABH血型抗原和淋巴细胞的HLA抗原, 有效降低红细胞和淋巴细胞的免疫原性, 但对于mPEG对胰岛免疫修饰的研究则

### ■名词解释

1 免疫隔离: 是指通过生物材料包裹胰岛细胞, 有效隔离胰岛细胞与免疫细胞, 使免疫细胞不能直接损伤胰岛, 从而避免或缓解排斥反应的发生.

2 免疫修饰: 是指mPEG的惰性基团-甲氧基, 可与不同的氨基酸残基通过胺酯键形成稳定的化学连接, 在细胞表面形成一层由线性单链mPEG构成的水化膜具有屏障作用, 可在细胞表面的受体与其相应的配体间形成空间位阻, 阻断受体与配体的结合和识别, 使免疫细胞不能识别胰岛素表面的MHC抗原, 从而避免排斥反应的发生.

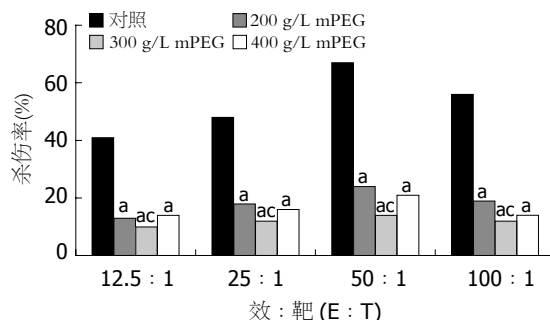


图2 同种异体脾脏淋巴细胞对Wistar胰岛杀伤效应. \* $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 200 g/L和400 g/L mPEG处理组.

甚少<sup>[6-8]</sup>.

我们通过同种异体胰岛淋巴细胞混合反应模拟体内胰岛移植模型, 观察到SD大鼠淋巴细胞对mPEG修饰的Wistar大鼠胰岛的杀伤效应明显降低, 表明mPEG通过其甲氧基与胰岛表面MHC抗原分子的氨基酸残基结合, 使同种异体淋巴细胞不能识别胰岛表面MHC抗原分子, 从而避免诱导免疫排斥反应. 为探讨mPEG包裹的最佳反应浓度, 我们采用200, 300, 400 g/L 3种不同浓度的mPEG进行包裹. 结果显示300 g/L mPEG包裹后的胰岛的免疫原性最弱, 表明mPEG浓度过高或过低均可能使mPEG与表面抗原氨基酸残基不能达到饱和连接, 从而仍有可

能诱导不同程度的免疫排斥反应. 为进一步探讨mPEG用于体内胰岛移植的安全性, 我们还检测了mPEG包裹后胰岛活性及胰岛素分泌功能的改变. 结果表明, 对照组与各实验组在培养不同时间细胞存活率无明显改变, 同时低糖相、高糖相的胰岛素分泌水平无显著性差异. 提示mPEG与以往的免疫隔离材料不同, 他并非在胰岛表面形成一层包膜, 因而不影响胰岛与外环境的物质交换以及胰岛素分泌和释放. 本研究表明, mPEG对胰岛细胞具有较好的免疫修饰作用, 化学性质稳定且不影响胰岛的生物活性, 但应对不同残基衍生物及反应条件进一步优化以有效缓解胰岛移植排斥反应.

#### 4 参考文献

- 1 赵刚, 王芳, 王春友. 转化生长因子- $\beta_1$ 基因修饰树突状细胞诱导异种胰岛移植耐受. 中华普通外科杂志 2005; 20: 428-431
- 2 赵刚, 王芳, 王春友. 抗原负载的免疫缺陷树突状细胞诱导异种胰岛移植耐受. 中国免疫学杂志 2005; 21: 608-611
- 3 Sutherland DE. Current status of beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus. *Transplant Proc* 2003; 35: 1625-1627
- 4 de Vos P, van Hoogmoed CG, van Zanten J, Netter S, Strubbe JH, Busscher HJ. Long-term biocompatibility, chemistry, and function of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials* 2003; 24: 305-312
- 5 Chen AM, Scott MD. Current and future applications of immunological attenuation via pegylation of cells and tissue. *BioDrugs* 2001; 15: 833-847
- 6 Murad KL, Gosselin EJ, Eaton JW, Scott MD. Stealth cells: prevention of major histocompatibility complex class II-mediated T-cell activation by cell surface modification. *Blood* 1999; 94: 2135-2141
- 7 Jang JY, Lee DY, Park SJ, Byun Y. Immune reactions of lymphocytes and macrophages against PEG-grafted pancreatic islets. *Biomaterials* 2004; 25: 3663-3669
- 8 李伟, 张印则, 周华友, 兰炯采, 章扬培, 张志欣. mPEG修饰HLA抗原的方法学研究. 生命科学研究 2003; 7: 374-376

#### ■同行评价

糖尿病是人类常见多发病, 其发病机制及治疗的研究是医学研究的难点之一. 最近, 异体或异种胰岛细胞移植是治疗糖尿病新探索. 本研究立足于研究单甲氧基聚乙二醇(mPEG 5000)对Wistar大鼠胰岛表面抗原的掩蔽作用及对胰岛素分泌功能的影响, 以解决胰岛细胞异体移植的排斥反应. 该研究选题新颖, 具有很强的科研价值.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

#### ●消息●

### 专家门诊

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

# CGRP在大鼠胃痛觉过敏形成机制中的作用

章菲菲, 莫剑忠, 吕有灵, 陈胜良, 吕 鸣, 张珏莹, 杨 龙

## ■背景资料

内脏敏感性增高是临床上一大类功能性消化系统疾病如: 肠易激综合征、功能性消化不良的重要发病机制之一, 但是内脏感觉过敏的产生机制尚无定论。对于肠易激综合征和功能性消化不良等疾病的治疗效果有限。目前已证实无论是中枢还是外周CGRP的释放均参与内脏敏感性变化。

章菲菲, 吕有灵, 吕鸣, 张珏莹, 杨龙, 武警上海总队医院消化科上海市 201103

莫剑忠, 陈胜良, 上海交通大学附属仁济医院消化科 上海市 200001

章菲菲, 2005年上海交通大学医学院博士, 主治医师, 主要从事功能性消化系统疾病的研究。

通讯作者: 莫剑忠, 200001, 上海市山东中路145号, 上海交通大学附属仁济医院消化科. jianzhong\_mo@hotmail.com

收稿日期: 2006-06-08 接受日期: 2006-07-10

## Role of calcitonin gene-related peptide in gastric hypersensitivity in rats

Fei-Fei Zhang, Jian-Zhong Mo, You-Ling Lv, Sheng-Liang Chen, Ming Lv, Jue-Ying Zhang, Long Yang

Fei-Fei Zhang, You-Ling Lv, Ming Lv, Jue-Ying Zhang, Long Yang, Department of Gastroenterology, Shanghai General Hospital of Armed Police, Shanghai 201103, China  
Jian-Zhong Mo, Sheng-Liang Chen, Shanghai Institute of Digestive Disease; Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China

Correspondence to: Jian-Zhong Mo, Shanghai Institute of Digestive Disease; Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China. jianzhong\_mo@hotmail.com

Received: 2006-06-08 Accepted: 2006-07-10

## Abstract

**AIM:** To explore the role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in gastric distention-induced visceral pain in conscious rats.

**METHODS:** Balloons were implanted into the stomach of 24 male Sprague Dawley rats. In this study we observed the following outcomes: (1) effects of noxious distention or CGRP intravenous injection on gastric sensitivity; (2) effects of a specific CGRP receptor antagonist, hCGRP8-37 on gastric hypersensitivity; (3) relationship between the doses of CGRP & hCGRP8-37 and their effects on gastric sensitivity. Gastric sensitivity was evaluated with gastric pain threshold determined by electromyography (EMG) of the neck muscles.

**RESULTS:** After intravenous injection of CGRP, the values of gastric pain threshold were  $11.7 \pm 2.6$ ,  $19.2 \pm 2.0$ , and  $18.3 \pm 2.5$  mmHg in experi-

ment group, operation control group, and normal saline group, respectively, and there was significant difference between the former one and latter two ( $P < 0.05$ ). CGRP down-regulated the gastric pain threshold. hCGRP8-37 reversed the harmful gastric distention, and inhibited the gastric hypersensitivity in a dose-dependent manner ( $r = 0.821$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Gastric distention can stimulate the gastric hypersensitivity, in which CGRP plays an important role.

**Key Words:** Functional dyspepsia; Visceral afferent; Calcitonin gene-related peptide

Zhang FF, Mo JZ, Lv YL, Chen SL, Lv M, Zhang JY, Yang L. Role of calcitonin gene-related peptide in gastric hypersensitivity in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2484-2487

## 摘要

**目的:** 探索降钙素基因相关肽(CGRP)相关的干预措施对胃痛觉过敏的影响, 了解CGRP在胃痛觉过敏形成过程中发挥的作用。

**方法:** 成年SD ♂大鼠, 均植入胃内气囊。观察伤害性扩张或CGRP iv对大鼠疼痛阈值的影响; 观察由上述措施诱发内脏过敏的大鼠在给予CGRP受体特异性拮抗剂hCGRP8-37后疼痛阈值的变化; 观察不同剂量CGRP和hCGRP8-37对疼痛阈值的影响。

**结果:** CGRP iv后胃疼痛阈值为  $11.7 \pm 2.6$  mmHg, 对照组疼痛阈值为  $19.2 \pm 2.0$  mmHg, 生理盐水对照组则为  $18.3 \pm 2.5$  mmHg, 实验组与其他两组比较  $P$  均  $< 0.05$ 。CGRP使大鼠的疼痛阈值降低。hCGRP8-37能逆转伤害性扩张和CGRP引起的内脏敏感性增高, 该作用呈剂量依赖性( $r = 0.821$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 胃扩张刺激能引起胃敏感性增高, 在此过程中CGRP具有重要的作用。

**关键词:** 功能性消化不良; 内脏传入神经; 降钙素基因相关肽

章菲菲, 莫剑忠, 吕有灵, 陈胜良, 吕鸣, 张珏莹, 杨龙. CGRP在大鼠胃痛觉过敏形成机制中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2484-2487

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2484.asp>

## 0 引言

功能性消化不良与内脏神经感觉敏感性增高有关, 且后者具有特异性<sup>[1]</sup>. 早已证实胃肠道有降钙素基因相关肽(CGRP)神经纤维存在, 辣椒素敏感的神经纤维中80% CGRP免疫反应阳性, 而且在脊髓背根神经节内也发现CGRP免疫反应阳性的神经元, 这些神经元接受无髓鞘感觉神经纤维的投射. 现认为无论是中枢还是外周CGRP的释放均参与内脏敏感性变化. 但是目前关于CGRP与内脏感知的研究主要基于体表疼痛模型, 而且与内脏敏感性改变的研究主要集中在直肠和乙状结肠<sup>[2-6]</sup>, 对CGRP在胃等其他部位刺激传入方面的作用尚无报道. 已发现伤害性扩张刺激能在中枢神经系统和肠神经系统诱导CGRP和c-Fos的表达<sup>[7]</sup>, 而且二者的表达具有相关性. 我们通过探索CGRP相关的干预措施对胃痛觉过敏的影响, 了解CGRP在胃痛觉过敏形成过程中发挥的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 成年SD大鼠, ♂, 体质量350-400 g, 购自中科院上海实验动物中心; 乳胶气囊( $I/2.5$  cm,  $D/2$  cm)与聚乙烯导管( $I/10$  cm,  $D/0.2$  cm)为自制; CGRP (rat)和hCGRP8-37购自Sigma; 溶于9 g/L无菌氯化钠溶液. 将所有SD大鼠单独置于笼中饲养, 每12 h昼-夜交替, 尽量保持安静, 实验前给予1 wk时间适应环境.

### 1.2 方法

1.2.1 伤害性胃扩张 适应环境后, 术前禁食12 h, 不禁水, 20 g/L戊巴比妥(40 mg/kg) ip麻醉, 打开腹腔, 游离胃大弯, 在距贲门2 cm处沿胃大弯剪开胃壁约1 cm, 放入气囊. 气囊约占大鼠近端胃的60%, 在不充盈的状态下, 气囊不会阻塞幽门, 也不会阻碍胃排空. 气囊植入前, 先扩张数小时以消除扩张阻力. 气囊的直径一定要超过大鼠胃的内径, 否则扩张时测得的压力不能反映胃内的压力. 再次确定气囊是否完好, 缝合胃壁, 固定气囊, 逐层缝合胃壁, 气囊所连接的导管经皮下隧道固定于大鼠颈部. 术后当天禁食, 次日按常规喂养, 观察其腹部体征和排便情况. 48 h后将大鼠放置于特制的笼内, 固定. 气囊通过导

管连接压力计, 行时相性胃扩张(80 mmHg, 每扩张20 min间歇10 min)2 h. 在颈部肌肉中植入3枚不锈钢电极, 用丝线固定, 所接导线与气囊导管固定于大鼠颈部的同一水平. 在刺激过程中将颈部电极与肌电仪相连接, 起始扩张压力为5 mmHg, 每次增加5 mmHg, 记录颈部肌肉的电位, 当颈肌电位达到基础值的2倍时, 此时的扩张强度就作为疼痛阈值<sup>[8]</sup>. 所有大鼠均接受胃内气囊和颈肌电极植入, 实验组行伤害性扩张或CGRP处理, 溶剂对照组使用生理盐水iv.

1.2.2 实验步骤 (1)在伤害性扩张(80 mmHg)或CGRP (500 ng) iv预处理后, hCGRP8-37 (30  $\mu$ g) iv(通过颈静脉), 10 min后测定疼痛阈值. 设溶剂对照组、手术对照组. (2)给予未经伤害性扩张刺激的大鼠不同剂量(250, 500和750 ng)的CGRP iv, 10 min后测定疼痛阈值. (3)在伤害性扩张诱发胃痛觉过敏后, 给予不同剂量(7.5, 15, 30和60  $\mu$ g)的hCGRP8-37 iv(通过颈静脉), 10 min后测定疼痛阈值. (4)在伤害性扩张或CGRP (500 ng) iv预处理后, hCGRP8-37 (30  $\mu$ g)鞘内注射, 10 min后测定疼痛阈值. 实验分组均采用随机方法进行.

**统计学处理** 疼痛阈值用均值 $\pm$ 标准差表示, 各组间差异用方差分析,  $P<0.05$ 定为差异显著. 剂量与效应的相关性采用Spearman相关分析法. 使用SPSS 10.0软件完成统计分析.

## 2 结果

2.1 伤害性扩张和CGRP对大鼠胃疼痛阈值的影响 在对大鼠伤害性扩张或CGRP注射前先进行随机化分组, 经测定各组间疼痛阈值无显著差异( $P>0.05$ ). 大鼠经历伤害性扩张刺激后, 胃疼痛阈值显著降低, 为 $9.2\pm 2.0$  mmHg, 对照组则为 $17.5\pm 4.2$  mmHg ( $P<0.05$ ). CGRP iv后胃疼痛阈值为 $11.7\pm 2.6$  mmHg, 对照组疼痛阈值为 $19.2\pm 2.0$  mmHg, 生理盐水对照组则为 $18.3\pm 2.5$  mmHg, 实验组与其他两组比较 $P$ 均 $<0.05$ . 当CGRP iv剂量达到500 ng后, 胃疼痛阈值显著降低(500 ng时 $P<0.05$ , 750 ng时 $P<0.01$ ), 阈值的下降与剂量相关( $r_s=0.821$ ,  $P<0.01$ , 图1).

2.2 hCGRP8-37 iv对胃高敏大鼠疼痛阈值的影响 在扩张引起的胃痛觉过敏的大鼠, hCGRP8-37 (30  $\mu$ g) iv后使其疼痛阈值恢复至正常( $16.7\pm 5.2$  mmHg). 在CGRP引起的胃痛觉过敏的大鼠, hCGRP8-37 (30  $\mu$ g) iv后使其疼痛阈值恢复( $20.0\pm 3.2$  mmHg), 接近正常(图2). 当hCGRP8-37 iv

## ■ 研究前沿

最近临床研究发现, 存在胃感觉过敏的功能性消化不良患者胃组织中的CGRP含量高于对照组. Chan *et al*发现在直肠敏感性增高的大便秘结患者中, 其直肠黏膜下神经丛的CGRP阳性神经纤维增多, 这与在动物实验中获得的信息一致. 目前有关胃扩张性刺激在延髓以上的传导途径和刺激后肠神经系统活动情况的资料较少, 同时关于CGRP与内脏敏感性改变的研究主要集中在直肠和乙状结肠, 对CGRP在胃等其他部位刺激传入方面的作用报道很少.



### ■应用要点

通过CGRP相关干预措施对大鼠内脏敏感性影响的观察,进一步证实胃敏感性增高过程中CGRP具有重要的作用,这可能对临床有关疾病的治疗具有一些参考价值。

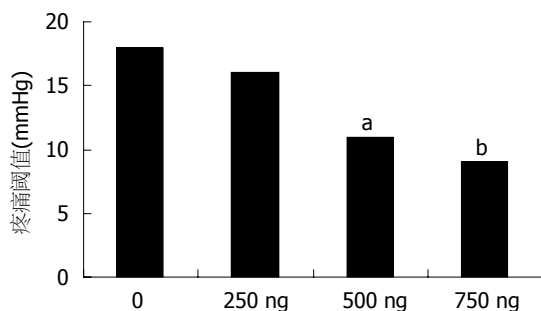


图1 不同剂量CGRP对胃疼痛阈值的影响。<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 前两组。

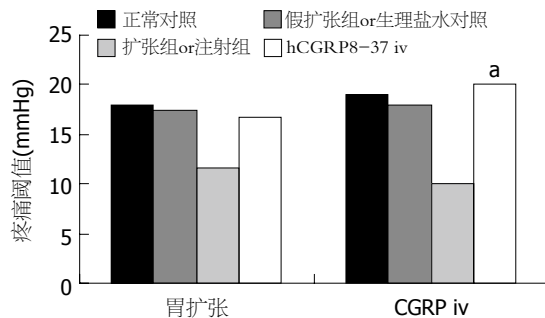


图2 hCGRP8-37 iv对胃高敏大鼠疼痛阈值的影响。<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 注射前。

剂量达到15  $\mu$ g后,因扩张引起的降低的阈值出现上升,15  $\mu$ g时为 $12.5 \pm 2.9$  mmHg,30  $\mu$ g时为 $18.8 \pm 2.5$  mmHg,60  $\mu$ g时为 $22.5 \pm 2.9$  mmHg。阈值的上升与剂量相关( $r_s = 0.821$ ,  $P<0.01$ )。

2.3 hCGRP8-37鞘内注射对胃高敏大鼠疼痛阈值的影响 在扩张引起的胃痛觉过敏的大鼠, hCGRP8-37 (30  $\mu$ g)鞘内注射后使其疼痛阈值恢复至正常( $17.5 \pm 2.9$  mmHg)。在CGRP引起的胃痛觉过敏的大鼠, hCGRP8-37 (30  $\mu$ g)鞘内注射后使其疼痛阈值恢复( $21.5 \pm 4.8$  mmHg),接近正常(图3)。

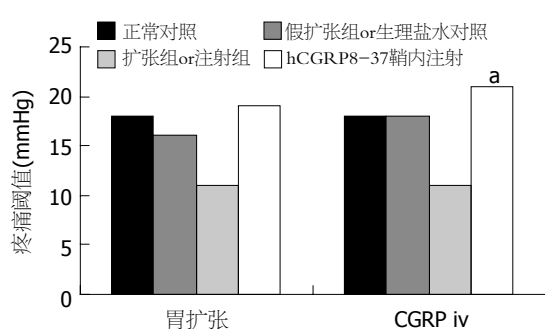


图3 hCGRP8-37鞘内注射对胃高敏大鼠疼痛阈值的影响。<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 注射前。

### 3 讨论

气囊扩张引起的内脏感觉阈值改变见于大多数肠易激综合征患者<sup>[9]</sup>,这种内脏敏感性变化似乎是患者既往内脏传入机制致敏的结果。这种致敏既可以发生在外周或中枢,也可以二者同时发生,但是这种变化的确切机制和参与的递质未明。胃肠道敏感性的评价常利用气囊扩张来完成,因为中空脏器的扩张能模拟自然状态下内脏的刺激方式,而且气囊扩张是一种具有可重复性的可靠的机械性刺激。对于人而言,内脏扩张诱导的感觉或疼痛通过语言表达或视觉分析量表很容易进行评价。唯一需要注意的是应使用标准程序以获得可重复性的数据。就动物而言,由于动物主观的内脏感觉阈值不易获得,因此研究者将注意力转向内脏-内脏(心率、血压、平滑肌收缩)或内脏动力反射如结直肠扩张诱导的腹部收缩。

大多数有关清醒动物胃肠道敏感性的研究使用结肠扩张,利用植入腹外斜肌内的电极监测腹部收缩的频率。其目标大多集中在结直肠敏感性变化,有关上消化道如胃的敏感性改变机制研究较少。由于传入纤维起源和投射不同,例如在大鼠,升结肠和直肠初级传入神经元

胞体位于T13-L2及L6-S2的背根神经节中,而胃的初级传入神经元胞体位于则位于T8-T10,所以结肠扩张获得的数据不能推及到消化道其他部位的扩张。近期研究发现,半数以上的功能性消化不良存在胃饱胀、不适和疼痛的感知阈下降,而胃肠器质性疾病(如消化性溃疡)的患者以及健康人则无上述表现,这表明功能性消化不良与内脏神经感觉敏感性增高有关,且后者具有特异性<sup>[7]</sup>。鉴于临床常见病功能性消化不良与胃痛觉过敏的关系密切,目前对功能性消化不良等疾病的治疗效果有限,因此有必要深入研究内脏敏感性改变的机制,继而探索可行的干预环节,进而寻找安全有效的干预物质,从而才能达到根本改善这类功能性疾病治疗效果的目的。有研究显示,大鼠的胃扩张并不能产生腹部收缩,但是能引起抬头和身体的伸展,因此本研究使用了另一种评价胃敏感性的方法<sup>[8]</sup>。利用非麻醉状态下大鼠颈肌的肌电图作为定量的参数。过去曾用被动的逃避动作来评价清醒大鼠胃扩张对其行为的影响,但这种方法需要多次试验,用于确定疼痛阈值和药物研究时并不方便。研究发现人所能承受的最大胃扩张压力与大鼠接近<sup>[8]</sup>。因此此方法获得的疼痛阈值较可靠。例如,当扩张压力低于10 mmHg时,孤束核神经元的活

动增强。另一方面, 压力必须超过80 mmHg才能诱导孤束核的c-Fos表达。该模型的不足之处是有创伤性。但是气囊植入后大鼠的生存率>95%, 其进食与正常大鼠无异, 手术后3 wk未发现气囊损坏。

辣椒素敏感的传入神经纤维通过免疫组化显示, 多种神经肽类染色阳性, 其中CGRP是在大鼠外来内脏传入神经纤维中具有相当比重的神经肽类物质。CGRP与降钙素(calcitonin, CT)、支链淀粉(amylin, AMY)及肾上腺髓质素同属降钙素家族。他们的胺基端都具有6个氨基酸组成的环状结构。CGRP分为 $\alpha$ CGRP、 $\beta$ CGRP两类, $\alpha$ CGRP是一种由37个氨基酸组成的肽类物质, 由降钙素基因编码。在神经组织中降钙素基因交替拼接合成 $\alpha$ CGRP。 $\beta$ CGRP是 $\alpha$ CGRP的类似物, 在人类两者有3个氨基酸存在差异, 在大鼠仅有1个氨基酸不同。 $\beta$ CGRP有其独特的编码基因, 与CT基因高度相似。 $\alpha$ CGRP和 $\beta$ CGRP发挥相似的生物学作用。传统上将CGRP受体分为两类: CGRP<sub>1</sub>和CGRP<sub>2</sub><sup>[10]</sup>。其中CGRP<sub>1</sub>受体对CGRP的拮抗剂hCGRP8-37较敏感。我们发现, iv CGRP能产生类似伤害性扩张诱发的胃痛觉过敏, CGRP受体特异性的拮抗剂hCGRP8-37能逆转伤害性扩张或CGRP对胃痛觉过敏的诱导作用, 而且CGRP和hCGRP8-37的作用呈剂量依赖性。上述结果与Plourde *et al*<sup>[11]</sup>在结肠的发现类似, 他们使用结肠内乙酸灌注法制造内脏高敏的大鼠模型研究CGRP的作用, 发现iv hCGRP8-37能完全消除乙酸致敏作用, 同时, CGRP iv可增高肠道敏感性, 类似乙酸的作用, 而且, 鞘内注射hCGRP8-37可逆转CGRP iv或乙酸所致的肠道敏感性增高, 其作用呈剂量依赖性。上述事实说明CGRP在消化道致敏过程中发挥重要的作用。

但是根据我们的研究, 不能判断周围CGRP受体在消化道致敏中的确切作用。事实上, 我们发现通过外周给予CGRP能产生伤害性刺激引起的胃痛觉过敏, 提示CGRP在外周能发挥作用, 除非这种神经肽能通过血-脑屏障。CGRP也许既能通过外周又能通过中枢产生痛觉过敏作用, 可能这种作用最初发生于外周, 继发于中枢。

由于CGRP穿透血-脑屏障的机制并不十分清楚, CGRP在该内脏痛觉过敏模型中作用的确切位置尚不能确定。

#### 4 参考文献

- 1 萧树东. 胃肠病学和肝病学-基础理论与临床进展. 第1版. 上海: 世界图书出版公司, 2004: 327-345
- 2 Kawamura M, Kuraishi Y, Minami M, Satoh M. Antinociceptive effect of intrathecally administered antiserum against calcitonin gene-related peptide on thermal and mechanical noxious stimuli in experimental hyperalgesic rats. *Brain Res* 1989; 497: 199-203
- 3 Cridland RA, Henry JL. Effects of intrathecal administration of neuropeptides on a spinal nociceptive reflex in the rat: VIP, galanin, CGRP, TRH, somatostatin and angiotensin II. *Neuropeptides* 1988; 11: 23-32
- 4 Woolf C, Wiesenfeld-Hallin Z. Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate the gain of the nociceptive flexor withdrawal reflex in the rat. *Neurosci Lett* 1986; 66: 226-230
- 5 Welch SP, Singha AK, Dewey WL. The antinociception produced by intrathecal morphine, calcium, A23187, U50,488H, [D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly-ol]enkephalin and [D-Pen2, D-Pen5]enkephalin after intrathecal administration of calcitonin gene-related peptide in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 1-8
- 6 Menard DP, van Rossum D, Kar S, St Pierre S, Sutak M, Jhamandas K, Quirion R. A calcitonin gene-related peptide receptor antagonist prevents the development of tolerance to spinal morphine analgesia. *J Neurosci* 1996; 16: 2342-2351
- 7 Mertz H, Fullerton S, Naliboff B, Mayer EA. Symptoms and visceral perception in severe functional and organic dyspepsia. *Gut* 1998; 42: 814-822
- 8 Rouzade ML, Fioramonti J, Bueno L. A model for evaluation of gastric sensitivity in awake rats. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 157-163
- 9 Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganier M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002; 122: 1771-1777
- 10 Quirion R, Van Rossum D, Dumont Y, St-Pierre S, Fournier A. Characterization of CGRP1 and CGRP2 receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 657: 88-105
- 11 Plourde V, St-Pierre S, Quirion R. Calcitonin gene-related peptide in viscerosensitive response to colorectal distension in rats. *Am J Physiol* 1997; 273: G191-196

#### ■同行评价

鉴于临床常见病功能性消化不良与胃痛觉过敏的关系密切, 目前对功能性消化不良等疾病的治疗效果有限, 因此有必要深入研究内脏敏感性改变的机制, 继而探索可行的干预环节, 寻找安全有效的干预物质, 从而达到根本改善这类功能性疾病治疗效果的目的。本文对于临床了解和诊治功能性消化不良具有较好参考价值。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

# 丹参对内皮素-1介导的肝星状细胞Ca<sup>2+</sup>浓度变化的影响机制

姚冬梅, 房澍名, 杨川杰, 修贺明, 苏素文, 姚希贤

## ■背景资料

肝硬化系内科常见疾病, 严重威胁着人类健康。门脉高压高动力循环是肝硬化腹水形成、上消化道出血、肝肾综合征等严重并发症的病理基础, 其发病机制尚未完全阐明, 目前认为门脉高压的形成系肝内血流阻力以及门脉血流量增加综合作用的结果。多项研究表明肝星状细胞(HSCs)在肝脏微循环调节以及门脉高压的形成中起重要作用。目前他已作为预防和治疗慢性肝病的靶细胞。因此, 能抑制HSCs收缩的药物有可能在门脉高压治疗中发挥重要作用。

姚冬梅, 房澍名, 杨川杰, 姚希贤, 河北医科大学第二医院河北省石家庄市 050000

修贺明, 中国人民解放军白求恩国际和平医院细胞室 河北省石家庄市 050082

苏素文, 河北医科大学基础医学院药理教研室 河北省石家庄市 050017

姚冬梅, 2003年河北医科大学博士, 主治医师, 主要从事慢性肝病研究。

通讯作者: 姚冬梅, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科. ydm8080@126.com

电话: 0311-87222951

收稿日期: 2006-02-16 接受日期: 2006-03-03

## Effects of radix salviae miltiorrhizae on endothelin-1-induced calcium changes in hepatic stellate cells

Dong-Mei Yao, Shu-Ming Fang, Chuan-Jie Yang, He-Ming Xiu, Su-Wen Su, Xi-Xian Yao

Dong-Mei Yao, Shu-Ming Fang, Chuan-Jie Yang, Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

He-Ming Xiu, Department of Cytology, Chinese PLA Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Su-Wen Su, Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Correspondence to: Dr. Dong-Mei Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. ydm8080@126.com

Received: 2006-02-16 Accepted: 2006-03-03

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of radix salviae miltiorrhizae (RSM) on the changes of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by endothelin-1 (ET-1) in hepatic stellate cells (HSCs).

**METHODS:** After preparation of RSM cream, the effects of RSM on ET-1-induced changes of HSCs [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> were observed by laser scanning confocal microscopy.

**RESULTS:** In normal buffer (including Ca<sup>2+</sup>, buffer A), the fluorescence intensity was enhanced accordingly with the increase of ET-1 concentration. The cumulative-response curve showed EC<sub>50</sub> was 1.1×10<sup>-9</sup> mol/L. After incuba-

tion of HSCs with ET-1 in buffer A and buffer B (absence of extracellular calcium, EGTA), the duration of calcium peak had significant difference (165.2 ± 10.1 s vs 91.0 ± 7.2 s, *P* < 0.01), while the value of calcium peak had no significant difference. The ET-1-induced duration of calcium wave decreased markedly in the cells pretreated with RSM in buffer A as compared with that in the ones treated by ET-1 alone (69.1 ± 12.5 s vs 165.2 ± 10.1 s, *P* < 0.01). The calcium peak value and duration of calcium wave had no significant changes between the cells pre-incubated with RSM in buffer B and A (*P* > 0.05). In the cells pre-incubated with RSM, KCl-induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was decreased, and the calcium peak value (78.0% ± 6.1% → 26.3% ± 1.2%, *P* < 0.01) and duration of calcium wave (70.8 ± 10.4 s → 15.9 ± 5.1 s, *P* < 0.01) were decreased significantly.

**CONCLUSION:** RSM inhibits ET-1-induced depletion of intracellular calcium, which has no correlations with the influx of extracellular calcium. RSM can also inhibit KCl-induced influx of calcium, indicating its characteristic of blocking voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channel.

**Key Words:** Radix salviae miltiorrhizae; Endothelin-1; Calcium; Hepatic stellate cell

Yao DM, Fang SM, Yang CJ, Xiu HM, Su SW, Yao XX. Effects of radix salviae miltiorrhizae on endothelin-1-induced calcium changes in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2488-2492

## 摘要

**目的:** 探讨丹参降门脉压作用是否与抑制ET-1介导的HSCs [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高有关。

**方法:** 制备丹参浸膏借助激光共聚焦显微镜(LSCM)观察丹参对ET-1介导HSCs [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高的影响。

**结果:** 含钙细胞培养液(A液)中加入浓度梯度的ET-1后, 荧光强度逐渐增加, 作出累积反应曲线后, EC<sub>50</sub>值约在1.1×10<sup>-9</sup> mol/L, 此浓度的ET-1作用于A液和B液, 钙波持续时间相比有显著性差异(165.2±10.1 s vs 91.0±7.2 s,

$P<0.01$ ), 而钙峰值相比无显著性差异. 丹参预处理A液后加入ET-1, 钙波持续时间同ET-1相比有显著性降低( $69.1\pm 12.5\text{ s}$  vs  $165.2\pm 10.1\text{ s}$ ,  $P<0.01$ ). 丹参预处理B液后加入ET-1, 同丹参处理A液组相比钙峰值和钙波持续时间均无显著性差异( $P>0.05$ ). 丹参预处理后, 加入KCl可降低其诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 钙峰值( $78.0\%\pm 6.1\%\rightarrow 26.3\%\pm 1.2\%$ ,  $P<0.01$ )和钙波持续时间( $70.8\pm 10.4\text{ s}\rightarrow 15.9\pm 5.1\text{ s}$ ,  $P<0.01$ )均明显下降.

**结论:** 丹参可抑制ET-1引发的细胞内钙释放, 而与外钙内流关系不大, 同时可抑制KCl诱发的钙内流, 表明丹参具有电压依赖性钙通道阻断作用.

**关键词:** 丹参; 内皮素-1; 钙; 肝星状细胞

姚冬梅, 房澍名, 杨川杰, 修贺明, 苏素文, 姚希贤. 丹参对内皮素-1介导的肝星状细胞Ca<sup>2+</sup>浓度变化的影响机制. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2488-2492

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2488.asp>

## 0 引言

近年来对丹参(*radix salviae miltiorrhizae*, RSM)、RSM复方制剂及RSM有效成分在慢性肝病治疗中的作用得到广泛共识, 并通过动物实验与临床研究证实了其抗肝纤维化的作用机制<sup>[1]</sup>. 但目前尚缺乏其在肝硬化门脉高压治疗的研究, Yao *et al*<sup>[2]</sup>通过胆总管结扎法, 制备犬肝硬化门脉高压模型, 表明RSM可降低肝硬化犬门静脉压力, 但其机制尚未完全阐明. 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)收缩是介导肝硬化门脉高压的主要因素, 其中内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)引起的收缩反应最强. RSM降门脉压作用是否与抑制ET-1引起的HSCs收缩有关, 目前尚乏研究. 因此, 我们制备RSM纯化浸膏借助激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)技术, 进一步从细胞水平探讨RSM降门脉压作用的机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝星状细胞株CFSC由美国Greenwel教授建株并惠赠, 其表型为活化的HSCs. 激光共聚焦显微镜(Leica DM IRBE), ET-1(美国Sigma公司), Fluo-3, AM Ester(美国Biotium公司). RSM(石家庄市乐仁堂)500 g, 加蒸馏水, 文火煮沸20 min, 取药液纱布过滤, 共2次, 将2次药液混合后以4000 r/min离心15 min, 取上清, 加

95 mL/L乙醇至60%-80%体积, 0-4℃静置过夜. 弃沉淀, 取上清于旋转蒸发仪负压蒸馏, 蒸干乙醇和水份后即得RSM浸膏, 并稀释成生药50 g/L备用. 正常含钙细胞培养液(A液, mmol/L): NaCl 130, KCl 2.7, CaCl<sub>2</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, glucose 10, pH 7.4 (NaOH); 无钙细胞培养液(B液, mmol/L, 用钙螯合剂EGTA替代CaCl<sub>2</sub>以去除细胞外液Ca<sup>2+</sup>): NaCl 130, KCl 2.7, EGTA 1, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, glucose 10, pH 7.4 (NaOH).

### 1.2 方法

**1.2.1 钙荧光探针的负载** 钙荧光探针Fluo-3/AM用纯DMSO配成1 mmol/L的储备液, -20℃避光保存备用. 促溶剂F-127溶于DMSO (F-127:DMSO质量比为1:5)室温保存备用. 实验前取1 μL Fluo-3/AM储备液溶于1 mL A液, 再加入1 μL F-127, 混匀后向培养板中加500 μL Fluo-3/AM, 终浓度为1 μmol/L. 37℃避光孵育约30 min, 吸去负载液, 再用A液或B液漂洗爬片2-3次, 用滤纸尽量吸干盖玻片的液体后, 将其放置于倒置显微镜上端的浴槽中, 加入500 μL细胞培养液(A或B液), 待上机检测HSCs胞质游离钙( $[Ca^{2+}]_i$ ).

**1.2.2 LSCM检测HSCs  $[Ca^{2+}]_i$**  将负载好的细胞放在LSCM的载物台上, 调节焦距使图像达到最清晰, 选取活性良好的HSCs进行实验观察. 激发波长488 nm, 发射波长530 nm, 40倍物镜, XYT扫描方式, 在Time Series程序下开始预扫描, 根据细胞对药物反应的预实验结果, 扫描时间间隔5 s, 用药后观察300 s. 计算细胞面积变化时观察时间延长至600 s, 该浓度的Fluo-3/AM对细胞形态无影响, 细胞核位置正常, 细胞内钙荧光强度无明显波动. 据干预因素的不同分为以下5组(每组 $n=5$ ): (1)对照组: 按ET-1组加药时间顺次向A液加入与实验组同体积的生理盐水; (2)ET-1组( $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  mol/L): 从低浓度开始向A液顺次加入ET-1, 根据预实验结果, 每次加药时间选择在上一浓度ET-1作用达峰值时刻, 作出浓度累积反应曲线, 选择EC<sub>50</sub>(达到最大效应50%时所对应的浓度)作为以后的实验浓度; (3)EC<sub>50</sub> ET-1组: 向A液加入 $1.1\times 10^{-9}$  mol/L ET-1; (4)EC<sub>50</sub> ET-1组: 向B液加入 $1.1\times 10^{-9}$  mol/L ET-1; (5)RSM+ET-1组: 4.22 g/L RSM预处理10 min后, 加入ET-1; (6)EGTA+RSM+ET-1组: 在B液中加入RSM 4.22 g/L 10 min后加入ET-1; (7)RSM+KCl组: 4.22 g/L RSM预处理10 min后, 加入100 mmol/L

### ■ 研发前沿

近年来, 大多数研究都集中在HSCs激活后细胞外基质合成增加的分子机制, 而对HSCs激活后引起细胞收缩力增加的机制研究尚少. 因此, 从细胞学水平研究门脉高压的机制是当前研究的热点.



### ■创新盘点

本研究采用目前具有最强缩血管作用的内皮素-1(ET-1)作为刺激因子,观察丹参预处理后对ET-1介导HSCs  $\text{Ca}^{2+}$ 的影响,探讨丹参降低门脉压力的机制,此种方法目前国内外尚无报道。

KCl。每个被染色细胞只使用一次,加上上述干预前细胞在培养液中需稳定5-10 min。利用LSCM所配备的计算与图像软件(Leica confocal software, TCS SP2),计算并绘制荧光强度相对值在加药前后随时间的动态变化曲线,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化用Fluo-3/AM与 $\text{Ca}^{2+}$ 结合后荧光强度变化百分数表示,荧光强度越大,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 越高。  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光强度变化百分数(%) =  $(F-F_0)/F_0 \times 100\%$ , 其中 $F$ 为LSCM测量时整个细胞的平均荧光强度,  $F_0$ 为用药前的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光强度。利用LSCM配备的面积分析软件计算面积变化的百分数(%) =  $(S-S_0)/S_0 \times 100\%$ , 其中 $S$ 为给药后细胞面积,  $S_0$ 为用药前的细胞面积。

**统计学处理** 所有结果以mean±SD表示,组间比较采用独立样本 $t$ 检验,同一标本给药前后用配对 $t$ 检验。应用SPSS 10.0统计软件处理,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

LSCM下 $\text{Ca}^{2+}$ 成像的HSCs仍可见普通倒置显微镜下的形态特征,细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的浓度的高低由细胞被激发出的荧光强弱表示,荧光强度越强表示 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度越高,反之则越低。本实验HSCs与Fluo-3/AM孵育后,所有细胞均被染色,且各细胞间的荧光强度基本一致。为证明细胞培养液本身对HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响,观察了4个HSCs在实验所需的时间内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的动态变化,结果表明,HSCs在实验所需的整个时间内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光强度基本保持稳定。

**2.1 ET-1对HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响** A液中加入浓度梯度的ET-1后,荧光强度逐渐增加,作出累积反应曲线后,  $\text{EC}_{50}$ 值约在 $1.1 \times 10^{-9}$  mol/L。ET-1(终浓度 $1.1 \times 10^{-9}$  mol/L)作用于A液,5 s时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 开始增高,25 s达到峰值( $110.2\% \pm 12.0\%$ ),维持至95 s后开始逐渐下降,170 s后趋于平稳,但其水平仍稍高于加药前水平,钙波持续时间为 $165.2 \pm 10.1$  s;而ET-1(终浓度 $1.1 \times 10^{-9}$  mol/L)作用于B液,15 s时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 开始增高,25 s时达到峰值( $98.3\% \pm 13.8\%$ ),然后逐渐下降,至105 s后稳定在稍高于基线水平,钙波持续时间为 $91.0 \pm 7.2$  s,两组峰值相比无显著性差异,钙波持续时间相比有显著性差异( $P<0.01$ ,图1)。表明ET-1引起HSCs峰值的出现系源于细胞内贮存钙的释放,而外钙内流介导了钙波的增宽。

**2.2 RSM的作用** (1)RSM+ET-1组:在含钙细胞培养液(A液),RSM预处理后加入ET-1,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

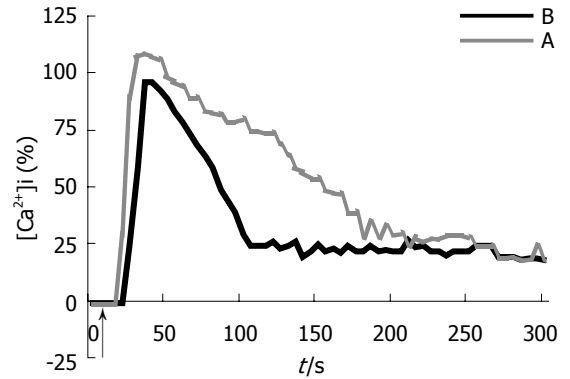


图1 ET-1在A液和B液中对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响。

表1 丹参对肝星状细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 (mean ± SD)

分组	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 峰值(%)	钙波宽度(s)
ET-1	$110.2 \pm 12.0$	$165.2 \pm 10.1$
RSM+ET-1	$115.0 \pm 11.6$	$69.1 \pm 12.5^b$
EGTA+RSM+ET-1	$104.3 \pm 10.3$	$78.5 \pm 13.4^b$
RSM+KCl	$26.3 \pm 1.2^b$	$15.9 \pm 5.1^b$
KCl	$78.0 \pm 6.1$	$70.8 \pm 10.4^b$
尼索地平+KCl	$28.9 \pm 5.1^b$	$25.3 \pm 8.2^b$

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs ET-1。

的峰值为 $115.0\% \pm 11.6\%$ ,钙波持续时间为 $69.1 \pm 12.5$  s,同单纯ET-1组相比钙峰值无显著性差异,而钙波持续时间有显著性差异( $P<0.01$ ,表1)。(2)EGTA+RSM+ET-1组:无钙细胞培养液(B液)中加入RSM预处理后,ET-1引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 峰值( $104.3\% \pm 10.3\%$ ),同RSM组相比无显著性差异,钙波持续时间为 $78.5 \pm 13.4$  s,同RSM组相比无显著性差异( $P>0.05$ ),表明RSM主要通过细胞内的机制抑制 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高(表1)。(3)RSM+KCl组:RSM预处理后,加入KCl可降低其诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高,峰值降至 $26.3\% \pm 1.2\%$ ,钙波宽度降至 $15.9 \pm 5.1$  s,同单纯KCl组比均有显著性差异( $P$ 均 $<0.01$ ),钙波宽度低于尼索地平+KCl组,但二者无统计学差异,表明RSM具有L-型电压依赖性钙通道(voltage-operated calcium channel, VOCC)阻断作用(表1)。

## 3 讨论

RSM是目前临床应用较为广泛的主要活血化瘀药物,以RSM为主药的系列中药组方抑肝纤、复方861合剂、扶正化瘀方、强肝胶囊以及益肝浓缩煎剂等已证实具有肯定的抗肝纤维化作用<sup>[1,3]</sup>。但其在门脉高压治疗中的研究尚少,Yao et al<sup>[2]</sup>通过临床和动物实验研究表明,RSM可改

善肝硬化患者临床症状,降低门静脉内径、血流量,同时降低肝硬化犬门静脉压,而对平均动脉压、心率无影响.表明RSM既可有效降低肝硬化犬的门静脉压力,又无全身血液动力学副作用,为一有希望的降门脉压药物.多项体内外研究表明,HSCs在肝脏微循环调节以及门脉高压的形成中起重要作用<sup>[4-5]</sup>.其中ET-1引起的收缩反应最强,在肝硬化门脉高压中发挥重要作用<sup>[6]</sup>,因此,本研究首先探讨了ET-1引发HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的细胞内机制,藉此为实验基础,进一步观察了RSM对ET-1引发的HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响,RSM如能抑制HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加,则其有可能藉此途径发挥降低肝内血流阻力的作用.

目前有关ET-1引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高的机制多集中在对血管平滑肌细胞、心肌细胞等的研究,多认为ET-1引起的细胞收缩需要细胞内贮钙释放和外钙内流共同介导<sup>[6-11]</sup>,而对ET-1介导HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高机制的研究很少,已有的研究认为ET-1引发的HSCs内贮钙释放导致了 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加,介导了细胞收缩,但外钙内流是否参与了ET-1引发的HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高目前尚存在分歧<sup>[12-14]</sup>,有认为ET-1引起的内钙释放和外钙内流共同介导了HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加,而有者则持相反观点,认为ET-1引发的HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化主要由细胞内贮钙释放所致,而与外钙内流无关.因此,进一步阐明ET-1引起HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加的机制将为靶向选择药物抑制ET-1介导的HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加提供依据,从而可能有助于门脉高压的治疗.

采用钙荧光探针Fluo-3/AM和LSCM成像技术,观察了ET-1对HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响,Fluo-3/AM是一种敏感性钙荧光指示剂,能特异性地与 $\text{Ca}^{2+}$ 结合,并在一定波长激发光激发后产生荧光,藉荧光强度变化指示 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度的相应变化.为了明确细胞外钙内流是否参与了ET-1引发的HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加,分别在含钙和无钙细胞外液观察由ET-1介导的HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化.结果显示,在含钙和无钙细胞外液中,ET-1均能引起HSCs钙峰(钙峰系同加药前相比,细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加的最高值,主要代表细胞内贮存钙的释放)的出现,含钙和无钙细胞外液相比无显著差异,表明细胞外液钙的有无并不影响ET-1引起的钙峰值的高低;而无钙组钙波(钙波指加药后从细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加到逐渐回至基线趋于平稳的时间,主要由外钙内流介导)持续时间明显短于含钙组( $P<0.01$ ),同时,无钙组细胞面积减少亦低于含钙组( $P<0.05$ ),表明外钙内流在一定程度上也介

导了HSCs面积减少.已证实HSCs细胞面积减少是细胞产生收缩力的重要标志,目前多数研究认为,当HSCs面积减少时代表细胞有收缩,特别是减少 $>8\%$ 时,此种收缩作用同钙峰值及钙波持续时间密切相关<sup>[15-16]</sup>.尽管ET-1在含钙和无钙细胞外液中均可引起细胞收缩,但在无钙细胞外液引起的收缩明显小于含钙细胞外液,表明外钙内流亦介导了ET-1引发的HSCs收缩.甚至有研究表明,单纯细胞内贮钙释放引起的钙峰不足以引发细胞收缩,而细胞内贮钙排空后引发的外钙内流介导了HSCs收缩<sup>[13,17]</sup>.基于以上结论,抑制ET-1引发的HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,一方面抑制内贮钙的释放,另一方面抑制外钙内流.细胞内贮钙的释放系由细胞膜受体介导激活内质网三磷酸肌醇( $\text{IP}_3$ )受体所致,但目前尚无 $\text{IP}_3$ 受体特异性拮抗剂;目前认为外钙内流可能由VOCC、受体依赖性钙通道(receptor-operated calcium channel, ROCC)和钙贮库调控的钙通道(store-operated calcium channel, SOCC)介导,VOCC系在膜电位发生变化时被激活,由通道的开放介导细胞外钙内流;ROCC介导外钙内流的机制尚未阐明,有学者认为受体被激活后促进VOCC开放;SOCC系在细胞钙贮库钙排空后为补充钙贮库中的 $\text{Ca}^{2+}$ 被激活,他引发细胞外钙内流<sup>[9,18-20]</sup>,因此,如采用VOCC,ROCC,SOCC抑制剂可能对抑制外钙内流介导的HSCs收缩有效.

RSM是否通过以上所述途径抑制HSCs收缩,目前鲜有研究,从RSM对内皮细胞、血小板、心肌细胞等的研究表明,RSM可抑制细胞内钙增高,罗伟波 *et al*<sup>[21]</sup>用丹酚酸B可抑制低氧引起的人脐静脉内皮细胞钙离子的升高,王唯 *et al*<sup>[22]</sup>研究表明丹酚酸B可抑制凝血酶激发的兔血小板内钙升高,李全凤 *et al*<sup>[23]</sup>发现RSM滴丸可抑制心肌细胞缺血缺氧所致钙超载,有认为RSM抑制细胞内贮钙升高的机制可能与其具有L-型VOCC阻断作用有关,徐长庆 *et al*<sup>[24]</sup>采用膜片钳全细胞式记录方法,观察RSM酮Ⅱa对豚鼠单个心室肌细胞跨膜电位及L-型钙电流的影响,证明RSM酮Ⅱa有类异搏停样L-型VOCC阻断作用,陈旭华 *et al*<sup>[25]</sup>、钱卫民 *et al*<sup>[26]</sup>亦观察到同样结果,我们将HSCs用RSM预处理后可抑制KCl对L-型VOCC激活,表明RSM具有L-型VOCC阻断作用.尽管RSM可通过L-型VOCC抑制外钙内流,但本研究表明在含钙和无钙细胞外液,RSM均可抑制ET-1介导HSCs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,含钙组同无钙组钙峰值及钙波宽度相比并无显著性差异,

#### ■应用要点

目前对肝硬化门脉高压尚缺有效而乏副作用的预防及治疗药物,本研究表明丹参在门脉高压的预防和治疗中发挥重要作用,其应用安全有效而乏副作用,系一良好的慢性肝病治疗药物.

# 同行评价

本文有一定创新性,立论依据充分,设计较严谨,实验技术可行,讨论部分逻辑性强,建议后续研究中进一步对不同剂量进行研究。

表明RSM对ET-1介导的HSCs  $[Ca^{2+}]_i$ 主要通过抑制细胞内钙增加从而抑制HSCs收缩,由于细胞内钙增加的机制十分复杂,RSM究竟系通过何种途径发挥作用尚需深入研究。

## 参考文献

- 王晓玲,刘平,童普德,谭英姿,钱汝江,胡旭东,蒋文娟. 丹参对转化生长因子 $\beta_1$ 刺激的NIH/3T3细胞表达I型胶原和c-fos mRNA的影响. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 19-20
- Yao XX, Cui DL, Sun YF, Li XT. Clinical and experimental study of effect of Raondix Salviae Miltiorrhiza and other blood-activating and stasis-eliminating Chinese herbs on hemodynamics of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 439-442
- 姚希贤,唐有为,姚冬梅,修贺明. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠I, III型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001; 9: 263-267
- Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 337-349
- 姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍. 内皮素-1对肝硬化大鼠不同病期离体肝脏及血管环调节作用的研究. 中华医学杂志 2002; 82: 1565-1568
- Curtis TM, Scholfield CN. Transient  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  currents with endothelin in isolated arteriolar smooth muscle cells of the choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2279-2285
- Wilson SM, Mason HS, Smith GD, Nicholson N, Johnston L, Janiak R, Hume JR. Comparative capacitative calcium entry mechanisms in canine pulmonary and renal arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 2002; 543: 917-931
- McFadzean I, Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1-13
- Curtis TM, Scholfield CN. Evidence for two endothelin Et(A) receptor subtypes in rabbit arteriolar smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1787-1795
- Curtis TM, Scholfield CN. Nifedipine blocks  $Ca^{2+}$  store refilling through a pathway not involving L-type  $Ca^{2+}$  channels in rabbit arteriolar smooth muscle. *J Physiol* 2001; 532: 609-623
- Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbign MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156
- Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, Giotti A, Gentilini P. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest* 1992; 90: 642-646
- Gasull X, Bataller R, Gines P, Sancho-Bru P, Nicolas JM, Gorbign MN, Ferrer E, Badia E, Gual A, Arroyo V, Rodes J. Human myofibroblastic hepatic stellate cells express  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels that modulate the effects of endothelin-1 and nitric oxide. *J Hepatol* 2001; 35: 739-748
- Bataller R, Gasull X, Gines P, Hellemans K, Gorbign MN, Nicolas JM, Sancho-Bru P, De Las Heras D, Gual A, Geerts A, Arroyo V, Rodes J. *In vitro* and *in vivo* activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology* 2001; 33: 956-962
- Bataller R, Nicolas JM, Ginees P, Gorbign MN, Garcia-Ramallo E, Lario S, Tobias E, Pinzani M, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Contraction of human hepatic stellate cells activated in culture: a role for voltage-operated calcium channels. *J Hepatol* 1998; 29: 398-408
- Tao J, Mallat A, Gallois C, Belmadani S, Mery PF, Nhieu JT, Pavoine C, Lotersztajn S. Biological effects of C-type natriuretic peptide in human myofibroblastic hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 23761-23769
- Hoth M. Depletion of intracellular calcium stores activates an outward potassium current in mast and RBL-1 cells that is correlated with CRAC channel activation. *FEBS Lett* 1996; 390: 285-288
- Parekh AB, Fleig A, Penner R. The store-operated calcium current  $I_{CRAC}$ : nonlinear activation by  $InsP_3$  and dissociation from calcium release. *Cell* 1997; 89: 973-980
- 齐若梅,廖福龙,王振纲. 细胞内钙的调节机制与临床应用. 中国药理学通报 2002; 18: 16-19
- 罗伟波,王逸平. 丹酚酸B镁盐抑制低氧诱导内皮细胞钙内流和一氧化氮释放. 中国药理学报 2001; 22: 1135-1142
- 王唯,王逸平,孙伟康,徐亚明,宣利江. 丹酚酸B镁盐对兔洗涤血小板聚集和5-HT释放反应的影响. 中国药理学报 2000; 21: 860-863
- 李全凤,王孝铭,朱世军,艾静,高焕焕,徐长庆. 复方丹参滴丸对缺氧心肌细胞内钙离子平均荧光强度的影响. 中国病理生理杂志 2001; 17: 690-691
- 徐长庆,姜延平,杨宝峰,李玉荣. 丹参酮II-A抑制豚鼠单个心肌细胞L型钙电流和缩短动作电位时程效应的相关性分析. 中国药理学通报 1998; 14: 428-431
- 陈旭华,徐岩,高世明,王腾,李玉梅. 丹参对家兔心室肌细胞缺氧复氧后L-型钙通道电流的影响. 安徽医科大学学报 2002; 37: 110-112
- 钱卫民,邓春玉,薛玉梅,阮小薇,吴书林. 丹参素对豚鼠心室肌细胞L-型钙通道的影响. 岭南心血管病杂志 2002; 8: 276-278

电编 张敏 编辑 潘伯荣

# 反义肝素酶基因对胰腺癌细胞体外增殖和侵袭的抑制作用

杨彦, 崔明, 陈陵, 段体德

杨彦, 崔明, 成都军区昆明总医院普通外科 云南省昆明市 650032

陈陵, 第三军医大学西南医院消化专科中心 重庆市 400038  
段体德, 昆明医学院第一附属医院普通外科 云南省昆明市 650032

杨彦, 博士, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤方面的工作和研究。

通讯作者: 段体德, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院普通外科, tdduan@163.com

电话: 0871-5324888-2442

收稿日期: 2006-04-11 接受日期: 2006-05-26

## Inhibitory effects of antisense heparanase gene on proliferation and invasion of human pancreatic cancer cell line SW1990 *in vitro*

Yan Yang, Ming Cui, Ling Chen, Ti-De Duan

Yan Yang, Ming Cui, Department of General Surgery, Kunming General Hospital of Chendu Military Command, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Ling Chen, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Ti-De Duan, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ti-De Duan, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. tdduan@163.com

Received: 2006-04-11 Accepted: 2006-05-26

## Abstract

**AIM:** To investigate the inhibitory effects of antisense heparanase gene on the proliferation and invasion of human pancreatic cancer cell line SW1990 *in vitro*.

**METHODS:** Human pancreatic cancer cell line SW1990 was transfected with the plasmid expressing antisense heparanase gene. Meanwhile, the empty vector and non-transfection group were designed. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry; the protein expression of heparanase gene was detected by Western blot and immunohistochemistry, and the mRNA transcription level was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The colony-forming unit assay was

used to measure the ability of cell growth, and Transwell chamber model was employed to test the ability of cell invasion *in vitro*.

**RESULTS:** In comparison with the cells transfected with empty vector or without transfection, SW1990 cells transfected with antisense heparanase gene had a significant decrease in S-phase cell population ( $18.8\% \pm 2.5\%$  vs  $36.3\% \pm 2.2\%$ ,  $33.2\% \pm 2.1\%$ , both  $P < 0.01$ ) and a marked increase in G1-phase cell population ( $66.0\% \pm 2.7\%$  vs  $30.7 \pm 3.2\%$ ,  $39.8\% \pm 4.9\%$ ,  $P < 0.01$ ). The protein expression and mRNA transcription were decreased by 34.3% and 37.8% individually. The colony formation was largely decreased ( $12.2 \pm 2.8$  vs  $30.8 \pm 4.4$ ,  $28.3 \pm 2.7$ ,  $P < 0.01$ ); and finally, the cells moved from the upper chamber into the lower one in Transwell chamber assay were less than those in the control groups ( $13.0 \pm 3.5$  vs  $34.8 \pm 5.8$ ,  $29.4 \pm 5.6$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Transfection of antisense heparanase gene can inhibit the ability of cell proliferation and invasion in human pancreatic cancer cell lines SW1990 *in vitro*.

**Key Words:** Heparanase; Antisense; Pancreatic cancer; Transfection; Proliferation; Invasion

Yang Y, Cui M, Chen L, Duan TD. Inhibitory effects of antisense heparanase gene on proliferation and invasion of human pancreatic cancer cell line SW1990 *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2493-2498

## 摘要

**目的:** 研究反义肝素酶基因对人胰腺癌SW1990细胞体外增殖和侵袭能力的抑制作用。

**方法:** 反义肝素酶基因转染胰腺癌SW1990细胞, 并设空载体对照组和空白对照组, 以流式细胞仪检测细胞周期; 免疫组化、Western blot及RT-PCR检测肝素酶蛋白和mRNA表达; 平板克隆形成实验检测细胞增殖活性, Transwell侵袭小室模型检测细胞体外侵袭能力。

**结果:** 与空白组和空载组比较, 反义组细胞周期中S期比例明显减少( $18.8\% \pm 2.5\%$  vs

## ■背景资料

胰腺癌生物学侵袭性高, 易发生早期转移, 确诊时多属晚期, 手术切除率仅为20%左右, 术后5 a生存率不到5%, 是预后最差的消化道恶性肿瘤之一, 针对胰腺癌转移发生、发展的分子机制, 确立新的转移防治靶点是提高疗效的关键。



## ■研究前沿

肝素酶是唯一能特异性识别、裂解硫酸乙酰肝素蛋白多糖的硫酸肝素侧链的一种葡萄糖苷内切酶,可通过降解ECM和BM中的HSPG,破坏限制肿瘤转移的屏障,同时促进肿瘤血管形成,从而促进肿瘤生长和转移。肝素酶同多种恶性肿瘤的转移、侵袭和预后相关,由此推测肝素酶可能是肿瘤细胞侵袭转移所必备的前提条件之一,可望成为肿瘤转移治疗的一个新的基因靶点。

36.3%±2.2%, 33.2%±2.1%,  $P<0.01$ ), G1期细胞比例明显升高(66.0%±2.7% vs 30.7%±3.2%, 39.8%±4.9%,  $P<0.01$ ); 肝素酶蛋白及mRNA表达分别降低34.3%和37.8%; 细胞克隆形成数目减少(12.2±2.8 vs 30.8±4.4, 28.3±2.7,  $P<0.01$ ); Transwell侵袭小室中24 h穿膜细胞数减少(13.0±3.5 vs 34.8±5.8, 29.4±5.6,  $P<0.01$ )。

**结论:** 反义肝素酶基因抑制人胰腺癌SW1990细胞体外增殖及侵袭能力。

**关键词:** 肝素酶; 反义; 胰腺癌; 转染; 增殖; 侵袭

杨彦, 崔明, 陈陵, 段体德. 反义肝素酶基因对胰腺癌细胞体外增殖和侵袭的抑制作用. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2493-2498

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2493.asp>

## 0 引言

乙酰肝素酶(heparanase, Hpa)是新近克隆成功的一种葡萄糖苷内切酶,能特异性识别、裂解细胞外基质和基底膜的主要成分硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)的硫酸肝素(heparan sulfate, HS)侧链,同多种恶性肿瘤的转移、侵袭和预后相关<sup>[1-5]</sup>。研究表明,胰腺癌中Hpa高表达,并同胰腺癌的预后呈负相关<sup>[6-7]</sup>。针对肿瘤的肝素酶基因的反义寡核苷酸治疗已有报道,但未见反义肝素酶基因在胰腺癌方面的研究报道。我们采用前期实验构建成功人肝素酶反义荧光真核表达载体(pIRES2-EGFP-aHpa)稳定转染的人胰腺癌细胞株SW1990<sup>[8]</sup>,并利用流式细胞术、免疫组化、分子杂交和体外侵袭模型等方法研究反义肝素酶基因对胰腺癌细胞SW1990体外增殖活性和侵袭能力的影响,为进一步探讨反义肝素酶基因抗胰腺癌侵袭的分子机制提供有价值的实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胰腺癌高转移细胞株SW1990由第二军医大学王力博士惠赠。含人肝素酶cDNA全长基因表达质粒pcDNA3-Hpa、荧光真核表达载体pIRES2-EGFP由第三军医大学杨仕明博士惠赠。DOTAP脂质体转染试剂(德国Roche),兔抗人Hpa多克隆抗体(美国Santa Cruz); 逆转录试剂盒(美国Promega), Trizol试剂(美国Gibco), Transwell侵袭小室(美国Costar), Matrigel人工

基质胶(美国BD), PCR仪(美国Amplitrone II), 紫外分光光度计(美国Beckman), 电泳仪(美国Bio-Rad, PAC3000), 图像分析仪(美国Tebuas 6803), 流式细胞仪(美国BD, FACSCalibur)。

**1.2 方法** 采用前期实验成功转染反义肝素酶基因表达质粒(pIRES2-EGFP-aHpa)、绿色荧光表达质粒pIRES2-EGFP的胰腺癌SW1990细胞和未转染基因的SW1990细胞<sup>[8]</sup>, 分别称为反义组(胰腺癌SW1990细胞转染反义肝素酶基因)、空载组(细胞仅转染pIRES2-EGFP空载体)和白组(细胞未转染基因及空载体)。细胞培养于含100 mL/L胎牛血清DMEM培养液中, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>环境下, 采用台盼蓝计数, 保持细胞活力>90%。

**1.2.1 免疫组化检测转染细胞Hpa表达** 采用链霉素-生物素免疫组织化学染色(SP)法, 主要操作步骤如下: 将盖玻片置培养皿中, 细胞按2×10<sup>7</sup>/L密度接种于培养皿中制备细胞爬片。细胞爬片以40 g/L多聚甲醛室温下固定10 min, PBS冲洗, 5 g/L Triton X-100孵育20 min, PBS清洗, 30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育, 10 mL/L正常山羊血清封闭非特异性抗原, 加1:100兔抗人肝素酶一抗工作液, 4℃孵育过夜后加入生物素化羊抗兔二抗工作液, 37℃孵育, PBS冲洗, DAB显色, 苏木素复染, 封片。PBS代替一抗为阴性对照。显微镜观察阳性细胞数及染色强度。

**1.2.2 RT-PCR法检测转染细胞Hpa mRNA表达** 取转染后继续培养48 h的SW1990细胞, 以TRIZOL法提取总RNA, 以紫外分光光度计检验纯度并定量。按逆转录试剂盒说明书步骤进行实验。应用军事医学科学院的Gold Key软件设计PCR引物, 上游引物: 5'-GTGATGAGGCAAGTATTCTTTGGAGCA-3'; 下游引物: 5'-TTCTAAGACCTTTGGGACCTCATGGAT-3', 理论扩增片段长度327 bp, 由中国科学院微生物研究所基因工程中心Backman实验室合成。逆转录体系于97℃变性10 min后冰浴5 min, 加Taq酶1 μL, 放入PCR仪进行核酸扩增。循环参数: 94℃ 90 s, 56℃ 120 s, 72℃ 60 s, 共35个循环, 结束前72℃延伸10 min。反应产物经1 g/L琼脂糖凝胶电泳后在图像分析仪下分析扩增条带灰度, 以IDV(integrated density value)值进行半定量分析。

**1.2.3 Western blot法检测转染细胞Hpa蛋白表达** 取转染后继续培养的3组SW1990细胞, 加冰预冷的裂解缓冲液裂解细胞, 离心取上清液



图1 转染细胞肝素酶表达 (IHC × 200). A: 空白组; B: 空载组; C: 反义组.

50  $\mu$ L (约含蛋白质50  $\mu$ g)于试管中, 行100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至硝酸纤维素膜. 5 g/L脱脂奶粉封闭非特异性抗原, 加入1:500兔抗人Hpa多克隆抗体, 室温孵育1 h, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗, 室温1 h, DAB显色, 以蛋白条带的IDV值进行半定量分析.

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 3组细胞胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 离心重悬后冷70 g/L乙醇固定, 4℃保存. PBS液清洗后加入碘化丙啶(PI)染液, 混匀, 4℃放置30 min, 300目尼龙膜过滤, 调整细胞浓度 $1 \times 10^6$ /L, 流式细胞仪检测并软件分析结果, 每组重复3次.

1.2.5 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 3组细胞消化成细胞悬液, 并作梯度倍比稀释, 按每孔50个细胞接种于24孔板, 每组细胞各接种6孔. 静止培养2-3 wk, 当培养板中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养. PBS清洗后加纯甲醇1 mL固定15 min, 吉姆萨液染色. 将培养板置于显微镜低倍下计数大于50个细胞的克隆数, 按公式计算克隆形成率. 克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$

1.2.6 Transwell侵袭小室模型测定细胞体外侵袭能力 将浓度为0.5 g/L Matrigel人工基质胶20  $\mu$ L铺于Transwell侵袭小室聚碳酸酯微孔膜(孔径8  $\mu$ m)的上表面, 置37℃ 30 min使其聚成凝胶. Transwell上室中分别加入已消化重悬的各组细胞100  $\mu$ L ( $1 \times 10^5$ /L), 下室中加入600  $\mu$ L含趋化因子无血清DMEM培养基, 培养24 h后取出, PBS清洗, 棉签去除滤膜上层细胞, 将已经侵入并贴附于微孔膜下层的细胞固定并吉姆萨液染色, 显微镜下直接观察穿过膜的细胞数. 随机计数5个视野, 计数每个视野内穿过8  $\mu$ m微孔的细胞数. 以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力.

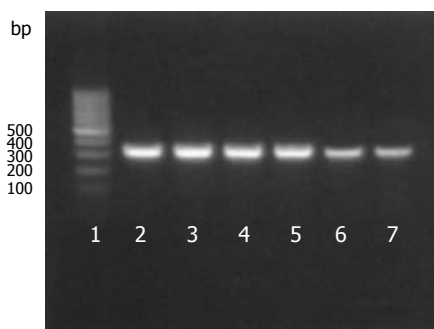


图2 转染细胞Hpa mRNA表达图谱. 1: DNA分子质量Marker; 2, 3: 空白组; 4, 5: 空载组; 6, 7: 反义组.

统计学处理 所有计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为统计学差异显著, 以SPSS 10.0软件进行统计分析.

## 2 结果

2.1 免疫组化检测转染细胞肝素酶表达 3组细胞中均出现棕褐色颗粒状染色, 提示各组细胞均有肝素酶表达, 但反义组细胞表达强度明显较空白组和空载组减弱, 对照组和空载组之间无明显差别(图1), 表明反义Hpa基因转染抑制SW1990细胞肝素酶表达.

2.2 RT-PCR检测转染细胞肝素酶mRNA表达 3组细胞Hpa mRNA的特异扩增片段长度为327 bp, 与理论设计扩增长度一致(图2), 图像分析仪分析空白组、空载组、反义组扩增条带灰度(IDV值), 反义组同对照组比较明显降低, 差异有显著意义( $t = 2.99$ ,  $P = 0.04 < 0.05$ ), 空白组与空载组比较无差异, 反义组Hpa mRNA表达较空白组降低34.3%(表1). 表明反义Hpa基因转染抑制细胞Hpa mRNA表达.

2.3 Western blot法检测转染细胞肝素酶蛋白表达 3组细胞均有Hpa蛋白表达(图3), 灰度检测提示反义组Hpa蛋白表达明显降低( $t = 5.44$ ,  $P = 0.00 < 0.01$ ), 较空白组降低37.8%, 空白组与空载

## ■ 相关报道

Uno *et al*构建含有全长人Hpa cDNA序列的反义腺病毒载体, 并转染高表达Hpa的肿瘤细胞株后, 发现Hpa基因的表达受到抑制, 而且在体外和体内均能抑制肿瘤细胞的浸润能力. Edovitsky *et al*将直接作用于Hpa mRNA的锤头状的抗Hpa核酶或siRNA重组到质粒载体中, 再转染肿瘤细胞株中, 发现被转染的细胞株Hpa表达水平下降, 侵袭力和黏附力显著降低, 动物在体内实验表现为血管分布减少, 转移能力的下降.

### ■创新亮点

针对肿瘤的肝素酶基因的反义寡核苷酸治疗已有报道,但未见反义肝素酶基因对胰腺癌细胞抑制作用的研究报道。

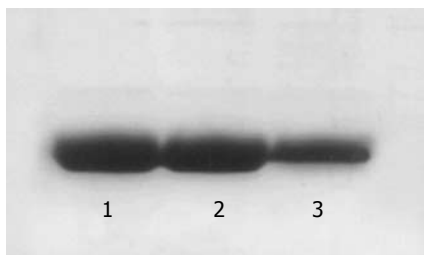


图3 转染细胞Hpa蛋白表达Western blot图谱. 1: 空白组; 2: 空载组; 3: 反义组。

表1 转染细胞肝素酶mRNA及蛋白表达灰度分析比较 (IDV, mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

分组	RT-PCR	Western blot
空白组	43.4 $\pm$ 6.7	203.5 $\pm$ 21.3
空载组	42.5 $\pm$ 7.2	198.2 $\pm$ 15.4
反义组	28.5 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	126.5 $\pm$ 12.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

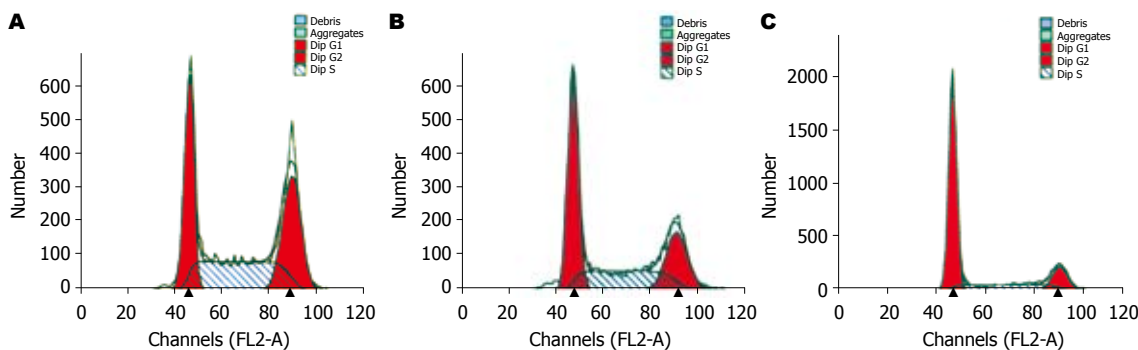


图4 转染细胞流式细胞仪细胞周期分析结果. A: 空白组; B: 空载组; C: 反义组。



图5 转染细胞平板克隆形成实验 (Gimsa  $\times$  200). A: 空白组; B: 空载组; C: 反义组。

组比较无差异(表1), 表明反义Hpa基因转染抑制细胞Hpa蛋白表达。

**2.4 流式细胞仪检测细胞周期** 空白组、空载组、反义组S期细胞所占比例分别为36.3%  $\pm$  2.2%, 33.2%  $\pm$  2.1%和18.8%  $\pm$  2.5%, G<sub>1</sub>期分别为30.7%  $\pm$  3.2%, 39.8%  $\pm$  4.9%和66.0%  $\pm$  2.7%, 反义组与对照组比较, S期细胞比例明显降低( $t = 9.10$ ,  $P = 0.00 < 0.01$ ), 而G<sub>1</sub>期细胞比例明显升高, 比较均有显著差异( $t = 14.60$ ,  $P = 0.00 < 0.01$ ), 表明反义肝素酶基因转染后, SW1990细胞DNA合成期所占的细胞比例明显减少, 而停滞于G<sub>1</sub>期的细胞明显增多, 提示反义Hpa基因转染抑制细胞DNA合成能力(图4)。

**2.5 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力** 3组细胞培养2 wk后均有克隆形成(图5), 反义组克隆形成数、克隆形成率较对照组明显减少, 差异有显著意义( $t = 8.74$ ,  $P = 0.00 < 0.01$ ), 空白组

表2 转染细胞克隆形成及侵袭能力比较 (mean  $\pm$  SD, 个/视野)

分组	克隆形成数	克隆形成率(%)	穿膜细胞数
空白组	30.8 $\pm$ 4.4	61.6%	34.8 $\pm$ 5.8
空载组	28.3 $\pm$ 2.7	56.6%	29.4 $\pm$ 5.6
反义组	12.2 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	24.4%	13.0 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组。

与空载组比较无差异(表2)。表明反义Hpa基因转染降低SW1990细胞克隆形成能力, 细胞增殖活性受抑。

**2.6 Transwell侵袭小室模型测定细胞体外侵袭能力** 3组细胞在Transwell侵袭小室中24 h穿膜细胞数比较, 反义组穿膜细胞数明显减少, 差异有显著意义( $t = 7.19$ ,  $P = 0.00 < 0.01$ ), 空白组与空载组比较无差异(表2, 图6)。表明反义Hpa基因转染

### ■应用要点

本研究通过体外实验研究反义肝素酶基因对胰腺癌的抑制作用, 试图找到一种抑制胰腺癌生长和转移的新途径, 为反义肝素酶基因在临床治疗胰腺癌提供实验依据。



图6 转染细胞体外侵袭能力(Gimsa × 200). A: 空白组; B: 空载组; C: 反义组.

降低SW1990细胞体外侵袭能力.

### 3 讨论

胰腺癌由于解剖位置特殊和生物学侵袭性高, 症状缺乏特异性, 易发生早期转移, 因而确诊时多属晚期, 手术切除率仅为20%左右, 术后5 a生存率不到5%, 是预后最差的消化道恶性肿瘤之一<sup>[9-10]</sup>. 肿瘤局部浸润和远处转移是影响手术效果和生存期的主要原因. 尽管胰腺癌的综合治疗得到不断发展完善, 但当前的治疗效果仍不满意. 针对胰腺癌发生、发展的分子机制, 确立新的防治靶点是提高疗效的关键, 具有重要性意义. 过去的研究揭示了肿瘤浸润和转移是一个复杂的多步骤的连续过程, 包括癌细胞在原发部位的生长以及向周围组织的侵袭和远处转移等一系列过程, 其中肿瘤细胞的恶性增殖和细胞外基质降解是其中的重要步骤, 但有关调控肿瘤细胞浸润和转移的分子机制尚不清楚.

Hpa是一种 $\beta$ -D-葡萄糖苷酸内切酶, 他能够裂解HS侧链, 进而破坏由细胞外基质和基底膜组成的屏障结构, 在肿瘤细胞浸润、转移和肿瘤血管形成过程中起着重要作用<sup>[11-14]</sup>. Hpa基因位于人染色体4q21.3, 由Vlodavsky, Hulett *et al*于1999年分离并克隆. 现已明确Hpa促进肿瘤侵袭和转移的机制有<sup>[15-18]</sup>: (1)降解HSPG, 破坏细胞侵袭的屏障; (2)促肿瘤血管生成, 直接作用于内皮细胞以生芽方式促进血管生成和间接地释放和活化了HS结合的多种生长因子(如碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子等), 促进肿瘤血管形成; (3)介导细胞对ECM及BM的黏附, 引起细胞在基质中的扩散以及促进BM的重塑, 帮助肿瘤细胞侵入血管; (4)HSPG降解后产生的HS片段可激活HS的受体CD44v3, 发出细胞内迁移信号, 从而促进肿瘤细胞的扩散与转移; (5)HSPG降解后的产物可以抑制活化的T淋巴细胞, 从而引起免疫抑制, 促进肿瘤转移. 研究表明, 肝素酶同多种肿瘤的侵袭、转移及预后相

关, 肿瘤细胞恶性程度越高、转移潜能越大、生长速度越快, 其表达水平越高, 而良性肿瘤则低水平表达. 因此, 人们推测Hpa可能是肿瘤细胞侵袭转移所必备的前提条件之一, Hpa可望成为肿瘤转移生物治疗的一个新的基因靶点.

利用反义核酸对肿瘤进行反义基因治疗是近十几年兴起的一项治疗肿瘤的新技术, 其原理是利用反义核酸与其靶基因或基因产物互补形成一种特殊的基因封条结构, 在转录或翻译水平阻断靶基因的异常表达, 阻断细胞内异常信号的传导, 促进细胞正常分化或诱导细胞凋亡, 以达到治疗肿瘤的目的. 反义核酸所针对的靶点应该是在肿瘤发生、发展中起关键作用的一种或几种癌基因、抗癌基因、自分泌生长因子及其受体基因等<sup>[19]</sup>. 近年来, 针对Hpa基因的反义核酸治疗显示对肿瘤的生长和转移有良好的抑制作用, 尽管还在实验室阶段, 但已显示出诱人前景. Uno *et al*<sup>[20]</sup>构建了含有全长人Hpa cDNA序列的反义腺病毒载体, 将此反义腺病毒转染高表达Hpa的肿瘤细胞株后, 发现Hpa基因的表达受到抑制, 而且Hpa反义腺病毒不仅在体外抑制肿瘤细胞的浸润能力, 在体内也可抑制肿瘤细胞的胸膜播散. Edovitsky *et al*<sup>[21]</sup>将直接作用于Hpa mRNA的锤头状的抗Hpa核酶或siRNA重组到质粒载体中, 再转染到人乳腺癌、鼠淋巴瘤和黑色素瘤细胞株中, 体外实验发现被转染的细胞株Hpa表达水平下降, 侵袭力和黏附力显著降低, 动物在体内实验表现为血管分布减少, 转移能力的下降.

研究培养肿瘤细胞增殖和侵袭能力的方法有细胞生长曲线、细胞周期分析、细胞克隆形成实验、体外侵袭实验等, 通过这些实验可以对肿瘤细胞的增殖和侵袭能力进行综合判断. 增殖和侵袭能力高者细胞体外生存能力强, 恶性程度高, 体内易发生转移<sup>[22]</sup>. 我们利用前期实验转染反义人肝素酶基因的人胰腺癌高转移细胞株SW1990, 通过细胞周期分析、细胞克隆形

### ■名词解释

硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG): 是一种蛋白聚糖类碳水化合物, 是脊椎动物和无脊椎动物组织细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜(basement membrane, BM)的主要成分之一, 能与细胞表面及ECM中的活性分子结合, 黏附于细胞表面, 是ECM聚集和稳定的基础, 在组织构成、血管形成和细胞黏附等诸多方面发挥重要的生理作用.



### ■同行评价

本文将反义肝素酶基因转染胰腺癌细胞后通过RT-PCR, Western blot和免疫组化分别在mRNA、蛋白及细胞水平检测肝素酶表达的改变,并进一步通过平板克隆及Transwell模型检测胰腺癌细胞增殖及浸润能力的改变,同时通过流式细胞术检测细胞周期的改变,从而进一步探讨其作用机制,有较好的学术价值及应用前景.不足之处在于,讨论中未能紧密结合实验结果展开讨论其作用机制.

成实验、体外侵袭实验等研究反义肝素酶基因对胰腺癌细胞的体外增殖和侵袭活性的影响,结果发现,转染反义Hpa基因的细胞克隆形成数、克隆形成率、Transwell侵袭小室中穿膜细胞数均明显较对照组降低;细胞周期分析发现其处于DNA合成期的细胞明显减少,而停滞于G<sub>1</sub>期的细胞明显增多.上述结果表明反义Hpa基因转染明显抑制了胰腺癌细胞的增殖与侵袭能力,显示出反义Hpa基因在胰腺癌治疗中的前景.

我们进一步采用免疫组化和Western blot免疫印迹方法在蛋白水平上、用RT-PCR方法在mRNA水平上检测了胰腺癌细胞Hpa的表达,结果发现转染了反义基因的胰腺癌SW1990细胞Hpa表达明显较对照组降低,显示反义Hpa基因对SW1990细胞表达Hpa有较强的抑制作用,提示反义Hpa基因抗胰腺癌增殖和侵袭的分子机制可能是其在基因转录水平上其下调了肝素酶的表达,从而改变胰腺癌细胞的生长周期,抑制癌细胞增殖及侵袭,但是这种调控机制尚需进一步深入研究.

**致谢:** 第三军医大学西南医院消化专科中心杨仕明博士提供质粒载体、肝素酶抗体及部分实验经费.

### 4 参考文献

- 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
- 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
- Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, Aviv A, Peretz T, Pecker I, Pappo O. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1167-1175
- 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
- Tang W, Nakamura Y, Tsujimoto M, Sato M, Wang X, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Heparanase: a key enzyme in invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Mod Pathol* 2002; 15: 593-598
- Koliopoulos 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
- Rohloff J, Zinke J, Schoppmeyer K, Tannapfel A, Witzigmann H, Mossner J, Wittekind C, Caca K. Heparanase expression is a prognostic indicator for postoperative survival in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 1270-1275
- 杨彦, 陈陵, 崔明, 段体德. 正、反义Heparanase基因荧光真核表达载体的构建及胰腺癌SW1990细胞转染. *昆明医学院学报* 2006; 27: 31-34
- 李兆申. 胰腺癌流行病学研究进展. *解放军医学杂志* 2002; 27: 283-285
- Yoshizawa K, Nagai H, Kurihara K, Sata N, Kawai T, Saito K. Long-term survival after surgical resection for pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1153-1156
- Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 793-802
- Dong J, Kukula AK, Toyoshima M, Nakajima M. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene* 2000; 253: 171-178
- Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* 2001; 108: 341-347
- Goldshmidt O, Zcharia E, Abramovitch R, Metzger S, Aingorn H, Friedmann Y, Schirmacher V, Mitrani E, Vlodavsky I. Cell surface expression and secretion of heparanase markedly promote tumor angiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10031-10036
- Gohji K, Katsuoka Y, Okamoto M, Kamidono S, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Nakajima M. Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer. *Hinyokika Kyo* 2000; 46: 757-762
- Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, Aingorn H, Cohen I, Nadav L, Katz BZ, Geiger B, Vlodavsky I. Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *FASEB J* 2003; 17: 1015-1025
- Kuniyasu H, Chihara Y, Kubozoe T, Takahashi T. Co-expression of CD44v3 and heparanase is correlated with metastasis of human colon cancer. *Int J Mol Med* 2002; 10: 333-337
- Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Pappo O, Pecker I, Vlodavsky I. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB J* 2001; 15: 1661-1663
- Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 31-44
- Uno F, Fujiwara T, Takata Y, Ohtani S, Katsuda K, Takaoka M, Ohkawa T, Naomoto Y, Nakajima M, Tanaka N. Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7855-7860
- Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I. Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1219-1230
- 高进. 癌的侵袭和转移. 第1版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996: 15-27

电编 张敏 编辑 潘伯荣

# 表面增强的激光解析电离飞行时间质谱技术在肝细胞癌血清学诊断中的应用

田字彬, 刘 华, 孙桂荣, 孔心涓, 张翠萍, 王 斌

田字彬, 孔心涓, 张翠萍, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003  
刘华, 青岛大学医学院附属医院内镜中心 山东省青岛市 266003  
孙桂荣, 青岛大学医学院附属医院临床免疫检验中心 山东省青岛市 266003  
王斌, 青岛大学医学院微生物教研室 山东省青岛市 266021  
田字彬, 1995年上海第二医科大学博士, 1989-2003日本福井医科大学访问学者, 主任医师, 教授, 从事消化系统疾病的诊治研究。  
青岛市科技局资助项目, No. 2004-11  
通讯作者: 田字彬, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科. tianzb@qdumh.qd.sd.cn  
电话: 0532-82911304 传真: 0532-82911999  
收稿日期: 2006-06-21 接受日期: 2006-07-10

## Application of surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology in the diagnosis of hepatocellular carcinoma

Zi-Bin Tian, Hua Liu, Gui-Rong Sun, Xin-Juan Kong, Cui-Ping Zhang, Bin Wang

Zi-Bin Tian, Xin-Juan Kong, Cui-Ping Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Hua Liu, Department of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Gui-Rong Sun, Clinical Immunologic Center, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Bin Wang, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Supported by Qingdao Technology Agency, No. 2004-11  
Correspondence to: Dr. Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdumh.qd.sd.cn  
Received: 2006-06-21 Accepted: 2006-07-10

## Abstract

**AIM:** To explore tumor markers for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) through detecting the serum protein spectrum differently expressed between hepatitis B virus (HBV) carriers and HCC patients.

**METHODS:** We detected the serum protein spectrum in 27 HCC patients, 27 HBV carriers and 25 healthy controls using surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) technique, and the diagnosis model was established through analyzing the detected data by biomarker patterns software (BPS) 5.0.

**RESULTS:** The protein peaks, which could discriminate HBV carriers from HCC patients and healthy individuals, as well as healthy individuals from HCC patients, were detected. A diagnosis model based on the detected data was established with the specificity of 93%, 96%, 84%, and sensitivity of 85%, 96%, 89%, respectively. In addition, the 8141-Da protein in HCC patients had a higher expression than that in HBV carriers ( $P < 10^{-5}$ ); the expression of 3448-Da protein was higher both in HCC patients and HBV carriers than that in healthy controls ( $P < 10^{-5}$ ), but it had no significant difference between HCC patients and HBV carriers ( $P > 0.05$ ), indicating that 3448-Da protein might be a potential marker for HBV infection; 7771-Da protein was differently expressed between the three groups of patients.

**CONCLUSION:** With a high specificity and sensitivity, the detection of serum protein spectrum can be performed easily and quickly by SELDI-TOF-MS technique, which provides a serological way for the diagnosis of HCC.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Proteomics; Tumor marker; Surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

Tian ZB, Liu H, Sun GR, Kong XJ, Zhang CP, Wang B. Application of surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2499-2503

## 摘要

**目的:** 检测HBV感染携带者与肝细胞癌(HCC)患者血清蛋白质的差异性表达, 以发现HCC

## ■背景资料

我国是一个肝炎大国, 原发性肝癌的发病率高且预后差, 目前尚无单一的敏感且特异的标志物能诊断所有肝癌. SELDI蛋白质芯片技术是近年来新兴的蛋白质组学技术, 本研究利用其具有快捷、简单、灵敏、可同时检测多种蛋白质, 并且可检测微量蛋白等特点, 用以筛选HCC的标志蛋白, 为HCC的诊治开辟新的途径.

## ■研发前沿

SELDI蛋白质芯片技术的运用为发现肿瘤相关的多蛋白生物标记物标记提供了一种全新的蛋白质组学方法,目前国内外研究聚焦于探索早期肿瘤标志物以及选择肿瘤的治疗靶点,但是其研究技术仍难以实现鉴定细胞和组织的一个蛋白质,蛋白质数据库尚待完善。目前集蛋白质分离和鉴定于一体的蛋白质芯片的研究正在迅速发展,相信蛋白质组学技术将最终成为人类重大疾病机制阐明和诊断的有利武器。

的肿瘤诊断标志物。

**方法:** 用表面增强的激光解析电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术检测27例HCC患者, 27例HBV感染携带者, 25例健康对照血清中的蛋白质谱, 并用Biomarker Patterns System 5.0软件分析, 建立诊断模型。

**结果:** 检测HCC患者与HBV感染携带者, 正常对照与HCC患者, 正常对照与HBV感染携带者的差异性蛋白分子, 据此构建分类模型, 得到的灵敏度和特异度分别为93%, 85%; 96%, 96%; 84%, 89%。其中相对分子质量为8141 Da的蛋白峰在HCC组明显高于HBV感染组( $P<10^{-5}$ ); 相对分子质量为3448 Da的蛋白峰在HCC及HBV感染携带组表达均较正常组显著增高( $P<10^{-5}$ ), 而在HCC-HBV组无明显差异( $P>0.05$ ), 提示其可能为HBV感染的一种标志蛋白; 相对分子质量为7771 Da的蛋白峰在3组中均有差异性表达。

**结论:** SELDI蛋白芯片技术检测血清蛋白质谱法诊断HCC具有较高的灵敏度和特异度, 操作简单快捷, 临床应用前景广阔, 为HCC诊断提供了新的血清学方法。

**关键词:** 肝细胞癌; 蛋白质组学; 肿瘤标志物; 表面增强的激光解析电离飞行时间质谱

田宇彬, 刘华, 孙桂荣, 孔心涓, 张翠萍, 王斌. 表面增强的激光解析电离飞行时间质谱技术在肝细胞癌血清学诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2499-2503  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2499.asp>

## 0 引言

原发性肝细胞癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤, 其死亡率位居第二, 由于HCC患者早期常无明显症状, 发现时已属中晚期, 患者预后差。其中约90%是乙型肝炎病毒(HBV)感染者经过15-25 a的慢性过程转化而来的。HBV感染致HCC发生的详细机制尚不十分清楚, 因此, 对高危人群筛查发现早期HCC并给予干预治疗和跟踪随访是降低HCC发生的有效方法。AFP及CT检查是发现HCC的主要检查手段, 但对发现早期HCC特别是对监测HBV感染者何时发生癌变尚无可靠预测作用。因此, 迫切需要探索一种快速、简单、灵敏度高、特异性好的早期诊断方法。

许多疾病即使没有任何症状的早期, 细胞内的蛋白质在成分和数量上都会有一定程

度改变, 并通过血清蛋白质水平反映出来。因此, 通过比较不同人群血清中差异蛋白质的表达, 可能筛选出肿瘤相关的标志分子或特异性的蛋白质谱。SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization)蛋白质芯片技术<sup>[1-2]</sup>是近年来新兴的一种蛋白质组研究技术, 可以对体液和血清中的蛋白质进行检测, 为寻找肿瘤相关蛋白质标志物提供了重要的技术手段。目前已陆续报道采用SELDI蛋白质芯片技术检测膀胱癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌等<sup>[3-6]</sup>患者血清中特异的标志分子。我们运用该技术检测HCC患者、HBV携带者及健康对照的血清蛋白质差异性表达, 通过分别比较各组之间蛋白质谱表达的差异, 筛选HCC的标志蛋白, 为HCC的诊断、治疗以及发病机制的探讨提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HBV阳性且未治疗的HCC患者27(男22, 女5)例, 平均年龄55岁, 均经病理或临床诊断确诊; 单纯HBV感染携带者27(男20, 女7)例, 平均年龄50岁; 健康对照25(男14, 女11)例, 平均年龄49岁。标本均取自青岛大学医学院附属医院, 各组年龄及性别均匹配( $\chi^2$ 检验,  $P>0.05$ )。50 mmol/L醋酸钠(NaAc, pH 4.0), 9 mmol/L尿素(U9, 含DTT), HPLC水, 乙腈, 三氟乙酸, 饱和芥子酸(SPA), Triton均购自美国Sigma公司, 蛋白质芯片时间质谱分析仪(PBS II C)及弱阳离子交换(WCX-2)蛋白质芯片由美国Ciphergen Biosystems公司提供, 低温离心机购自日本日立公司。采集空腹全血标本5 mL, 立即放入4℃, 静置3 h, 4℃ 4000 r/min离心10 min, 吸取血清按每管50  $\mu$ L分装后置-86℃冰箱保存备用。

**1.2 方法** 取血清10  $\mu$ L加入U9 20  $\mu$ L混匀后冰浴300 r/min震荡30 min, 然后加入WCX-2 buffer (50 mmol/L NaAc, pH 4.0) 360  $\mu$ L。将芯片装入生物芯片处理器(Bioprocessor), 每孔加入WCX-2 buffer (50 mmol/L NaAc, pH 4.0) 200  $\mu$ L预处理芯片, 置于振荡器(MS1 Minishaker) 300 r/min约5 min, 重复上述操作1次。在芯片处理器每孔中加入处理好的血清样100  $\mu$ L, 置振荡器300 r/min, 1 h。甩出样品, 每孔加入WCX-2 buffer 200  $\mu$ L, 室温置振荡器300 r/min, 震荡5 min, 甩去孔中液体, 再次加入WCX-2 buffer 200  $\mu$ L, 重复操作1次。每孔加入HEPES (1 mmol/L, pH 4.0) 200  $\mu$ L, 立刻甩出。立刻拆开芯片处理器, 取出芯片, 风干后, 立刻

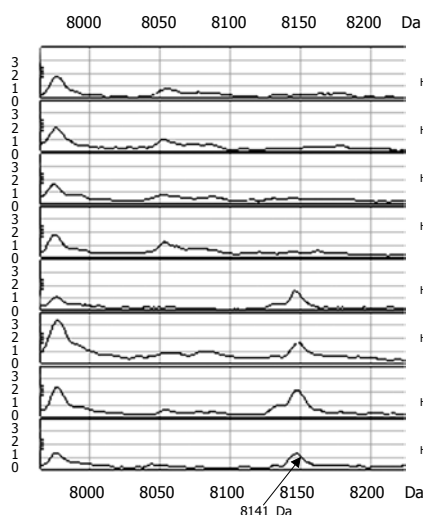


图1 蛋白峰8141 Da在HBV组中表达下降, 在HCC中表达升高。

在每个加样孔上加SPA 0.5  $\mu$ L并重复1次。然后行质谱分析。蛋白质芯片采用PBS II C型蛋白质芯片时间飞行质谱仪读取数据, 仪器每天用标准多肽和低于200 kDa的蛋白质标准分子校正: 系统的质量偏差为0.1%。检测芯片时参数设置如下: 激光强度210, 检测敏感度10, 优化分子质量范围为2-10 kDa, 最高分子质量为50 kDa。

**统计学处理** 采用CIPHERGEN proteinchip 3.0版本的分析软件自动采集数据, 结果用Biomarker Wizard软件转化为Excel表后用BPS 5.0 (biomarker patterns systems 5.0)软件分析HCC患者、HBV携带者、正常对照的蛋白质谱差异, 并将差异蛋白分子构建分类模型, 从而得出特异度和灵敏度。

## 2 结果

**2.1 质谱分析** 用CIPHERGEN proteinchip 3.0软件在分子质量为1.2-30 kDa范围内对3组样品进行质谱分析, 用Biomarker Wizard软件对分子质量及能量校正后共得出92个有意义峰, 将其转入BPS 5.0分析, 分别对HBV感染携带者样本与HCC样本(HBV-HCC)、正常样本与HCC样本(N-HCC)、正常样本与HBV感染携带者进行比较(N-HBV), 检测出差异蛋白峰(表1)。将全部92个峰在分子质量为1.2-30 kDa范围内构建分类模型, 分别选择有意义的峰构建结构图, 根据此分类模式得出其灵敏度和特异度(表2)。

**2.2 蛋白表达差异** 通过BPS5.0软件统计分析, 显示相对分子质量8141 Da的蛋白峰为HBV-HCC组差别最显著的蛋白峰, 其在HCC组表达显

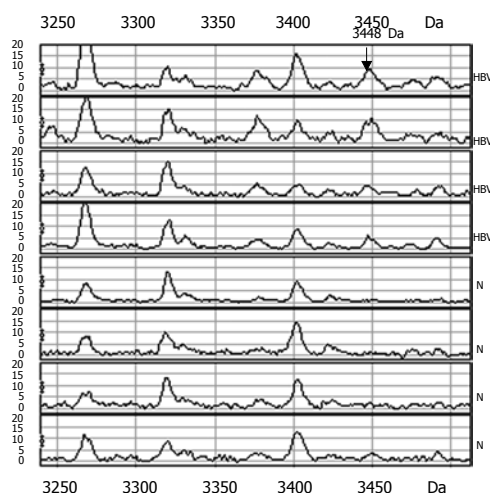


图2 蛋白峰3448 Da在HBV组中表达升高, 在N组表达下降。

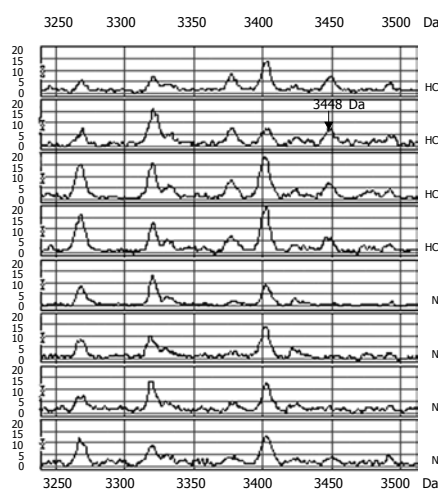


图3 蛋白峰3448 Da在HCC组中表达升高, 在N组表达下降。

著高于HBV组(图1); 3448 Da的蛋白峰为区别N-HCC, N-HBV组最有意义的蛋白峰, 其在HBV, HCC组均高于N组, 而在HBV-HCC组无明显差别(图2, 3); 另外, 7771 Da的蛋白峰在3组中表达均有差异, 其在正常对照组中表达最高, 在HCC组表达次之, 在HBV感染携带组中表达最低(图4)。

## 3 讨论

癌症的发生是一个多因素诱导、多事件参与、多基因突变的漫长的多阶段过程。HCC也不例外, 其中HBV的感染在HCC发生过程中具有重要的意义。目前关于HBV的致癌机制在基因水平研究最多的是关于X基因的整合引起肝细胞一系列的功能变化<sup>[7]</sup>。在肝细胞癌变过程中某些癌变相关的基因表达异常, 合成并分泌一些微

### ■创新盘点

本研究运用新兴的蛋白质组学技术寻找HCC的肿瘤标志物, 为HCC的诊断开辟了新的途径。

### ■应用要点

8141 Da, 3448 Da, 7771 Da等蛋白标志分子可有望为HCC的标志分子, 分离并鉴定这些分子将对HCC的诊断治及发病机制的探索提供理论依据。



# 名词解释

## SELDI-TOF-MS

技术: 表面增强的激光解吸电离飞行时间质谱技术, 主要用于蛋白质的研究, 工作原理是当激光到达蛋白样品表面时, 样品结晶发生离子化和解吸附, 结果使分析物电离, 并转变为气相, 在电场中快速运动即“飞行”, 带正电荷的蛋白质被排斥而正极飞离金属片, 当一定电压下的电场能量施加在蛋白质分子上时, 其飞行速度取决于质量, 蛋白芯片阅读器精确记录被检分子的飞行时间并据此得出分子量。

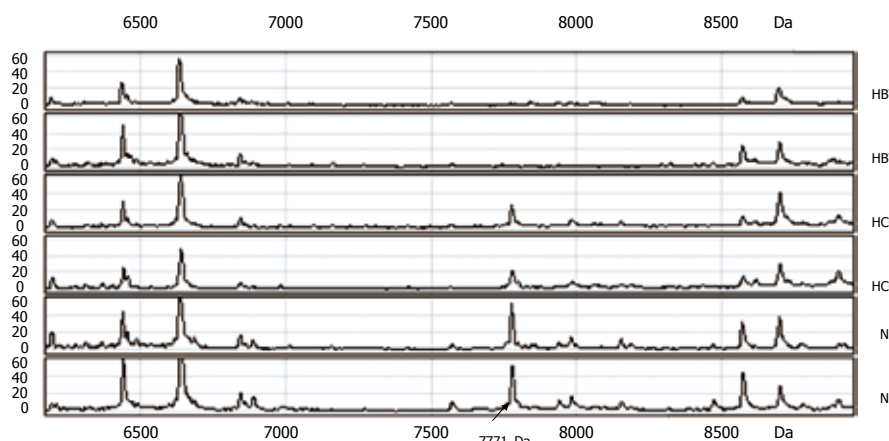


图 4 SELDI-TOF 质谱: 7771 Da 的蛋白峰在 HBV, HCC 及正常对照组之间的蛋白峰图, 可见其在 HCC 中表达明显高于 HBV 患者, 而正常对照中表达则最高。

表 1 HBV-HCC, N-HCC, N-HBV 组的差异蛋白峰 (Da)

HBV-HCC	8141	7771 <sup>1</sup>	10 267 <sup>2</sup>	9288	3939			
N-HCC	3448 <sup>2</sup>	13 756	13 968	6884	3377	7771 <sup>1</sup>	8566	7934
N-HBV	3448 <sup>2</sup>	3377	3890	7771 <sup>1</sup>	7934	10 267 <sup>2</sup>		

<sup>1</sup>表示此蛋白峰在3组中均有差异表达; <sup>2</sup>表示其在2组中有差异性表达。

量蛋白进入外周血, 通常难以检测到或处于极低水平, 临床上现有的 HCC 标志物众多, 尚无单一标志物能够诊断所有 HCC。敏感而特异的如 AFP-L3, HCC 特异性 GGT 和 TGF- $\beta$ 1 等, 他们间无相关性并起互补作用, 这就需要探索一种新的技术以发现早期肿瘤标志物。

SELDI 蛋白质芯片技术是近年发展起来的先进的蛋白质组学技术, 可检测疾病进展中不同阶段血清中多肽量的变化, 翻译后修饰的改变或某些多肽的聚糖结构变化, 为 HCC 肿瘤标志物的进展提供了一个新的方法, 他以灵敏度高、特异性好、重复性强、操作简单、可同时检测血清中的多种蛋白质等优势, 已被应用于检测血清、尿液、细胞裂解液、脑脊液、组织等<sup>[3,8-10]</sup>多种生物学样品。我们运用 SELDI 蛋白质芯片结合生物信息学技术, 检测了 27 例 HCC 患者, 27 例 HBV 感染携带者, 25 例正常人血清中蛋白质的差异性表达, 从中筛选出各自的相关性标志分子, 使用此标志分子检测 HBV-HCC, N-HCC, N-HBV 得出的灵敏度, 特异度分别为 85%, 93%; 96%, 96%; 89%, 84%。研究显示, 8141 Da 的蛋白峰为 HBV-HCC 组差别最显著的蛋白峰, 其在 HCC 组表达显著高于 HBV 组, 检测并鉴定此分子的表达对 HCC 的诊断具有重要意义; 3448 Da 的蛋白峰在 HCC 组及 HBV 感染携带组均较正常组显著增高, 而在 HBV-HCC 组无明显差异, 提示其可能为 HBV 感染的一种标志蛋

表 2 HBV-HCC, N-HCC, N-HBV 组的灵敏度和特异度(%)

	HBV-HCC	N-HCC	N-HBV
灵敏度	85	96	89
特异度	93	96	84

白; 而 7771 Da 的蛋白峰在三组中均有差异性表达, 其在正常对照中表达则最高, HCC 中表达次之, 而在 HBV 组表达最低。为此, 我们据其分子质量进行检索(<http://us.expasy.org/tools/tagident.html>), 查得其与血小板因子-4 (PF-4) 前体的分子质量最为接近, PF-4 具有抑制内皮细胞增殖和细胞周期中的作用, 可通过干扰血管生成而抑制肿瘤细胞生长<sup>[11]</sup>, 而该蛋白是否为 PF-4 以及其在肝癌发生、进展过程中的具体作用尚待进一步探讨。因此, 鉴定出这些蛋白分子, 并进一步研究其构象、氨基酸组成及生物学功能, 将有助于探讨疾病发生的机制, 并为设计治疗靶点提供依据, 对蛋白质数据库的完善具有重要意义。

由于我们采集和处理要求较高, 故可以用于分析的样本量相对较少, 对本实验相关标志分子的敏感性和特异性的提高有影响。因此, 我们将在今后的研究中扩大样本量, 并对一部分样本进行盲筛, 进一步确认本实验筛选出蛋白质分子的特异性和敏感性, 同时还要对 HCC 发展不同阶段, 不同类型患者进行蛋白质谱分析, 以期发现 HCC 分期分类的标志分子。在临床

检测中, 运用多个标志分子代替单一标志分子鉴定肿瘤早期出现的微小蛋白, 可望早期诊断 HCC. 研究表明, SELDI蛋白质芯片结合生物信息学技术可检测出HCC患者血清中肿瘤特异性蛋白质图谱, 可以作为潜在的检测和分类癌症及癌症分型的临床工具, 有高度敏感性和特异性, 为HCC的诊断提供了崭新的途径和方法, 具有广阔的临床应用前景. 此外, 鉴定出相关蛋白标志分子将有助于了解HCC的产生及预后.

#### 4 参考文献

- 1 Robinson JC, Kerjan P, Mirande M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J Mol Biol* 2000; 304: 983-994
- 2 Stoop AA, Jespers L, Lasters I, Eldering E, Pannekoek H. High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor 1 (PAI-I). *J Mol Biol* 2000; 301: 1135-1147
- 3 Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinis S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr GL Jr. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001; 158: 1491-1502
- 4 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 5 Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62: 3609-3614
- 6 Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1296-1304
- 7 曹基辉, 张静. 乙肝病毒X基因与肝细胞肝癌. 国外医学病毒学分册 2003; 10: 28-31
- 8 Carrette O, Demalte I, Scherl A, Yalkinoglu O, Corthals G, Burkhard P, Hochstrasser DF, Sanchez JC. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics* 2003; 3: 1486-1494
- 9 Hayman MW, Przyborski SA. Proteomic identification of biomarkers expressed by human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 918-923
- 10 Melle C, Kaufmann R, Hommann M, Bleul A, Driesch D, Ernst G, von Eggeling F. Proteomic profiling in microdissected hepatocellular carcinoma tissue using ProteinChip technology. *Int J Oncol* 2004; 24: 885-891
- 11 Gupta SK, Singh JP. Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J Cell Biol* 1994; 127: 1121-1127

#### ■同行评价

本文采用SELDI蛋白芯片技术检测HBV了感染携带者与HCC患者血清蛋白质的差异性表达, 以发现HCC的肿瘤诊断标志物, 实验结果可信, 具有较高学术价值及实用价值.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

#### • 消息 •

### 2006中国结直肠肛门外科学术会议通知

**本刊讯** 为了加强与世界同行的交流与接轨, 将我国直肠肛门外科的专利化发展到一个新的台阶, 由“中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组”、“中国抗癌协会大肠癌专业委员会”、“中国中医药学会肛肠分会”和“中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会”共同主办的“2006中国结直肠肛门外科学术会议”将于2006-11-09/12在珠海国际会议中心大酒店举行. 届时结直肠肛门外科的专家、同行将共聚一堂, 规划我国结直肠肛门外科协作研究、共同发展的前景. 大会将邀请国际最著名的美国、欧洲、新加坡、日本、香港及台湾的专家和我国外科界、中医界、肿瘤界以及相关领域的专家就本专业进展作专题报告. 大会同时还采用手术录像、提问、讨论、争鸣、答疑、展板等多种方式进行研究交流. 这将是我国结直肠肛门外科学界的一次盛会. 诚邀普通外科、结直肠肛门外科的专家、同行参会, 参会者可获得中华医学会 I 类继续教育学分.

联系电话: 020-87331428, 87332200-86698

# 肝细胞核因子4 $\alpha$ 和3 $\beta$ 在人主要器官中的表达

龙云, 唐红, 刘聪, 何芳, 刘丽, 赵连三, 黄飞骏

## ■背景资料

肝富集转录因子(LETFs)是一类具基因转录调控作用的蛋白质分子, 主要存在于肝脏, 他能与HBV的4个启动子结合, 对HBV基因转录起重要调控作用。肝细胞核因子4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ )和3 $\beta$  (HNF-3 $\beta$ )均为LETFs的成员, 对于其在人体各器官的分布情况, 虽曾有少数研究报告, 但仍缺乏系统性及全面性, 因此, 观察人体主要器官中二者的表达情况, 对今后进一步研究LETFs与HBV嗜肝性的可能关系, 奠定一定研究基础。

龙云, 唐红, 刘聪, 何芳, 刘丽, 赵连三, 四川大学华西医院感染性疾病中心 四川大学生物治疗国家重点实验室感染性疾病研究室 610041

黄飞骏, 四川大学华西基础医学与法医学院 四川省成都市 610041

龙云, 医学硕士, 主要从事病毒性肝炎的研究工作。

国家杰出青年科学基金资助项目, No. 30325036

通讯作者: 黄飞骏, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西基础医学与法医学院. fjhuang600123@163.com

电话: 028-81822623

收稿日期: 2006-06-21 接受日期: 2006-07-31

## Expression of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ and 3 $\beta$ in human tissues

Yun Long, Hong Tang, Cong Liu, Fang He, Li Liu, Lian-San Zhao, Fei-Jun Huang

Yun Long, Hong Tang, Cong Liu, Fang He, Li Liu, Lian-San Zhao, Center of Infectious Diseases, West China Hospital; Department of Infectious Diseases, National Key Laboratory of Biological Therapy, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Fei-Jun Huang, School of Preclinical Medicine and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by the Science Fund for Prominent Youths of China, No. 30325036

Correspondence to: Fei-Jun Huang, School of Preclinical Medicine and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. fjhuang600123@163.com

Received: 2006-06-21 Accepted: 2006-07-31

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression patterns of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) and HNF-3 $\beta$  in normal human tissues, so as to provide the bases for further exploration of their relationships with hepatitis B virus (HBV) replication in hepatitis B patients.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of HNF-4 $\alpha$  and HNF-3 $\beta$  in human tissues of liver, brain, lung, kidney, heart, spleen, intestine, pancreas, stomach and thyroid from 14 corpses. The differences of their expression in different tissues were analyzed.

**RESULTS:** The expression patterns of HNF-4 $\alpha$  and HNF-3 $\beta$  was different among the 10 kinds

of human tissues (HNF-4 $\alpha$ :  $F = 22.479$ ,  $P < 0.01$ ; HNF-3 $\beta$ :  $F = 13.021$ ,  $P < 0.01$ ). Both HNF-4 $\alpha$  and HNF-3 $\beta$  expression were not detected in brain, lung, stomach, appendix, thymus, adrenal gland and tonsil. Besides the tissues mentioned above, the expression of HNF-4 $\alpha$  was significantly higher in liver, kidney, heart, spleen and intestines than that in the other tissues; the expression of HNF-3 $\beta$  was markedly higher in liver, kidney, heart and pancreas than that in the other tissues. The difference between high-level expression and low-level expression group has statistical significance ( $P < 0.05$ ); however, the difference among those tissues with high-level expression had no statistical significance ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of HNF-4 $\alpha$  and HNF-3 $\beta$  are different among human tissues, and they are highly expressed in some tissues such as liver. This result indicates that HNF-4 $\alpha$  and HNF-3 $\beta$  might participate in the tissue-specific replication of HBV.

**Key Words:** Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ; Hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$ ; Human tissue; Expression; Hepatitis B virus replication

Long Y, Tang H, Liu C, He F, Liu L, Zhao LS, Huang FJ. Expression of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  and 3 $\beta$  in human tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2504-2509

## 摘要

**目的:** 观察肝细胞核因子4 $\alpha$  (Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ , HNF-4 $\alpha$ )和HNF-3 $\beta$ 在人主要组织器官中的表达情况, 为进一步探索这两个因子与慢性乙型肝炎患者HBV复制之间的可能关系提供理论基础。

**方法:** 采用免疫组织化学染色方法检测HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在14例尸解标本的主要器官(肝、脑、肺、肾、心、脾、肠、胰腺、胃和甲状腺)中的表达情况。

**结果:** HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在10个器官的表达情况不同(HNF-4 $\alpha$ :  $F = 22.479$ ,  $P < 0.01$ ; HNF-

3 $\beta$ :  $F = 13.021$ ,  $P < 0.01$ ). HNF-4 $\alpha$ 在肝、肾、心、脾和肠中呈高水平表达, 在肺和甲状腺呈低水平表达; HNF-3 $\beta$ 在肝、肾、心和胰腺中呈高水平表达, 在脾、肺、肠和甲状腺中呈低水平表达; HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在脑、胃、阑尾、胸腺、肾上腺和扁桃体中均不表达; 上述HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 高表达组和低表达组的表达水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而高表达组各器官之间的表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).

**结论:** 人体各组织中HNF-4 $\alpha$ 与HNF-3 $\beta$ 的表达水平不同, 在肝脏的表达水平较高, 这提示二者有可能参与了HBV的组织特异性复制.

**关键词:** 肝细胞核因子4 $\alpha$ ; 肝细胞核因子3 $\beta$ ; 器官; 表达; HBV复制

龙云, 唐红, 刘聪, 何芳, 刘丽, 赵连三, 黄飞骏. 肝细胞核因子4 $\alpha$ 和3 $\beta$ 在人主要器官中的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2504-2509  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2504.asp>

## 0 引言

肝富集转录因子(liver-enriched transcription factors, LETFs)是一类主要存在于肝脏并且可以调控肝特异基因表达的转录因子, 他可以分为6大类<sup>[1]</sup>: (1)含亮氨酸拉链结构域的CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP); (2)肝细胞核因子1家族(hepatocyte nuclear factor 1, HNF1), 含一个可变的同源结构域; (3)HNF-3家族; (4)HNF-4家族; (5)具有一个锌指DNA结合结构域的固醇类受体相关转录因子、甲胎蛋白转录因子(fetoprotein transcription factor, FTF)、人B1结合因子(human B1-binding factor, hB1F); (6)HNF6. 这些转录因子及其相互作用构成的复杂调控网络精确地控制着肝脏的早期发育及各项功能的发挥. 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属嗜肝DNA病毒. 研究显示, LETFs在HBV肝特异性转录复制中具有重要的调控作用<sup>[2]</sup>. 体外细胞培养和动物实验研究表明, HNF-4 $\alpha$ 可以支持HBV在非肝源细胞中的复制<sup>[3]</sup>, 而HNF-3 $\beta$ 对HBV复制具抑制作用<sup>[4]</sup>. 但目前对HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在人体组织器官中的表达情况及其与HBV复制间的相互关系尚不十分清楚. 我们利用免疫组织化学方法, 观察HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在人体全身主要器官中的表达, 旨在为今后进一步探讨二者对HBV复制的可能调控机制提供理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 尸解14例全身主要组织器官, 由四川大学华西基础医学与法医学院提供. 男13例, 女1例, 年龄17-78岁; 均为意外猝死, 无肝病史, 每例尸解者取8-15个组织器官不等. 全身组织器官包括肝(13例)、脑(13例)、肺(14例)、心(14例)、肠(6例)、脾(14例)、胰腺(11例)、肾(13例)、胃(3例)、甲状腺(5例)以及个别其他器官. 上述器官均由40 g/L甲醛固定.

**1.2 方法** 石蜡切片厚度为3  $\mu$ m. 组织芯片用二甲苯脱蜡3次, 用乙醇梯度水化, 然后用30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37℃孵育20 min, 以去除内源性过氧化物酶; 微波加热3次, 进行抗原修复; 30 g/L小牛血清白蛋白封闭20 min; 吸去封闭液后加一抗, 一抗为羊抗HNF-3 $\beta$ 和羊抗HNF-4 $\alpha$ (美国Santa Cruz生物技术公司), 分别按1:30和1:50比例稀释, 37℃孵育1 h后, 4℃过夜; 经PBS洗涤3次后加二抗, 二抗为生物素化的兔抗山羊抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司), 37℃孵育1 h; 用PBS洗涤3次后加SABC试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司), 37℃孵育1 h; PBS洗涤3次后用DAB(武汉博士德生物工程有限公司)显色, 苏木素复染2 min, 10 mL/L盐酸酒精分化20 s, 树胶封片. 参照Axiotis标准<sup>[5]</sup>, 由2位病理医生采用盲法独立在高倍镜( $\times 400$ )下读片, 每张切片随机观察5个不重复的视野, 然后分别从染色强度和阳性细胞数进行评分, 再计算总分 = 染色强度分值+阳性细胞计数分值, 为使结果更加准确可靠, 每个标本均用3张切片进行免疫组化染色, 读片结果取平均值. 结果判读及程度分析标准(DAB显色): 染色强度为不着色或阳性细胞数<10%者评为0分; 染色强度为黄色或阳性细胞数在10%-40%者评为1分; 染色强度为棕黄色或阳性细胞数在41%-70%者评为2分; 染色强度为黄褐色或阳性细胞数>70%者评为3分. 本实验中将总分 $\leq 1$ 分判定为不表达(无染色阳性信号), 2-3分为低水平表达(染色强度弱, 阳性细胞数少), 4-6分为高水平表达(染色强度较强, 阳性细胞数较多).

**统计学处理** 所得数据用 $F$ 值表示, 采用SPSS 10.0软件包进行方差分析和 $\kappa$ 一致性检验,  $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

## 2 结果

免疫组织化学染色结果显示, HNF-4 $\alpha$ 在肝、肾、心、脾和肠中呈高水平表达, 在肺和甲状

### ■应用要点

本文对HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在人体各器官的分布情况进行了观察, 并且初步探讨了二者在不同器官分布不同的可能原因, 为进一步研究HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 这2种LETfs与HBV嗜肝性的可能关系提供理论基础.



### ■同行评价

本文观察了肝细胞核因子4 $\alpha$ 和肝细胞核因子3 $\beta$ 在人主要组织器官中的表达情况,探讨了这2个因子与慢性乙型肝炎患者HBV复制之间的可能关系,具有一定学术价值。

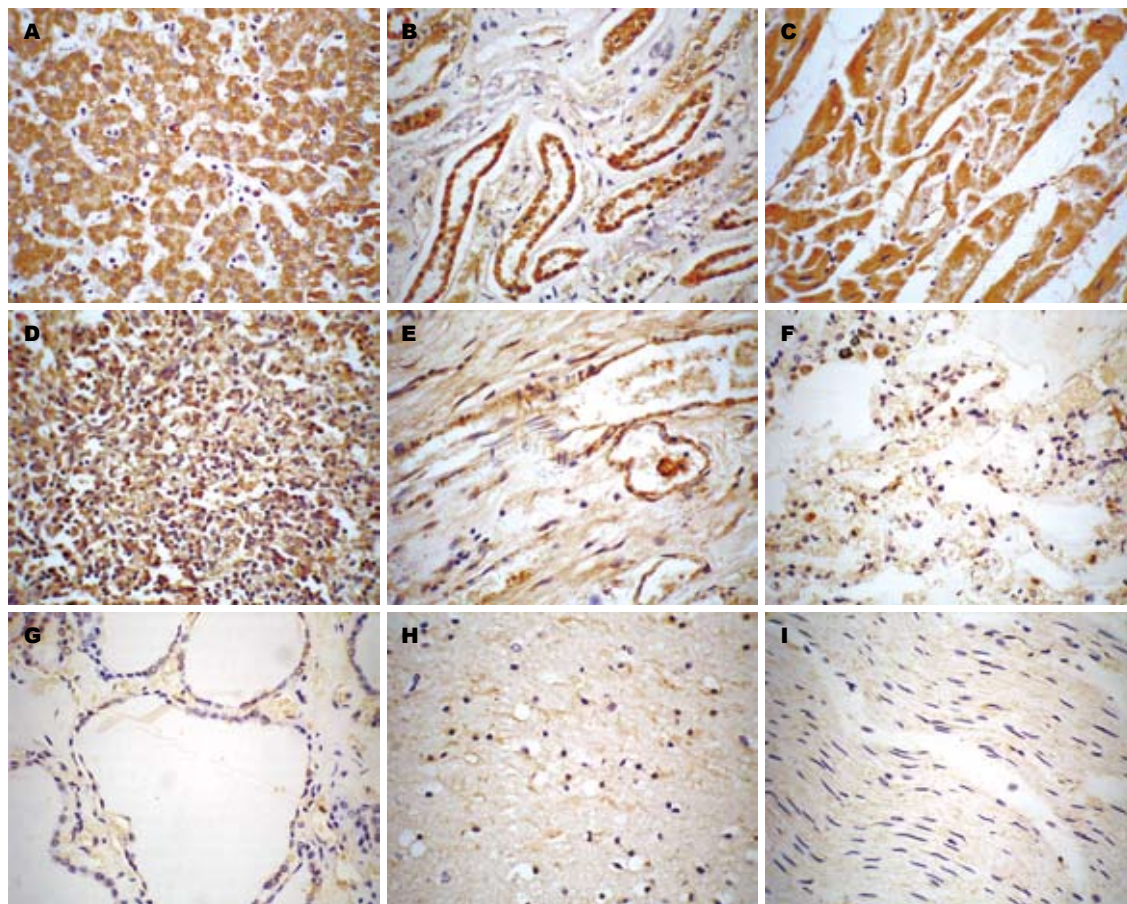


图1 HNF-4 $\alpha$ 的表达. A: 肝; B: 肾; C: 心; D: 脾; E: 肠; F: 肺; G: 甲状腺; H: 脑; I: 胃。

腺呈低水平表达; HNF-3 $\beta$ 在肝、肾、心和胰腺中呈高水平表达,在脾、肺、甲状腺和肠中呈低水平表达;此外, HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在喉和肌肉中也检测到少量表达,而二者在脑、胃、阑尾、胸腺、肾上腺、扁桃体和脂肪中均未检测到表达;由于阑尾、小脑、喉、胸腺、肾上腺、扁桃体、肌肉、脂肪的标本数相对很少(<3例),故未纳入统计学分析(图1-2)。双人盲法读片,结果进行 $\kappa$ 一致性检验,  $\kappa$ 值为0.658,说明一致性较好( $\kappa$ 值大于0.75说明一致性好,小于0.4说明一致性不够理想)。对HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在10个主要器官(肝、脑、肺、心、肠、脾、胰腺、肾、胃、甲状腺)的表达结果进行方差分析,统计结果表明, HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在上述10个器官的表达情况不同(HNF-4 $\alpha$ :  $F = 22.479$ ,  $P < 0.01$ ; HNF-3 $\beta$ :  $F = 13.021$ ,  $P < 0.01$ ),又对HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在肝脏和在其他9个器官的表达情况进行两两比较,以及比较HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在同一器官中的表达情况,统计结果显示, HNF-4 $\alpha$ 在肝脏中的表达水平与其在肾、心、脾、肠中的表达水平相近,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); HNF-

4 $\alpha$ 在肝脏中的表达水平高于其在胰腺、脑、肺、胃、甲状腺中的表达水平,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); HNF-3 $\beta$ 在肝脏中的表达水平与其在肾、心、胰腺中的表达水平相近,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); HNF-3 $\beta$ 在肝脏中的表达水平高于其在肠、脾、脑、肺、胃、甲状腺中的表达水平,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果提示, HNF-4 $\alpha$ 主要在人体的肝、肾、心、肠、脾中表达,而HNF-3 $\beta$ 则主要在肝、肾、心、胰腺中表达(表1)。HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在肝、肾、心、脑、胃和甲状腺中的表达水平相近,差别无统计学意义( $P > 0.05$ ),而在肠、肺、脾和胰腺中的表达水平不同,差别有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中HNF-4 $\alpha$ 在肠、肺、脾的表达水平较HNF-3 $\beta$ 高, HNF-3 $\beta$ 则在胰腺中的表达水平较HNF-4 $\alpha$ 高(表2)。

### 3 讨论

HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 均为LETfS家族的成员,LETfS是调节肝特异基因转录的关键作用因子,在肝脏的发育过程中发挥着重要的作用<sup>[6]</sup>。



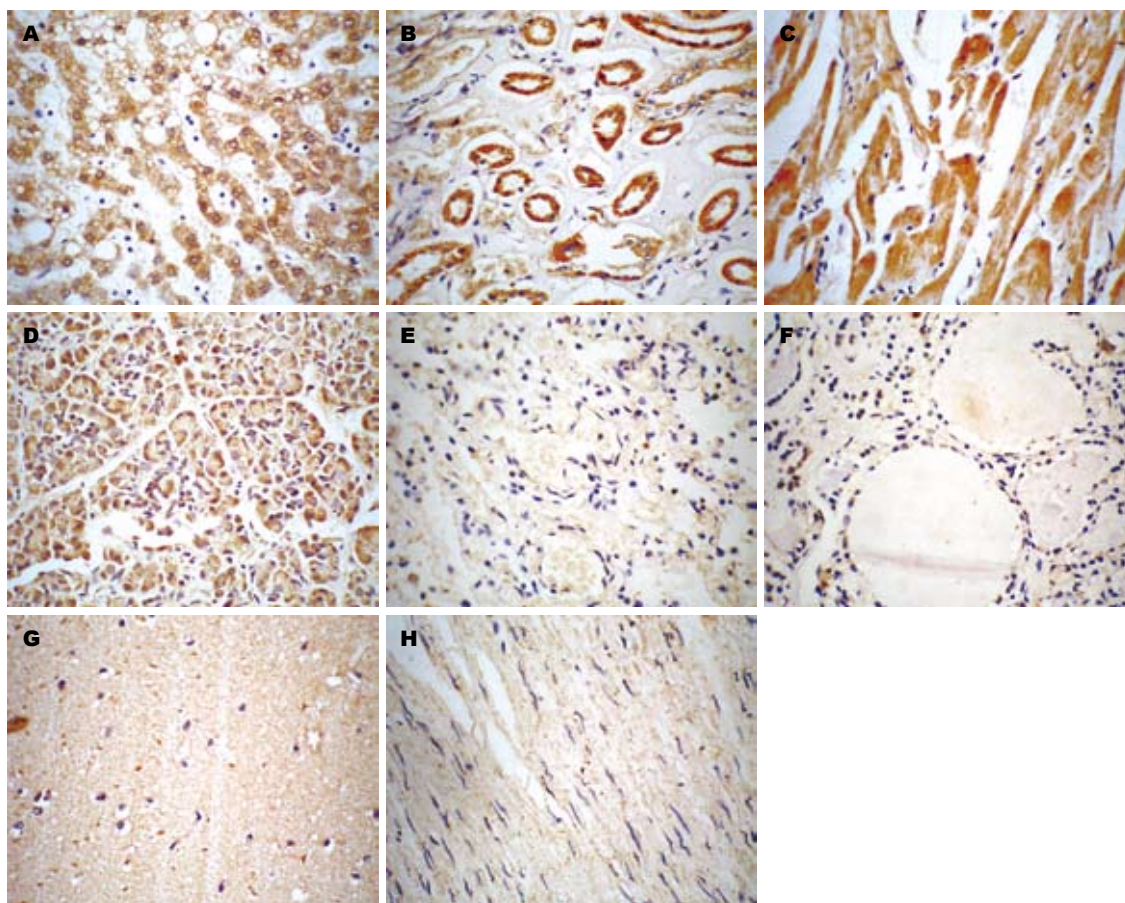


图 2 HNF-3 $\beta$ 的表达. A: 肝; B: 肾; C: 心; D: 胰腺; E: 肺; F: 甲状腺; G: 脑; H: 胃.

表 1 HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在肝和在其他器官的表达情况两两比较结果

比较	HNF-4 $\alpha$		HNF-3 $\beta$	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
肝与肾	0.3846	>0.05	0.2308	>0.05
肝与心	0.5110	>0.05	0.3516	>0.05
肝与肠	0.1538	>0.05	2.4231	<0.05
肝与脾	0.7253	>0.05	1.8516	<0.05
肝与胰腺	3.0629	<0.05	0.9231	>0.05
肝与脑	3.7692	<0.05	3.6154	<0.05
肝与肺	3.4396	<0.05	3.2802	<0.05
肝与胃	3.4872	<0.05	2.9231	<0.05
肝与甲状腺	2.1538	<0.05	2.1231	<0.05

表 2 HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在同一器官中的表达情况

器官	<i>F</i>	<i>P</i>	器官	<i>F</i>	<i>P</i>
肝	0.346	>0.05	甲状腺	0.038	>0.05
肾	0.020	>0.05	肠	12.097	<0.05
心	0.041	>0.05	肺	6.036	<0.05
脑	0.094	>0.05	脾	5.948	<0.05
胃	0.143	>0.05	胰腺	9.828	<0.05

HNF-4是孤类固醇激素核受体超家族成员之一,其特征是含有2个高度保守的区域,即位于氨基端的含2个“锌指基序”的DNA结合区和位于羧基端的配体结合区. HNF-3家族包括3个成员: HNF-3 $\alpha$ , HNF-3 $\beta$ 和HNF-3 $\gamma$ ,他们都含有1个具有翼状螺旋结构的DNA结合区<sup>[7]</sup>. 在鼠胚胎发育4.5 d, HNF-4主要在原内胚层表达,从发育5.5 d之后, HNF-4主要表达在内脏内胚层,而

HNF-3 $\beta$ , HNF-3 $\alpha$ 和HNF-3 $\gamma$ 在发育过程中是依次出现的. HNF-3 $\beta$  mRNA最先表达在原基和节点,紧接着是HNF-3 $\alpha$ 表达在内胚层,顺序形成肝、肺、胰腺和消化管的组分,而HNF-3 $\gamma$ 主要表达在消化道形成之后的内胚层<sup>[8]</sup>. 在肝脏发育早期, HNF-4即可以激活一些肝脏基因表达,如甲状腺激素结合蛋白和 $\alpha$ 1抗胰蛋白酶以及内源性的HNF-1 $\alpha$ <sup>[9]</sup>, 另外,他还可能是一种肿瘤抑制因子,在肝细胞的分化和抗增殖方面起到重要作用<sup>[10-11]</sup>, 尽管其转录活性可被HNF-1 $\alpha$ 所阻断,然而其上游调控作用目前仍不清楚,可能受一潜在的配体影响. 在鼠胚胎发育中, HNF-3对于节点和脊索轴的形成以及内胚层的分化是必

需的<sup>[12]</sup>。另外, HNF-3还与其他LETfs作用, 共同激活肝脏特异基因, 如 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶和HNF-1 $\alpha$ 等的表达<sup>[13-14]</sup>, 且其产物还可以通过自我激活来维持其自身的合成<sup>[15]</sup>。此外, HNF-3在调节代谢器官的分化方面也起到了关键作用。由于HNF-3家族在胚胎发育早期表达, 具有较强的转活能力, 因此, 他可能是参与肝脏发育过程的LETfs级联调控网络中最重要的作用因子。HNF-4和HNF-3除了参与肝脏的发育过程外, 对HBV的复制也可能具有调控作用。体外实验结果显示HNF-4 $\alpha$ 可以通过刺激前基因组RNA的合成, 从而支持HBV复制, 相反, HNF-3可以拮抗核激素受体介导的病毒复制, 这表明这些LETfs可能操纵了某些分子开关, 而这些开关限制了病毒的嗜肝性<sup>[16]</sup>。我们的实验检测了HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在人全身主要器官的分布情况, 意在为进一步探索二者与HBV的组织特异性复制之间的可能关系提供理论依据。

我们的结果显示, HNF-4 $\alpha$ 主要在肝、肾、心、脾、肠表达, 而HNF-3 $\beta$ 主要在肝、肾、胰腺、心表达。已有文献报道, HNF-4主要表达在成人的肝、肾、肠<sup>[17]</sup>, 此外, 在结肠、胰腺和睾丸中也有少量表达。我们的实验全面系统地检测了HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在人全身主要器官中的表达情况, 且进行了表达水平的比较, 同时对HNF-4 $\alpha$ 与HNF-3 $\beta$ 在同一器官中的相对表达水平也进行了比较, 结果可能更具参考价值。对于HNF-3 $\beta$ 的器官分布情况, 目前尚无详细的报道, 由于其在调节代谢器官的分化方面具有重要作用, 因此也不难解释HNF-3 $\beta$ 在肝、肾、胰腺等代谢器官的高表达状态。此外, 实验结果还显示, HNF-4 $\alpha$ 在脾、肠的表达水平较HNF-3 $\beta$ 高, 而HNF-3 $\beta$ 在胰腺的表达水平较HNF-4 $\alpha$ 高, 其可能的机制及意义还需进行深入的研究。由于本实验中每个组织芯片只作3次免疫组化染色, 故尚不能说明同一种因子在不同个体的同一器官之间的表达一致性如何, 对于此问题的探索, 还需进一步的实验研究。由于我们的实验仅对正常肝脏进行了检测, 结果提示, HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在正常肝脏中的表达水平均较高, 而已有研究表明二者对HBV复制的调控作用却是相反的, 是否二者的表达水平在生理状态下处于一种动态平衡, 而在病理状态下水平发生了改变, 即HNF-3 $\beta$ 水平下降而HNF-4 $\alpha$ 水平升高, 从而支持HBV在肝脏的复制, 这个可能理论尚需进一步的研究来验证。由于HNF-3 $\beta$ 可以激活

HNF-1 $\alpha$ , 而HNF-1 $\alpha$ 对HNF-4又具有负性调控作用, 因此, HNF-3 $\beta$ 可以间接地抑制HNF-4 $\alpha$ 的转活作用, 即HNF-3 $\beta$ 的存在可以部分的中和HNF-4 $\alpha$ 对HBV复制的支持作用, 这也对如胰腺这样的器官(HNF-3 $\beta$ 的表达较HNF-4 $\alpha$ 高)为何不会出现HBV的复制作出了可能的解释。然而, 本实验只对HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 进行了研究, 并未检测HNF-4和HNF-3的其他2个亚型HNF-4 $\beta$ , 4 $\gamma$ 以及HNF-3 $\alpha$ , 3 $\gamma$ 的表达情况, 对于这些亚型的组织分布及可能的功能以及HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 及其亚型之间的相互关系, 仍需大量的实验来加以阐明。至于为何HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 在某些器官表达有差异, 为何某些HNF-4 $\alpha$ 高表达器官(如脾、肠、肺等)却无HBV的复制, 是否其中有复杂的调控因子网络在起作用, 抑或在肝脏之外的某些器官二者亦存在拮抗作用, 其中的复杂机制, 还需要进行深入的探索和研究。

动物实验及体外细胞培养实验结果均已表明, LETfs中的HNF-4 $\alpha$ 和HNF-3 $\beta$ 都参与调节HBV的复制, 且分别具有正性和负性调控作用。但是这一结论目前尚未在人的实验中得以证实。本实验结果显示, 人体各组织中HNF-3 $\beta$ 与HNF-4 $\alpha$ 的表达水平不同, 在肝、肾等器官表达水平较高, 提示二者可能与HBV的组织特异性复制有关, 且可能参与了对病毒复制和转录的调控, 这为深入研究人体中HBV的复制机制奠定实验基础。

#### 4 参考文献

- 1 Lannoy VJ, Rodolosse A, Pierreux CE, Rousseau GG, Lemaigre FP. Transcriptional stimulation by hepatocyte nuclear factor-6. Target-specific recruitment of either CREB-binding protein (CBP) or p300/CBP-associated factor (p/CAF). *J Biol Chem* 2000; 275: 22098-22103
- 2 Tang H, Banks KE, Anderson AL, McLachlan A. Hepatitis B virus transcription and replication. *Drug News Perspect* 2001; 14: 325-334
- 3 Tang H, McLachlan A. Mechanisms of inhibition of nuclear hormone receptor-dependent hepatitis B virus replication by hepatocyte nuclear factor 3beta. *J Virol* 2002; 76: 8572-8581
- 4 Banks KE, Anderson AL, Tang H, Hughes DE, Costa RH, McLachlan A. Hepatocyte nuclear factor 3beta inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol* 2002; 76: 12974-12980
- 5 Axiotis CA, Monteagudo C, Merino MJ, LaPorte N, Neumann RD. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1991; 138: 799-806
- 6 Hayashi Y, Wang W, Ninomiya T, Nagano H, Ohta K, Itoh H. Liver enriched transcription factors and differentiation of hepatocellular carcinoma. *Mol*

- Pathol* 1999; 52: 19-24
- 7 Lai E, Prezioso VR, Smith E, Litvin O, Costa RH, Darnell JE Jr. HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* 1990; 4: 1427-1436
- 8 Monaghan AP, Kaestner KH, Grau E, Schutz G. Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development* 1993; 119: 567-578
- 9 Costa RH, Grayson DR, Darnell JE Jr. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1415-1425
- 10 Spath GF, Weiss MC. Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1913-1922
- 11 Spath GF, Weiss MC. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol* 1998; 140: 935-946
- 12 Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE Jr. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 1994; 78: 575-588
- 13 Jackson DA, Rowader KE, Stevens K, Jiang C, Milos P, Zaret KS. Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2401-2410
- 14 Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE Jr, Crabtree GR. A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 1992; 355: 457-461
- 15 Peterson RS, Clevidence DE, Ye H, Costa RH. Hepatocyte nuclear factor-3 alpha promoter regulation involves recognition by cell-specific factors, thyroid transcription factor-1, and autoactivation. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 69-82
- 16 Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1841-1846
- 17 Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE Jr. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 1990; 4: 2353-2365

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

### 第六届亚太消化疾病周 (APDW) 会议通知

本刊讯 由菲律宾胃肠病学会(PSG), 菲律宾消化内镜学会(PSDE)承办的第六届亚太消化疾病周(APDW)会议将于2006-11-26/29在菲律宾宿雾市举行, 欢迎世界各国消化疾病专业中高级医务人员踊跃投稿, 2006-09-10截稿。

#### 1 地址

Congress Secretariat, TeamAsia, Unit 308, Bldg. B., The Plaza, Northgate Cyberzone, Filinvest Corporate City, Alabang, Muntinlupa City, Metro Manila, Philippines 1770

#### 2 联系方式

电话: +63-2757-3500-330; 传真: +63-2757-3510, +63-2757-3511;

Email: secretariat.apdw2006@gmail.com; 网址: www.apdw2006.org



# 炎症性肠病肠上皮细胞基质金属蛋白激酶对NAP-2的影响

吕小平, 詹灵凌, 姜海行, 唐国都

## ■背景资料

炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD), 为非特异性肠炎。最近的研究发现IBD炎症组织的基质金属蛋白激酶(MMPs)表达增高, 但其与IBD炎症发生的确切机制仍未完全阐明。

吕小平, 姜海行, 唐国都, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

詹灵凌, 广西医科大学第一附属医院临床实验中心 广西壮族自治区南宁市 530021

吕小平, 副教授, 硕士研究生导师, 2003年英国伦敦大学访问学者, 主要从事炎症性肠病发病机制研究。

广西省自然科学基金资助项目, No. 桂科基0143059; No. 桂科攻0592007-1E

通讯作者: 吕小平, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院消化内科。lxxp58@hotmail.com  
电话: 0771-5356501

收稿日期: 2006-06-13 接受日期: 2006-06-23

## Effect of matrix metalloproteinase on the neutrophil chemokine neutrophil activating peptide-2 of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease

Xiao-Ping Lv, Ling-Ling Zhan, Hai-Xing Jiang, Guo-Du Tang

Xiao-Ping Lv, Ling-Ling Zhan, Hai-Xing Jiang, Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0143059, 0592007-1E

Correspondence to: Xiao-Ping Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lxxp58@hotmail.com

Received: 2006-06-13 Accepted: 2006-06-23

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of matrix metalloproteinases (MMPs) on the neutrophil chemokine neutrophil activating peptide-2 (NAP-2) of intestinal epithelial cells and its relationship with the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD).

**METHODS:** Caco-2 human colonic carcinoma cells and human CCD-18 colonic myofibroblast cells were incubated for 24 h at 37°C with 50 mL/L CO<sub>2</sub> before being treated with human recombinant MMP-3, IL-1β, the MMP inhibitors doxycycline, CT1399, CT1847 and monoclonal anti-human NAP-2 neutralizing antibody, respectively. The cultured cells were tested by che-

motaxis assay. PBP mRNA and MMPs mRNA in Crohn's disease and ulcerative colitis tissues and cultured cells were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of NAP-2 protein in Crohn's disease and ulcerative colitis tissues and cultured cells was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot.

**RESULTS:** Chemotaxis assays indicated that neutrophil chemoattraction of Caco-2 cells stimulated by IL-1β was significantly increased by MMP-3 ( $U = 24.60, P = 0.005; U = 37.22, P = 0.002$ ); 50 μmol doxycycline and 0.1 μmol CT1847 obviously inhibited the neutrophil chemoattractant response of Caco-2 cells ( $U = 15.18, P = 0.01; U = 34.73, P = 0.002$ ), respectively; 1 mg/L monoclonal anti-human NAP-2 neutralizing antibody significantly inhibited neutrophil chemoattraction of Caco-2 cells ( $U = 156.04, P = 0.000$ ). RT-PCR showed that MMP-1, MMP-2, MMP-3, and MMP-10 mRNA were expressed in CCD-18 cells; PBP mRNA was expressed in Caco-2 cells and intestinal mucosa of ulcerative colitis. ELISA and Western blot found that the expression of NAP-2 protein in intestinal mucosa of ulcerative colitis was significantly higher than that in intestinal of Crohn's disease ( $U = 28.57, P = 0.005$ ).

**CONCLUSION:** MMPs can activate the neutrophil chemokine NAP-2 of intestinal epithelial cells, which indicates that intestinal epithelial immune activation may require the involvement of lamina propria stromal cells.

**Key Words:** Inflammatory bowel disease; Matrix metalloproteinases; Neutrophil activating peptide-2; Platelet basic protein

Lv XP, Zhan LL, Jiang HX, Tang GD. Effect of matrix metalloproteinase on the neutrophil chemokine neutrophil activating peptide-2 of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*. 2006;14(25):2510-2515

## 摘要

**目的:** 探讨肠上皮细胞基质金属蛋白激酶(MMPs)对中性白细胞趋化因子NAP-2的影响

响及其与炎症性肠病炎症发生的关系。

**方法:** 培养Caco-2高分化人结肠癌上皮细胞和CCD-18细胞, 分别加入人重组MMP-3、IL-1 $\beta$ 、MMP抑制剂强力霉素、CT1399、CT1487和抗人NAP-2中性白细胞mAb, Caco-2和CCD-18细胞于37℃含50 mL/LCO<sub>2</sub>条件下培养24 h, 进行化学趋化性试验。取克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)的肠黏膜切除标本作实验组。用RT-PCR方法检测Caco-2细胞和CD和UC的肠黏膜组织的PBP mRNA和MMPs mRNA; 用ELISA和Western blot法分别检测Caco-2细胞和CD和UC的肠黏膜组织的NAP-2蛋白。

**结果:** MMP-3明显增加IL-1 $\beta$ 刺激的Caco-2细胞吸引外周中性白细胞的能力( $U = 24.60, P = 0.005; U = 37.22, P = 0.002$ ); 50  $\mu$ mol强力霉素和0.1  $\mu$ mol CT1847能显著抑制Caco-2细胞对中性白细胞的趋化性( $U = 15.18, P = 0.01; U = 34.73, P = 0.002$ ); 1 mg/L抗人NAP-2中性白细胞mAb能显著抑制Caco-2细胞对中性白细胞的化学趋化性( $U = 156.04, P = 0.000$ )。RT-PCR分析表明, MMP-1 mRNA, MMP-2 mRNA, MMP-3 mRNA和MMP-10 mRNA被CCD-18细胞表达; PBP mRNA被Caco-2细胞和UC患者的肠黏膜表达。ELISA和Western blot法分析表明, NAP-2蛋白在活动性UC患者的肠黏膜明显增高, 与CD的结果比较有显著性差异( $U = 28.57, P = 0.005$ )。

**结论:** MMP能激发肠上皮细胞对中性白细胞的趋化反应, MMP通过激活中性白细胞化学趋化物NAP-2产生的免疫调节机制引起炎症性肠病肠上皮细胞炎症发生。

**关键词:** 炎症性肠病; 基质金属蛋白激酶; 中性白细胞激肽-2; 血小板基础蛋白

吕小平, 詹灵凌, 姜海行, 唐国都. 炎症性肠病肠上皮细胞基质金属蛋白激酶对NAP-2的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2510-2515  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2510.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD), 为非特异性肠炎, 其病情反复迁延, 治疗困难。最近的研究发现IBD炎症组织的基质金属蛋白激酶(MMPs)表达增高, 但其与IBD炎症发生的确切机制仍未完全阐明<sup>[1]</sup>。因此, 我们研究肠上皮细胞MMPs对中性白细胞化学趋化

物NAP-2的影响及其与IBD发生的关系, 进一步探讨IBD炎症发生的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Caco-2为高分化人结肠癌上皮细胞株(由英国伦敦大学皇后玛丽医学和牙科学院消化病研究中心Ian R Sanderson教授惠赠)保存于加入100 mL/L FCS(Invitrogen, 英国)的DMEM液中。Caco-2细胞以 $3 \times 10^5$ /孔接种于聚碳酸酯培养盘中, 然后置于6孔板中, 每孔加入4 mL(膜两侧各2 mL)含有100 mL/L胎牛血清的培养基中培养18-22 d。以同样方法培养CCD-18人结肠肌纤维原细胞(CRL-1459, Manassas, 美国)。把CCD-18细胞加入Caco-2细胞, 然后分别加入0.5-50 nmol/L人重组MMP-3(San Diego, 美国)、1 mg/L人重组IL-1 $\beta$ (R&D, Systems, 英国)、MMP抑制剂50  $\mu$ mol/L强力霉素、1  $\mu$ mol/L CT1399、0.1  $\mu$ mol/L CT1847和1 mg/L抗人NAP-2中性白细胞mAb(R&D Systems, 英国), Caco-2细胞和CCD-18细胞于37℃含50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内培养24 h。19例CD和20例UC患者的肠黏膜切除标本作实验组, 对照组为18例结肠癌的正常肠黏膜标本。其中CD 9例、UC 10例和对照组9例的肠黏膜切除标本按Flint *et al*<sup>[2]</sup>报道的方法分离肠上皮细胞, 其余标本立即放入液氮灌中, 然后再放入-70℃的冰箱中保存备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 化学趋化性试验** 在96孔化学趋化性试验板中加入上述各种细胞培养悬液, 盖上每孔5  $\mu$ m大小的滤膜。分别加入通过梯度离心方法从健康人外周血中分离出 $5 \times 10^8$ /L中性分叶核细胞和单核细胞, 放入50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱内于37℃温度培养1 h, 用显微镜计数通过滤膜的细胞, 计算出化学趋化反应指数。

**1.2.2 RT-PCR检测PBP, MMPs mRNA表达** 采用NCBI BLAST软件设计, 所有引物购自Invitrogen公司, 引物序列如下: PBP: F5'-TCACCCCTCACTCAGAGGTCTT-3', R5'-AGTGGGTTGAAACCAGGCTTA-3', 片段长度为666 bp; MMP-1: F5'-ATGCACAGCTTTCCTC CACT-3', R5'-CAGGGTTTCAGCATCTGGTT-3', 片段长度252 bp; MMP-2: F5'-CACTTTCCTGGG CAACAAAT-3', R5'-GGACAGACGGAAGTTCT TGG-3', 片段长度244 bp; MMP-3: F5'-AATCAA TTCTGGGCCATCAG-3', R5'-AGTGCCCATATT GTGCCTTC-3', 片段长度395 bp; MMP-8:

## ■创新盘点

IBD炎症免疫反应机制是目前研究的热点。本文研究了MMPs对中性白细胞化学趋化物NAP-2的影响, 提出了由MMPs活动介导的IBD肠黏膜上皮细胞发生炎症的新模式, 提示免疫反应需要有肠黏膜固有层间质细胞的参与。

## ■同行评价

本文探讨了炎症性肠病发生过程中肠上皮细胞基质金属蛋白激酶对中性白细胞趋化趋化物NAP-2的影响,提出了由基质金属蛋白激酶活动介导的炎症性肠病的肠粘膜上皮细胞发生炎症的新模式,提示免疫反应需要有肠粘膜固有层间质细胞的参与,对进一步了解溃疡性结肠炎的发生机制有较重要的意义。文章的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国胃肠病学基础研究的先进水平。

F5'-CTGCAAGGTTATCCCAAGGA-3', R5'-TTGGTCCACTGAAGACATGG-3', 片段长度250 bp; MMP-9: F5'-TTCATCTTCCAAGGCCAATC-3', R5'-TGTCGCTGTCAAAGTTCGAG-3', 片段长度2747 bp; MMP-10: F5'-GCAGCGGACAAATACTGGAG-3', R5'-CCCTATCTCGCCTAGCAATG-3', 片段长度230 bp; MMP-12: F5'-GCTGTCACTACCGTGGGAAA-3', R5'-TTGGGATAATTTGGCTCTGG-3', 片段长度230 bp;  $\beta$ -actin: F5'-GATGCAGAAGGAGATCACTG-3', R5'-TAGTCCGCCTAGAAGCATTG-3', 片段长度201 bp。用TRIzol(Invitrogen 英国)从上述各组培养细胞和各组标本组织匀浆中提取总RNA,测 $A_{260nm}/A_{280nm}$ 值,计算RNA浓度。取RNA 2  $\mu$ g加入随机引物及M-MLV逆转录酶合成cDNA。再用逆转录反应液2  $\mu$ L作为模板,加入引物和Taq酶后用PCR仪扩增,循环步骤如下:变性94 $^{\circ}$ C 30 s,退火55 $^{\circ}$ C 30 s,延伸45 s,共32个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min终止反应。以 $\beta$ -actin作为内参照。扩增引物用15 g/L的琼脂凝胶电泳,紫外线自动凝胶成像系统照相。

1.2.3 Western blotting检测NAP-2蛋白 收集上述各组的病理标本,加入溶解缓冲液(25 mmol/L TBS, pH 7.5, 加入0.1 mmol/L EDTA, 5 g/L deoxycholate, 10 g/L IPEGAL, 1 g/L SDS),并把组织制成匀浆,在4 $^{\circ}$ C温度下以10 000  $g$ 离心15 min,用BCA法(试剂购自Sigma公司)测定上清液的NAP-2蛋白质含量。再取20  $\mu$ g加到Nupage 120 g/L Bis-Tris凝胶中(Invitrogen, 英国),加入移动缓冲液,通过电泳作用,把蛋白转移到PVDF膜上(Millipore, 英国),取出膜加入10 g/L牛奶TBS(含0.1 g/L Tween),在4 $^{\circ}$ C下固定3 h,然后加入200 mg/L多抗山羊抗人NAP-2抗体(R&D systems, 英国)孵育1晚,用包含0.1 g/L Tween的TBS反复洗膜,用2.5  $\mu$ g/L过氧化酶兔抗山羊抗体(Glostrup, 丹麦)在4 $^{\circ}$ C下孵育1 h,杂交带被高敏感化学发光系统显像。

1.2.4 ELISA检测NAP-2 按药盒说明书操作,试剂购自R&D Systems公司(英国),操作完毕后,测样品及标准品450 nm吸光度( $A$ 值),以标准品 $A$ 值做出标准曲线,根据标准曲线计算出上述各组培养细胞和各组病理标本组织匀浆上清液的样品值。

**统计学处理** 所有结果用平均数 $\pm$ 标准值表示,采用SPSS 10.0软件进行数据分析,对相关资料进行 $U$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MMPs诱导肠上皮细胞对中性白细胞的趋化反应 Caco-2细胞对中性白细胞和单核细胞趋化反应试验,加入不同浓度的MMP-3,前者在有和缺乏IL-1 $\beta$ 刺激情况下,二者表现显著性差异( $19.5\pm4.1$ ,  $8.3\pm2.2$ ,  $U=24.60$ ,  $P=0.005<0.05$ ;  $32.5\pm4.4$ ,  $9.6\pm4.2$ ,  $U=37.22$ ,  $P=0.002<0.05$ );而对单核细胞却无此现象。Caco-2细胞和CCD-18细胞共同培养,在有IL-1 $\beta$ 或加入IL-1 $\beta$ 后,再加入MMP抑制剂强力霉素、CT1847和CT1399, Caco-2细胞对中性白细胞趋化试验表明,二者表现显著性差异( $17.5\pm7.5$ ,  $5.5\pm2.5$ ,  $U=15.18$ ,  $P=0.01<0.05$ ;  $22.5\pm5.0$ ,  $3.8\pm2.0$ ,  $U=34.73$ ,  $P=0.002<0.05$ )。Caco-2细胞在有和缺乏IL-1 $\beta$ 刺激的CCD-18细胞的共同培养液中分别作中性白细胞趋化试验。用RT-PCR分析在有和缺乏IL-1 $\beta$ 处理的Caco-2和CCD-18细胞共同培养液中的各种MMPs mRNA的表达,结果表明,在有IL-1 $\beta$ 存在的条件下MMP-1 mRNA, MMP-2 mRNA, MMP-3 mRNA和MMP-10 mRNA在CCD-18细胞中表达阳性(图1)。

2.2 NAP-2介导的依靠MMP的Caco-2的化学趋化性反应 血小板基础蛋白(platelet basic protein, PBP), CTAP-III(connective tissue-activating peptide-III),  $\beta$ -血栓球蛋白( $\beta$ -thromboglobulin,  $\beta$ -TG)及NAP-2的氨基酸序列(图2),箭头所指的是他们的断裂位点。Caco-2细胞和CCD-18细胞的共同培养液缺乏IL-1 $\beta$ 或加入IL-1 $\beta$ ,再加入抗人NAP-2中性白细胞mAb的条件下对中性白细胞趋化反应,二者有显著性差异( $43.2\pm2.6$ ,  $14.9\pm2.2$ ,  $U=156.04$ ,  $P=0.000<0.05$ )。RT-PCR分析PBP mRNA表达,结果表明, PBP mRNA在有IL-1 $\beta$ 刺激的Caco-2细胞中有阳性表达。用ELISA性检测Caco-2和CCD-18细胞培养液在有或缺乏IL-1 $\beta$ 条件下的NAP-2蛋白,结果表明,在有IL-1 $\beta$ 刺激的Caco-2细胞中的NAP-2比CCD-18的明显增高,二者相比有显著性差异( $26.5\pm3.3$  ng/L,  $3.4\pm0.8$  ng/L,  $U=68.32$ ,  $P=0.001<0.05$ )。肠上皮细胞MMP介导的通过PBP和NAP-2的炎症反应的模型见图2E。

2.3 PBD/NAP-2 mRNA和蛋白在肠炎炎症性黏膜的表达 RT-PCR分析CD和UC的PBP mRNA在孤立上皮细胞(isolated epithelial cells, IEC)和整层黏膜切除标本的表达,结果表明, PBP mRNA在UC肠黏膜IEC的表面及隐窝(crypt)和活动性的UC整层肠黏膜均阳性表达。Western blotting测

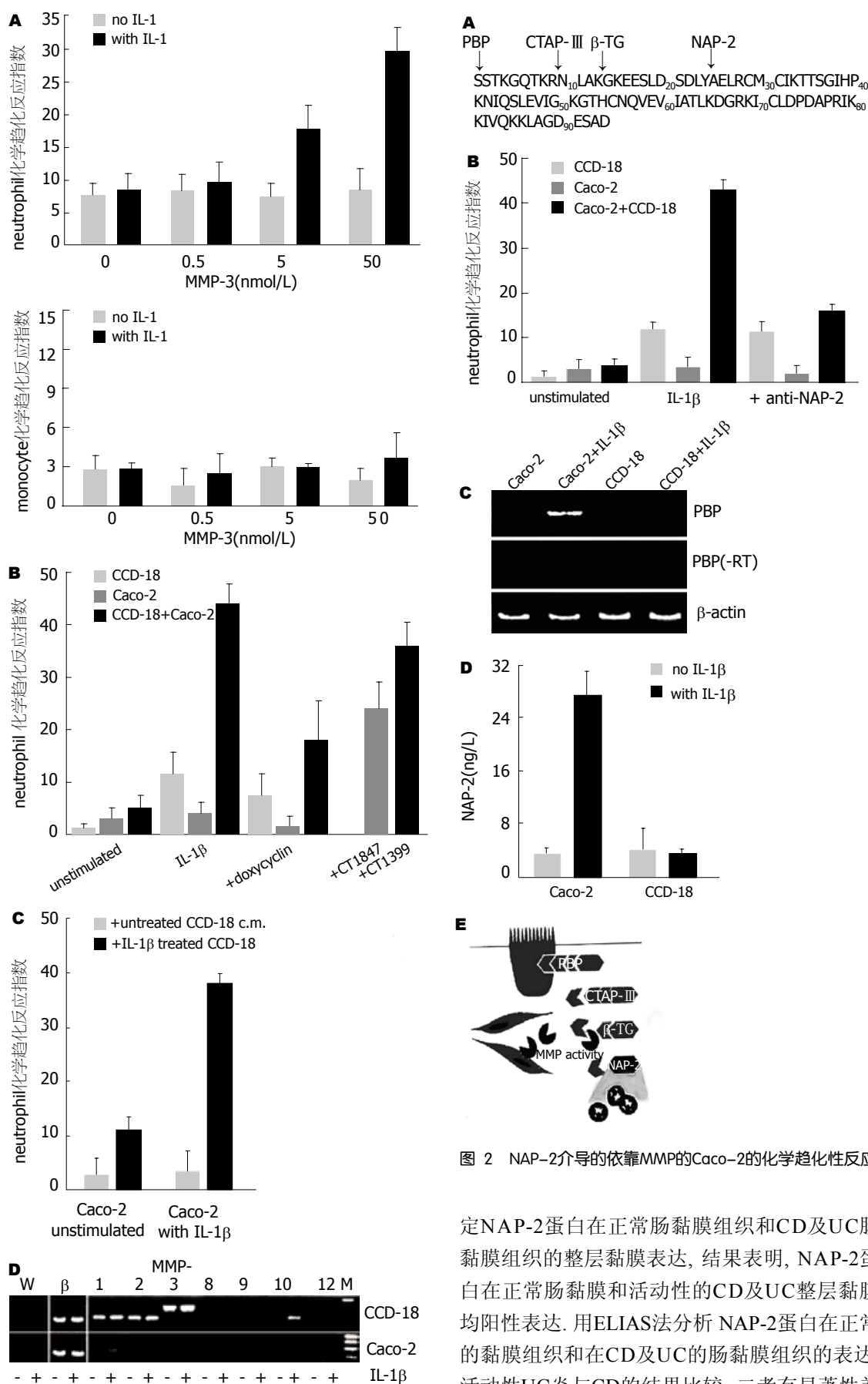


图 2 NAP-2介导的依靠MMP的Caco-2的化学趋化性反应.

定NAP-2蛋白在正常肠黏膜组织和CD及UC肠黏膜组织的整层黏膜表达, 结果表明, NAP-2蛋白在正常肠黏膜和活动性的CD及UC整层黏膜均阳性表达. 用ELIAS法分析 NAP-2蛋白在正常的黏膜组织和在CD及UC的肠黏膜组织的表达, 活动性UC炎与CD的结果比较, 二者有显著性差异( $7.6 \pm 1.3$  ng/G,  $3.6 \pm 0.52$  ng/G,  $U = 28.57$ ,  $P = 0.002 < 0.05$ , 图3).

图 1 MMPs诱导肠上皮细胞对中性白细胞的趋化反应. β-actin; W: water; M: marker 100 bp.



### 3 讨论

MMPs主要来源于发生炎症的肠黏膜间质细胞,他和肠黏膜的炎症损害及组织再生密切相关<sup>[3-4]</sup>. 人结肠癌Caco-2肠上皮细胞加入MMP-3, 分别在有和缺乏IL-1 $\beta$ 的条件下培养24 h后, 进行的趋化性试验, 结果示MMP-3明显增加IL-1 $\beta$ 刺激的Caco-2细胞吸引外周中性白细胞的能力, 但对单核细胞无任何影响. 据报道, IL-1 $\beta$ 不能直接诱导Caco-2细胞的化学趋化性, 可能由于不同的细胞的基因转录抑制有关<sup>[5]</sup>. 肠黏膜的MMPs主要在间质细胞的胞浆被激活<sup>[6-7]</sup>. Caco-2细胞和CCD-18人结肠肌纤维原细胞共同培养24 h后的化学趋化性试验, 在IL-1 $\beta$ 存在的情况下, Caco-2细胞显著提高对中性白细胞的吸引能力. 为了进一步证实这种变化是否由于MMPs的介导, 在上述培养基中加入广谱的MMP抑制剂强力霉素、CT1847、MMP-2和MMP-8的抑制剂CT1399<sup>[4]</sup>, 50  $\mu$ mol/L强力霉素和0.1  $\mu$ mol/L CT1847能显著抑制Caco-2细胞对中性白细胞的趋化性. 当用IL-1 $\beta$ 刺激CCD-18细胞和Caco-2细胞, 化学趋化性结果与上述的相似. RT-PCR实验表明, 在有IL-1 $\beta$ 存在的条件下MMP-1 mRNA, MMP-2 mRNA, MMP-3 mRNA和MMP-10 mRNA被CCD-18细胞表达. 这表明此化学趋化性现象是由MMPs诱导的, 对肠黏膜炎症起上调作用<sup>[3-8]</sup>.

肠黏膜上皮细胞的肌纤维原细胞MMPs能诱导某些蛋白转变成对中性白细胞有潜在趋化作用的活性蛋白. 我们找到一些对中性白细胞有趋化性的物质, NAP-2(CXCL-7, 是具有高度潜在趋化性ELRCXC家族中的一种)、IL-8、某些致癌基因、巨噬细胞炎症蛋白-2(macrophage inflammatory protein-2, MIP-2)和上皮细胞性中性白细胞趋化物-78(epithelial cell-derived neutrophil attractant-78, ENA-78)<sup>[9]</sup>. NAP-2是唯一一种已知的具有对中性白细胞潜在趋化性PBP<sup>[10]</sup>, PBP(94 aa, 10.3 kDa)来源于人类血小板 $\alpha$ -颗粒. PBP在NH<sub>2</sub>端紧靠CTAP-III,  $\beta$ -TG和NAP-2, 在这些物质中, 只有NAP-2具有化学趋化性. 在IL-1 $\beta$ 刺激的条件于Caco-2细胞和CCD-18细胞共同培养基中加入1 mg/L抗人NAP-2中性白细胞mAb, 结果显示化学趋化性几乎全部抑制, 这表明NAP-2是一种重要的诱导Caco细胞对中性白细胞趋化性物质. 实际上, PBP mRNA和PBP/NAP-2存在于有IL-1 $\beta$ 刺激的Caco-2细胞中, 但不存在于缺乏IL-1 $\beta$ 刺激的

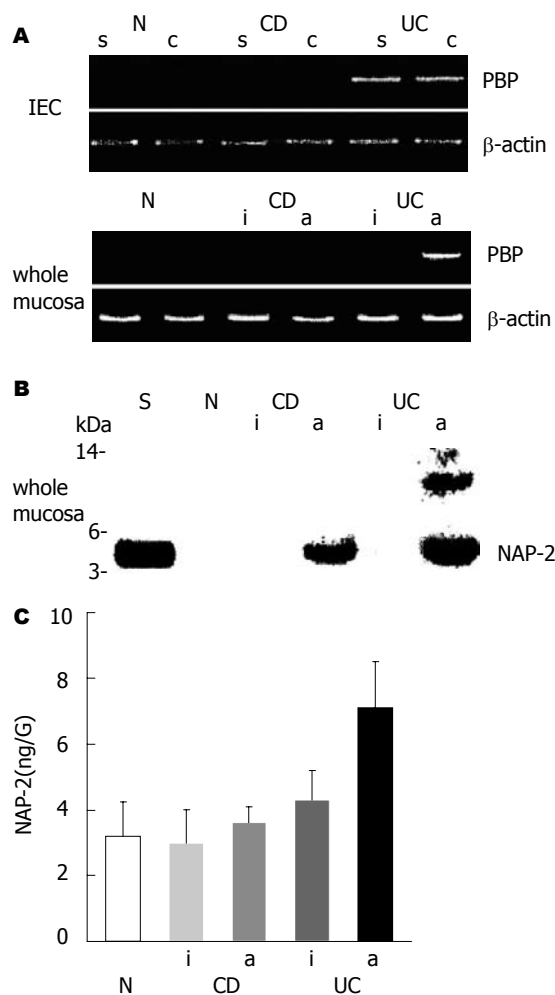


图3 PBP/NAP-2 mRNA和蛋白在肠炎症性黏膜的表达. a: active; i: inactive; s: surface; S: NAP-2标准; N: 正常黏膜(对照组); c: 隐窝细胞.

Caco-2或CCD-18细胞中, 在18例的正常结肠黏膜组织有2例(1例是整层黏膜切除组织, 另1例是从黏膜切除组织中分离的上皮细胞)和19例CD的4例黏膜组织(整层黏膜切除组织)分别检测出低水平的PBP mRNA. 20例UC的黏膜组织有16例(10例是整层黏膜切除组织, 6例是从黏膜切除组织中分离的上皮细胞)检测出高水平的PBP mRNA. 活动性UC的整层黏膜组织NAP-2比同组的CD高出约2倍. 据报道, 化学趋化物质作为MMPs的主要目标<sup>[11-12]</sup>. 基于我们的研究, 我们提出了一个由MMP活动介导的IBD的肠黏膜上皮细胞发生炎症的新模式. 对于损害或免疫反应的刺激, 肠黏膜上皮细胞合成和分泌PBP, PBP可能有抵抗病原微生物的功能<sup>[13]</sup>, 但他并不影响白细胞运动功能<sup>[14]</sup>. 黏膜下层的肌纤维原细胞释放有活性的MMP, 将分解上皮细胞的PBP变成有化学趋化活性的NAP-2, 增加对中性白细胞的趋化性, 从而造成肠道上皮的炎症损害. 这种炎症

发生机制可能支持UC发生时中性白细胞聚集、PBP/NAP-2明显增加. 因此, 我们推断这可能是肠道的一种免疫调节机制, 因为中性白细胞在肠黏膜上皮层的聚集和活动不仅需要来自上皮细胞的信号, 而且可能还依靠来自黏膜固有层的信号.

#### 4 参考文献

- 1 缪应雷, 欧阳钦, 段丽平, 李晓燕. 金属蛋白激酶抑制剂对大鼠结肠炎的作用研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 50-51
- 2 Flint N, Cove FL, Evans GS. A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis. *Biochem J* 1991; 280 (Pt 2): 331-334
- 3 Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 814-822
- 4 Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 1997; 158: 1582-1590
- 5 Wen X, Wu GD. Evidence for epigenetic mechanisms that silence both basal and immune-stimulated transcription of the IL-8 gene. *J Immunol* 2001; 166: 7290-7299
- 6 McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 2003; 162: 1355-1360
- 7 Pender SL, Quinn JJ, Sanderson IR, MacDonald TT. Butyrate upregulates stromelysin-1 production by intestinal mesenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G918-924
- 8 Salmela MT, MacDonald TT, Black D, Irvine B, Zhuma T, Saarialho-Kere U, Pender SL. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and *in situ* hybridisation. *Gut* 2002; 51: 540-547
- 9 Dwinell MB, Johanesen PA, Smith JM. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. *Surgery* 2003; 133: 601-607
- 10 Brandt E, Petersen F, Ludwig A, Ehlert JE, Bock L, Flad HD. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 471-478
- 11 McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 2000; 289: 1202-1206
- 12 Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000; 96: 2673-2681
- 13 Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002; 70: 6524-6533
- 14 Fusunyan RD, Quinn JJ, Fujimoto M, MacDermott RP, Sanderson IR. Butyrate switches the pattern of chemokine secretion by intestinal epithelial cells through histone acetylation. *Mol Med* 1999; 5: 631-640

电编 张焕兰 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

### 世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (世界胃肠病学杂志社2006-09-08)

# SKP2在大肠癌组织中的表达及预后意义

孙立春, 隋广杰, 刘亚琴

## ■背景资料

发现和寻找大肠癌新的预后标志物和治疗靶点是提高大肠癌疗效的策略之一。SKP2在多种恶性肿瘤中高表达且与许多恶性肿瘤预后差相关。

孙立春, 隋广杰, 刘亚琴, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内四科 黑龙江省哈尔滨市 150040

孙立春, 2005年哈尔滨医科大学肿瘤学博士毕业, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内四科主治医师, 主要从事肿瘤化疗和基因治疗的研究。

哈尔滨市科技攻关资助项目, No. 2004AA9CS196-10

通讯作者: 孙立春, 150040, 黑龙江省哈尔滨市哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内四科. sunlichun114@163.com  
电话: 0451-86822727

收稿日期: 2006-06-29 接受日期: 2006-07-19

## Expression and prognostic significance of S-phase kinass-associated protein 2 in colorectal carcinoma tissues

Li-Chun Sun, Guang-Jie Sui, Ya-Qin Liu

Li-Chun Sun, Guang-Jie Sui, Ya-Qin Liu, the Forth Department of Internal Medicine, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Supported by the Key Science Research Project of Harbin Municipality, No. 2004AA9CS196-10

Correspondence to: Li-Chun Sun, the Forth Department of Internal Medicine, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, 150 Haping Road, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. sunlichun114@163.com

Received: 2006-06-29 Accepted: 2006-07-19

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of S-phase kinase associated protein 2 (SKP2) and assess its prognostic value in human colorectal carcinoma.

**METHODS:** SP immunohistochemical method was used to detect the expression of SKP2 P27 proteins in the tissues of colorectal carcinoma ( $n = 68$ ). Survival analyses were performed using the Kaplan-Meier method and Cox regression model.

**RESULTS:** Of 68 cases with colorectal carcinoma, the positive rates of SKP2 and P27 expression were 41.2% ( $n = 28$ ) and 52.9% ( $n = 36$ ). The expression of SKP2 was significantly correlated with the differentiation of carcinoma ( $\chi^2 = 14.073$ ,  $P = 0.001$ ), but it had no significant correlation with tumor AJCC staging, the gender and ages of patients ( $P > 0.05$ ). There was a negative

correlation between SKP2 and P27 expression ( $r = -0.528$ ,  $P = 0.0001$ ). With regard to prognosis, the overall survival rate for patients with the high-SKP2 expression was significantly lower as compared with that for the ones with low-SKP2 expression ( $31.5 \pm 4.0$  mo *vs*  $54.5 \pm 2.1$  mo,  $P < 0.01$ ). Furthermore, the expression of SKP2 was an independent predictor of prognosis by multivariate Cox regression model analysis ( $RR = 6.227$ ,  $P = 0.033$ ).

**CONCLUSION:** SKP2 expression can serve as a useful prognostic marker in colorectal carcinoma patients.

**Key Words:** S-phase kinass-associated protein 2; Colorectal carcinoma; Prognosis

Sun LC, Sui GJ, Liu YQ. Expression and prognostic significance of S-phase kinase associated protein 2 in colorectal carcinomas tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2516-2520

## 摘要

**目的:** 探讨SKP2在大肠癌中的表达和预后作用。

**方法:** 采用SP免疫组化法检测68例大肠癌手术切除组织标本中SKP2和P27的表达, 用Kaplan-Meier和Cox回归分析法进行生存分析。

**结果:** 在68例大肠癌组织中, SKP2和P27的阳性表达率分别为41.2% ( $n = 28$ )和52.9% ( $n = 36$ )。SKP2的表达与组织分级显著相关( $\chi^2 = 14.073$ ,  $P = 0.001$ )。SKP2表达与年龄、性别和AJCC分期无关( $P > 0.05$ )。SKP2和P27负相关( $r = -0.528$ ,  $P = 0.0001$ )。SKP2高表达组的总生存期较SKP2低表达组短( $31.5 \pm 4.0$  mo *vs*  $54.5 \pm 2.1$  mo,  $P < 0.01$ )。多因素Cox回归分析表明, SKP2表达是大肠癌的独立预后因素( $RR = 6.227$ ,  $P = 0.033$ )。

**结论:** SKP2表达可以作为大肠癌患者预后的指标。

**关键词:** S期激酶相关蛋白2; 大肠癌; 预后



孙立春, 隋广杰, 刘亚琴. SKP2在大肠癌组织中的表达及预后意义. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2516-2520  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2516.asp>

## 0 引言

细胞周期调节异常是恶性肿瘤形成的机制之一. P27是真核细胞的细胞周期抑制蛋白, 抑制细胞周期 $G_1$ -S的进展<sup>[1-2]</sup>. P27功能的缺失使细胞周期进展, 细胞恶性转化. 在许多恶性肿瘤组织中其表达减少, 如: 肺癌<sup>[3]</sup>、乳腺癌<sup>[4]</sup>、大肠癌<sup>[5]</sup>、垂体瘤<sup>[6]</sup>、淋巴瘤<sup>[7]</sup>、神经胶质瘤<sup>[8]</sup>等, 且与预后差相关. P27蛋白表达减少是由于依赖泛素的蛋白分解增加. SKP2是泛素连接酶中F-Box蛋白的一种, 能特异识别P27, 将之分解<sup>[9-11]</sup>. SKP2在多种恶性肿瘤中高表达且与许多恶性肿瘤预后差相关<sup>[12-15]</sup>. 最近发现, SKP2在大肠癌中高表达, 但其预测预后作用尚不清楚. 我们通过对SKP2表达水平的检测, 分析其与临床病理学特征间的关系, 探讨SKP2在大肠癌发生、发展过程中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院2000-10/2003-06新鲜手术原发大肠癌患者标本68例, 所有标本经病理证实, 术前未治疗. 男35例, 女33例, 平均年龄( $52.6 \pm 9.7$ )岁. 随访5-60(中位33.5) mo, 其中24位患者死于大肠癌. 标本经40 g/L甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片, 切片厚4  $\mu$ m. HE染色复述病理组织学特征, 其他切片行SP免疫组化染色. 鼠抗人SKP2和P27 mAb购自Santa Cruz, 鼠SP试剂盒及DAB-HCL显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司.

**1.2 方法** SKP2和P27表达染色均为常规SP免疫组化法, 具体步骤按试剂说明书进行. 染色结果判断标准: 400倍显微镜下每张切片计数5个视野, 每个视野100个肿瘤细胞, 取阳性细胞数百分比的平均值. SKP2阳性细胞为棕黄色颗粒, 主要位于细胞核或细胞核伴细胞质内. 以每张切片阳性细胞数超过20%为高表达. P27阳性反应产物主要位于细胞核, 阳性判断标准为该位置出现了明确的棕黄色颗粒, 小于50%为低表达, 大于50%为高表达. 以北京中杉金桥生物公司提供的阳性切片作为阳性对照, 以0.01 mol/L PBS液(pH 7.4)替代一抗作为阴性对照.

**统计学处理** 应用SPSS 10.0统计软件. SKP2和P27与临床因素比较用 $\chi^2$ 检验或 $t$ 检验. 用Kaplan-Meier和COX回归分析法进行生存分析.

## ■ 相关报道

SKP2在大肠癌中高表达, 与P27负相关. Shapira *et al*报道过度表达SKP2与大肠癌预后差显著相关, SKP2可能是大肠癌总生存的预后标志物.

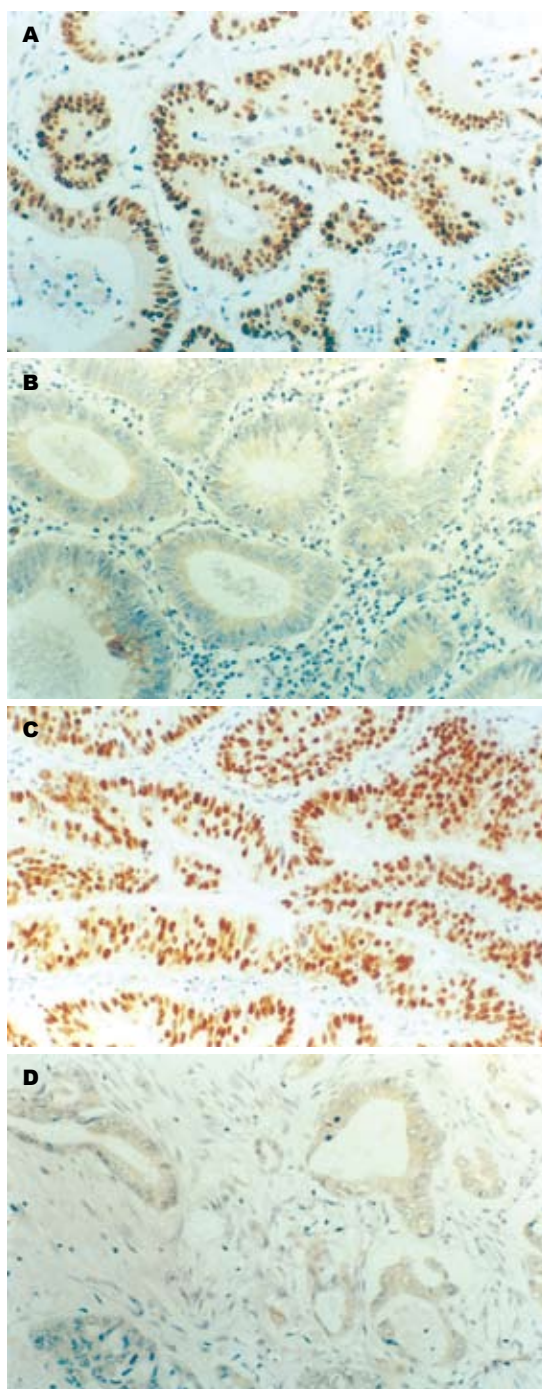


图1 大肠癌组织SKP2, P27的表达(SP  $\times$  100). A: SKP2高表达; B: SKP2低表达; C: P27高表达; D: P27低表达.

生存率比较采用Log rank检验.  $P < 0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 SKP2和P27表达及与临床病理学特征的关系** 随机选择5个高倍视野, 计数100个肿瘤细胞, 计算阳性细胞百分率. SKP2阳性染色呈棕黄色, 主要位于细胞核或细胞核伴细胞质内. SKP2阳性细胞数 $< 5\%$ 为(-),  $5\% - 20\%$ 为(+),  $> 20\%$ 为(++).



## ■创新亮点

本文采用SP免疫组化法探讨SKP2在大肠癌中的表达和预后作用,首次在国内报道SKP2与大肠癌预后相关性。

表 1 SKP2和P27表达与大肠癌临床病理特征的关系

临床病理	SKP2		P27	
	低表达( <i>n</i> = 40)	高表达( <i>n</i> = 28)	低表达( <i>n</i> = 32)	高表达( <i>n</i> = 36)
年龄(岁)	52.2 ± 1.5	53.2 ± 2.0	54.4 ± 1.5	51.0 ± 1.7
性别 男	22	13	14	21
女	18	15	18	15
AJCC分期 II	24	12	12	24 <sup>a</sup>
III + IV	16	16	20	12
组织分化 高	17	3	3	17
中	18	11	15	14
低未	5	14 <sup>b</sup>	14	5 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01.

分析中将(-)、(+)归为低表达组, (++)归为高表达组(图1A-B). 在68例大肠癌中, SKP2和P27的阳性表达率分别为41.2% (*n* = 28), 52.9% (*n* = 36). SKP2高表达与年龄、性别和AJCC分期无关(*P* > 0.05); 与组织分级显著相关(*P* < 0.05, 表1). P27蛋白阳性染色呈棕黄色, 定位于细胞核(图1C-D). P27阳性细胞数 < 10%为(-), 10%-50%为(+), > 50%为(++). 将(-)、(+)归为低表达组, (++)归为高表达组. P27高表达与年龄、性别无关(*P* > 0.05); 与AJCC分期、组织分级显著相关(*P* < 0.05, 表1).

2.2 SKP2与P27蛋白表达相关性 SKP2蛋白表达与P27蛋白表达呈负相关(*r* = -0.528, *P* < 0.05, 表2).

2.3 SKP2与大肠癌患者生存期相关性 为了确定SKP2表达与大肠癌患者预后的关系, 我们绘制了Kaplan-Meier生存曲线(图2). 在60 mo随访期内, SKP2高表达组平均生存时间显著低于SKP2低表达组, 分别为31.5 ± 4.0 mo和54.5 ± 2.1 mo (*P* < 0.001). 单因素COX回归分析示: SKP2高表达、癌组织分化差、临床分期高与生存期短显著相关(*P* < 0.001). 将SKP2表达、分期、肿瘤分化、P27、年龄、性别经多因素COX回归分析(表3)发现, SKP2高表达、临床分期高、癌组织分化差显著增加患者的死亡风险(*P* < 0.05, *P* < 0.05, *P* < 0.01). SKP2表达是大肠癌的独立预后因素。

### 3 讨论

我们的研究发现SKP2蛋白在41.2%的手术切除的大肠癌组织中高表达. SKP2高表达与组织分化差显著相关, 表明其与大肠癌高侵袭性有关. SKP2对正常或异常细胞进入S相是必需的, 所以在正常细胞中SKP2少量表达. SKP2在许

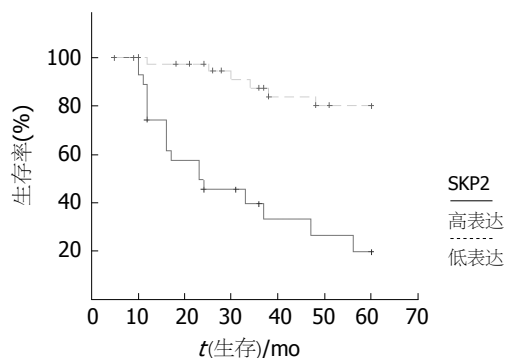


图 2 大肠癌患者生存曲线与SKP2表达。

表 2 SKP2蛋白表达与P27蛋白表达相关性

P27表达	SKP2表达		<i>r</i>	<i>P</i>
	高	低		
高	10	22	-0.528	0.0001
低	30	6		

多恶性肿瘤中高表达, 其表达水平及活性与肿瘤的发生、发展及生物学性状均有关<sup>[12-16]</sup>. 目前认为SKP2蛋白在转录和转录后水平调节<sup>[17]</sup>. SKP2在肿瘤中过度表达的机制尚不清楚. APC/C<sup>Cdh1</sup> (anaphase promoting complex/cyclosome in complex with its activator Cdh1) 泛素连接酶分解G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期SKP2<sup>[17-18]</sup>. 在某些癌组织中, SKP2的过度表达由于基因的扩增, Cdh1失活或表达减少, 可能提高SKP2蛋白水平. APC/C<sup>Cdh1</sup>复合体的其他成分的改变也可能导致SKP2的稳定. 在结肠癌细胞, APC/C的2个主要功能亚基, Apc6/Cdc16和Apc8/Cdc23变异失去活性<sup>[19]</sup>. 此外, SKP2可能包含阻碍SKP2和APC/C<sup>Cdh1</sup>物理作用的变异, 这些变异可能主要影响N末端的D Box或Cdh1结合位点, 使SKP2抗拒APC/C<sup>Cdh1</sup>的泛素化。

表 3 影响预后多因素COX回归分析

变量	<i>r</i>	SEM	Wald	<i>P</i>	RR	OR值95%可信限	
						下限	上限
SKP2	1.829	0.859	4.535	0.033	6.227	1.157	33.519
分期	1.754	0.784	5.002	0.025	5.776	1.242	26.856
组织分级	3.234	0.801	16.298	0.000	25.388	5.281	122.059
P27	0.085	0.721	0.014	0.907	1.088	0.265	4.473
年龄	0.041	0.029	2.009	0.156	1.042	0.984	1.102
性别	0.429	0.475	0.815	0.367	1.535	0.605	3.896

## ■名词解释

泛素蛋白酶体途径: 细胞内特异降解蛋白质的途径. 通过连续地将激活的泛素连接至与底物蛋白结合的泛素上, 形成多聚泛素链. 26S蛋白酶复合体识别多聚泛素链标记的蛋白, 将之降解为多肽, 释放出的泛素被重新利用.

SKP2是Skp1-Cullin-F-Box (SCF复合体)E<sub>3</sub>连接酶中的一种F-Box蛋白, 他特异识别P27蛋白使之经蛋白酶体途径分解<sup>[20]</sup>. 许多肿瘤中SKP2蛋白与P27蛋白呈负相关<sup>[21]</sup>. 我们发现68例大肠癌组织中SKP2蛋白与P27蛋白呈负相关. 在标本中有10例同时高表达SKP2与P27, 6例同时低表达SKP2与P27, 表明除了SKP2尚有其他机制调节P27表达. Cks1是高度保守的Suc1/Cks家族成员之一, SKP2泛素连接酶复合体降解的靶点是CDK抑制剂P27, 这个过程需要Cks1. 研究表明, 在体内体外, SKP2只有结合Cks1后才能识别P27, 并进行泛素化蛋白酶降解. P27在胞质内可能存在多种泛素化降解途径. P27从细胞核到细胞质的运输可能是由jun激活结构域结合蛋白1(Jab1)调节的. Cks1, Jab1, SKP2和其他因子可能在分解P27中发挥作用. P27与SKP2, Cks1, Jab1之间的关系尚需进一步研究<sup>[22]</sup>.

SKP2与许多恶性肿瘤预后差相关, 例如肺癌<sup>[22]</sup>、口腔鳞状细胞癌<sup>[14]</sup>、胃癌<sup>[13]</sup>. 有关SKP2在大肠癌中与预后的相关性国内外研究较少. 本研究中, SKP2高表达的大肠癌患者生存期短; 而SKP2低表达生存期较长. 多因素分析表明: SKP2表达是大肠癌的独立预后因素. SKP2尚参与许多细胞周期调节因子及转录因子泛素化降解, 如: CyclinA, CyclinB, CyclinE, CyclinD1, CDC25B, P21, P130, P53, P57, E2F, hOrclP等<sup>[23-26]</sup>. 这些底物的变化可能与恶性肿瘤预后差有关. 我们的研究结果与Shapira *et al*<sup>[19]</sup>的结果一致. 总之, SKP2高表达与大肠癌高侵袭性有关, SKP2可能作为大肠癌的预后指标和治疗的新靶点.

## 4 参考文献

- Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 2001; 264: 148-168
- Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 2000; 183: 10-17
- Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 3381-3385
- Chiarle R, Pagano M, Inghirami G. The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 91-94
- Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997; 3: 231-234
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996; 85: 707-720
- Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A, Pizzolo G, Magidson J, Montagnoli A, Pagano M, Maes B, De Wolf-Peters C, Inghirami G. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 2000; 95: 619-626
- Piva R, Cancelli I, Cavalla P, Bortolotto S, Dominguez J, Draetta GF, Schiffer D. Proteasome-dependent degradation of p27/kip1 in gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 691-696
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5043-5048
- Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami G, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2515-2520
- Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM, Hershko A. Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 2001; 91: 1745-1751
- Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, Ramaswamy S, Isaac B, Rue M, Monti F, Loda M, Pagano M. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest* 2002; 110: 633-641
- Masuda TA, Inoue H, Sonoda H, Mine S,

## ■同行评价

本文提出将SKP2作为大肠癌的独立预后因素的观点有一定的临床意义,对大肠癌预后的判断有一定的帮助,结论可靠。

- Yoshikawa Y, Nakayama K, Nakayama K, Mori M. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res* 2002; 62: 3819-3825
- 14 Kudo Y, Kitajima S, Sato S, Miyauchi M, Ogawa I, Takata T. High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2001; 61: 7044-7047
- 15 Ma XM, Liu Y, Guo JW, Liu JH, Zuo LF. Relation of overexpression of S phase kinase-associated protein 2 with reduced expression of p27 and PTEN in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6716-6721
- 16 Wirbelauer C, Sutterluty H, Blondel M, Gstaiger M, Peter M, Reymond F, Krek W. The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *EMBO J* 2000; 19: 5362-5375
- 17 Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW, Kaelin WG Jr. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 2004; 428: 194-198
- 18 Wang Q, Moyret-Lalle C, Couzon F, Surbiguet-Clippe C, Saurin JC, Lorca T, Navarro C, Puisieux A. Alterations of anaphase-promoting complex genes in human colon cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 1486-1490
- 19 Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Minkov I, Herskho DD. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 1336-1346
- 20 Osoegawa A, Yoshino I, Tanaka S, Sugio K, Kameyama T, Yamaguchi M, Maehara Y. Regulation of p27 by S-phase kinase-associated protein 2 is associated with aggressiveness in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4165-4173
- 21 杨竹林, 黄生福, 王群伟, 苗雄鹰, 梁珊. 胰腺癌组织中SKP2和P27蛋白表达及其相互关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2717-2719
- 22 Takanami I. The prognostic value of overexpression of Skp2 mRNA in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 727-731
- 23 Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* 2000; 19: 2069-2081
- 24 Yu ZK, Gervais JL, Zhang H. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11324-11329
- 25 Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Takahashi T, Fujisawa T, Inazawa J. Down-regulation of SKP2 induces apoptosis in lung-cancer cells. *Cancer Sci* 2003; 94: 344-349
- 26 Kamura T, Hara T, Kotoshiba S, Yada M, Ishida N, Imaki H, Hatakeyama S, Nakayama K, Nakayama KI. Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10231-10236

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

## ●消息●

## 全国消化系疾病的诊疗进展学习班通知

本刊讯 由福建医科大学附属协和医院承办的国家级继续医学教育项目《消化系疾病的诊疗进展》将于2006-10-14/18在福建省武夷山市举行,学习班授予I类继续教育学分11分,欢迎全国消化系病专业中高级医务人员报名参加。

联系人: 陈运新, xinxingege75@sohu.com, 0591-83357896转8482。

地址: 福建省福州市新权路29号福建医科大学附属协和医院, 邮编: 350001。

# 转化生长因子 $\beta_1$ 和结缔组织生长因子在肝纤维化中的表达

丁宁, 李岩

丁宁, 李岩, 中国医科大学附属二院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属二院消化内科. yanli0227@126.com

电话: 024-83955189 传真: 024-31290392

收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-06-30

## Expression of transforming growth factor- $\beta_1$ and connective tissue growth factor in hepatic fibrosis

Ning Ding, Yan Li

Ning Ding, Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. yanli0227@126.com

Received: 2006-05-20 Accepted: 2006-06-30

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) and connective tissue growth factor (CTGF) as well as their correlations in the different stages of hepatic fibrosis.

**METHODS:** Liver puncture was performed on 41 patients with chronic viral hepatitis. The expression of TGF- $\beta_1$  and CTGF were detected by immunohistochemistry and other serum fibrosis markers were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Subsequently, the images of TGF- $\beta_1$  and CTGF were analyzed for semi-quantification by multimedia color image analyzer.

**RESULTS:** The expression of TGF- $\beta_1$  and CTGF were increased with the elevation of fibrosis stage ( $F = 49.56, 23.01$ , both  $P < 0.05$ ) except  $S_1$  and  $S_2$  stage. TGF- $\beta_1$  expression was not significantly different among patients of  $G_1, G_2, G_3$  and  $G_4$  stage. CTGF expression of  $G_4$  stage was distinctly different from that of  $G_1, G_2$  and  $G_3$  stage, while no difference was observed among patients of  $G_1, G_2$  and  $G_3$  stage. There was closely

positive correlation between the levels of TGF- $\beta_1$  and CTGF in hepatic tissue ( $r = 0.855, P < 0.05$ ). The tissue levels of TGF- $\beta_1$  and CTGF were positively correlated with serum levels of PCIII, LN, HA, and IVC (TGF- $\beta_1$ :  $r = 0.744, 0.815, 0.756$  and  $0.741, P < 0.05$ ; CTGF:  $r = 0.663, 0.690, 0.686$  and  $0.640, P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of TGF- $\beta_1$  and CTGF are closely correlated with the degree of hepatic fibrosis, and the expression of CTGF is more reliable, especially in the early stage.

**Key Words:** Transforming growth factor- $\beta_1$ ; Connective tissue growth factor; Hepatic fibrosis

Ding N, Li Y. Expression of transforming growth factor- $\beta_1$  and connective tissue growth factor in hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2521-2526

## 摘要

**目的:** 观察肝纤维化不同阶段转化生长因子 $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )和结缔组织生长因子(CTGF)在肝组织内表达的相关性。

**方法:** 41例行肝组织活检慢性病毒性肝炎患者, 免疫组织化学检测TGF- $\beta_1$ 和CTGF, 并用多媒体彩色图像分析仪对上述二指标进行图像分析定量。

**结果:** 按肝纤维化分组, 除 $S_1, S_2$ 期无统计学差别意义外, TGF- $\beta_1$ 和CTGF均随纤维化分期加重而表达增加( $F = 49.56, 23.01, P < 0.05$ )。按炎症活动度分组 $G_1, G_2, G_3, G_4$ 组间TGF- $\beta_1$ 两两比较无显著性差异。 $G_1, G_2, G_3$ 组CTGF两两比较无显著性差异, 而 $G_4$ 组则有统计学意义。肝组织中TGF- $\beta_1$ 与CTGF呈正相关( $r = 0.855, P < 0.05$ )。TGF- $\beta_1$ 和CTGF与血清PC III, LN, HA, IVC均呈正相关(TGF- $\beta_1$ :  $r = 0.744, 0.815, 0.756, 0.741, P < 0.05$ ;  $r = 0.663, 0.690, 0.686, 0.640, P < 0.05$ )。

**结论:** 肝脏TGF- $\beta_1$ 和CTGF表达水平与肝组织纤维化程度密切相关, 在早期肝硬化阶段CTGF表达更可靠。

## ■背景资料

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复的代偿反应, 是许多慢性肝病发展的普遍结果, 进一步发展则形成肝硬化, 是一种严重威胁人类健康的疾病。



## ■应用要点

在正常状态下, CTGF表达水平很低, 而且主要在间质细胞中表达, 其作用也局限于结缔组织, 因此阻断CTGF的表达或抑制其生物活性有可能成为特异、有效的治疗纤维化的手段。

**关键词:** 转化生长因子 $\beta_1$ ; 结缔组织生长因子; 肝纤维化

丁宁, 李岩. 转化生长因子 $\beta_1$ 和结缔组织生长因子在肝纤维化中的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2521-2526

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2521.asp>

## 0 引言

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复的代偿反应, 是许多慢性肝病发展的普遍结果, 进一步发展则形成肝硬化, 是一种严重威胁人类健康的疾病. 研究肝纤维化发展过程及发病机制以及客观评价肝纤维化程度有重要的意义. 我们以慢性病毒性肝炎患者为研究对象, 观察肝纤维化不同阶段转化生长因子 $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )和结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)在肝组织内表达情况, 探讨TGF- $\beta_1$ 和CTGF与肝纤维化发生、发展及炎症损伤的关系. 同时评价TGF- $\beta_1$ 和CTGF及其他常用血清纤维化标志物与肝纤维化的相关性, 从而为临床提供更为可靠的反应肝纤维化的指标.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2005-03/10住院41例慢性病毒性肝炎患者, 男28例, 女13例; 年龄15-60岁(平均36岁). 符合2000年《病毒性肝炎防治方案》的诊疗标准, 其中: 轻度29例, 中度6例, 重度6例. 病原学诊断: 乙型肝炎38例, 丙型肝炎3例. 上述病例经血清学检查均排除甲、丁、戊型肝炎病毒感染及其他系统疾病, 无肝穿刺活检禁忌症. 各组间性别和年龄分布差异无显著性( $P>0.05$ ). 所有病例均在B超引导下进行肝穿刺活检, 穿刺针采用德国进口16#针, 经皮负压抽吸肝穿法. 肝穿刺标本长度应超过1 cm(即镜下超过6个肝小叶范围). 活检组织用40 g/L中性甲醛溶液固定24 h, 石蜡包埋保存. 肝穿刺前抽取空腹不抗凝静脉血3 mL, 待血块收缩后以3000 r/min速度离心10 min, 取血清置于-20℃冰箱保存待检. 一抗、二抗、DAB显色剂等均购自武汉博士德生物技术有限公司.

**1.2 方法** 血清肝纤维化指标透明质酸(HA)、III型前胶原(PCIII)、层黏连蛋白(LN)、IV型胶原(IVC)检测均采用酶联免疫法. 血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、抗HBs、乙型肝炎e抗原(HBeAg)、抗HBe、抗HBc、抗HBcIgM、抗HCV采用酶联免疫法; HBV DNA, HCV RNA采

用PCR法; 抗HDV, 抗HEV, 抗HEVIgM采用酶联免疫法. 活检组织用40 g/L中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 连续切片, 进行HE, Mallory染色, 常规显微镜观察. 按照2000年全国诊断标准由病理专科医师对肝脏炎症活动度和纤维化程度分别进行分级、分期做出组织学诊断. TGF- $\beta_1$ 检测: 利用石蜡切片按常规ABC法进行. 40 g/L中性甲醛固定肝组织24 h, 石蜡包埋, 制成4  $\mu$ m厚的连续切片, 常规脱蜡至水; 30 g/L过氧化氢37℃孵育10 min; 枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原10 min. 其后每片滴加50  $\mu$ L BSA封闭液温箱孵育20 min后, 滴加稀释一抗(兔IgG)37℃温箱孵育1 h后, 滴加二抗(生物素羊抗兔)温箱孵育20 min, SABC温箱孵育20 min后DAB显色, 苏木精衬染, 1 mL/L盐酸酒精分化, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 阳性组织呈棕色, 阴性组织呈蓝色. CTGF指标检测: 将石蜡切片常规脱蜡至水后, 每片滴加胃蛋白酶50  $\mu$ L孵育20 min后, 滴加50 g/L BSA 50  $\mu$ L封闭液温箱孵育20 min后, 滴加稀释一抗(兔IgG)37℃温箱孵育1 h后, 滴加二抗(生物素羊抗兔)温箱孵育20 min, SABC温箱孵育20 min后DAB显色, 苏木精衬染, 1 mL/L盐酸酒精分化, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 阳性组织呈棕色, 阴性组织呈蓝色. PBS缓冲液代替一抗做阴性对照. 肝组织TGF- $\beta_1$ 和CTGF免疫组织化学染色. 肝组织TGF- $\beta_1$ 和CTGF表达图像分析定量方法: 于40倍物镜下用Olympus C3040-ADU彩色图像摄录输入仪将图像输入Meta Morph/DPI0/BX41彩色图像分析仪, 每张切片选取四周及中央5个区域, 均取该区域阳性反应最多的视野, 测阳性反应面积比(阳性面积/肝组织面积 $\times$ 100%), 即吸光度值, 再取平均值.

**统计学处理** 计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示, 统计学处理全过程采用SPSS 11.5版本统计软件, 采用方差分析. 分析前行方差齐性检验, 方差齐时用SNK法( $q$ 检验), 若方差不齐时用Tamhane's法( $q'$ 检验), 各指标间相关分析采用直线相关分析,  $P<0.05$ 时认为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 肝组织TGF- $\beta_1$ 和CTGF表达** TGF- $\beta_1$ 染色阳性物质呈棕黄色.  $S_0$ 期末见明显阳性物质;  $S_1$ ,  $S_2$ 期主要分布于汇管区、窦壁及窦内皮细胞;  $S_3$ 期主要表达纤维间隔、炎症坏死灶与纤维化发生活跃部位的肝细胞也有表达;  $S_4$ 期肝细胞内可见大

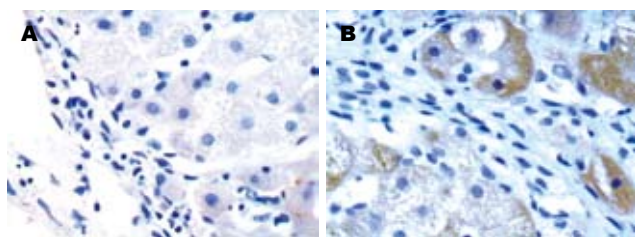


图1 慢性乙型肝炎肝组织TGF- $\beta_1$ 表达 (SABC  $\times$  400). A: S<sub>0</sub>期; B: S<sub>4</sub>期.

#### ■同行评价

TGF- $\beta_1$ , CTGF与肝纤维化发生之间的关系国内外已有不少研究, 本文用免疫组织化学方法研究了人病毒性慢性肝炎组织中TGF- $\beta_1$ , CTGF的表达与肝纤维化程度之间的关系, 类似报道较少, 研究有一定意义.

表1 肝脏纤维化分期与TGF- $\beta_1$ , CTGF和PC III, LN, HA, IVC的关系(mean  $\pm$  SD)

纤维化	n	TGF- $\beta_1$ (A)	CTGF (A)	PC III ( $\mu$ g/L)	LN (ng/L)	HA ( $\mu$ g/L)	IVC ( $\mu$ g/L)
S <sub>0</sub>	9	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	80.89 $\pm$ 15.99 <sup>a</sup>	111.38 $\pm$ 11.30	57.63 $\pm$ 14.01	43.73 $\pm$ 9.36
S <sub>1</sub>	9	0.15 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	101.12 $\pm$ 29.46 <sup>a</sup>	117.77 $\pm$ 17.70	79.39 $\pm$ 13.00	46.29 $\pm$ 10.30
S <sub>2</sub>	11	0.25 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.04	100.93 $\pm$ 13.89	160.83 $\pm$ 21.35	95.32 $\pm$ 25.55 <sup>a</sup>	52.76 $\pm$ 11.61
S <sub>3</sub>	7	0.44 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	149.57 $\pm$ 48.58 <sup>a</sup>	172.03 $\pm$ 24.40	116.69 $\pm$ 16.59 <sup>a</sup>	62.42 $\pm$ 8.17 <sup>a</sup>
S <sub>4</sub>	5	0.48 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	257.84 $\pm$ 26.37 <sup>a</sup>	202.37 $\pm$ 4.17 <sup>a</sup>	292.62 $\pm$ 4.84 <sup>a</sup>	111.74 $\pm$ 4.87 <sup>a</sup>
F值		49.56	23.01	39.22	31.29	38.76	47.58

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , 两两比较.

量染色阳性物质(图1). CTGF染色阳性物质呈棕黄色. S<sub>0</sub>期末见明显阳性物质, 偶在Disse间隙、汇管区基质及间质细胞内可见少量表达; S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>期主要分布于窦内皮细胞、成纤维细胞、星状细胞及汇管区, 胆管上皮细胞有时也呈阳性反应; S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>期在炎症反应较明显区域的肝细胞及近汇管区的肝细胞偶见阳性着色(图2).

2.2 肝TGF- $\beta_1$ 和CTGF与肝组织炎症活动度的关系(表1) 按炎症活动度分组G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>组间TGF- $\beta_1$ 两两比较无显著性差异. G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>组CTGF两两比较无显著性差异, 而G<sub>4</sub>组则有统计学意义.

2.3 肝TGF- $\beta_1$ 和CTGF与血清纤维化指标的关系(表2) 肝组织中TGF- $\beta_1$ 与CTGF指标呈正相关( $r = 0.855$ ,  $P = 0.001$ ), 肝组织TGF- $\beta_1$ 水平与血清PCIII, LN, HA, IVC均呈正相关( $r = 0.744, 0.815, 0.756, 0.741$ ,  $P$ 值均为0.001). 肝组织CTGF水平与血清PCIII, LN, HA, IVC均呈正相关( $r = 0.663, 0.690, 0.686, 0.640$ ,  $P$ 值均为0.001).

### 3 讨论

肝纤维化是许多慢性肝病发展的普遍后果, 近年来研究发现, TGF- $\beta_1$ , CTGF与肝纤维化关系密切. 国内外关于TGF- $\beta_1$ 和CTGF的基础研究大多为细胞培养和动物实验, 临床研究有关人体肝组织内TGF- $\beta_1$ 和CTGF的分布及其临床意义的研究较少. 我们探讨慢性肝炎患者肝脏病理组织中TGF- $\beta_1$ , CTGF的分布与肝纤维化的关系, 并应用数字彩色图像分析技术加以定量分

表2 肝组织TGF- $\beta_1$ 和CTGF表达水平与肝组织炎症活动度的关系 (mean  $\pm$  SD, A)

炎症活动度	n	TGF- $\beta_1$	CTGF
G <sub>0</sub>	4	0.09 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.03
G <sub>1</sub>	4	0.13 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
G <sub>2</sub>	15	0.17 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
G <sub>3</sub>	12	0.33 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
G <sub>4</sub>	6	0.46 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.03
F值		12.91	7.59

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs G<sub>0</sub>组.

析, 更好地评估肝脏纤维化程度, 对指导临床工作有极其重要的意义. 肝纤维化是以胶原为主的细胞外基质(ECM)合成增多, 而降解相对减少, 两者失去动态平衡, 故过多ECM沉积于肝内而引起肝纤维化, 是各种慢性肝病向肝硬化发展所共有的病理改变和必经途径. 而TGF- $\beta_1$ 是调控肝纤维化发生、发展的核心物质<sup>[1]</sup>. TGF- $\beta_1$ 是一组具有多种生物学功能的蛋白多肽, 对细胞的生长、分化和多种生理、病理过程起重要的调节作用. 他参与细胞周期的调控, 血管及胚胎的形成, 诱导细胞凋亡以及免疫调节等过程. 肝脏中多种细胞均可产生TGF- $\beta$ <sup>[2]</sup>, 如肝星状细胞、枯否细胞、内皮细胞、来自血液的T淋巴细胞以及血小板等, 至少有6种亚型<sup>[3]</sup>, 在哺乳动物中只发现了3种亚型, 即TGF- $\beta_{1-3}$ . 其中在肝脏中含量最高、功能最重要的是TGF- $\beta_1$ . 在正常肝脏, TGF- $\beta_1$ 绝大部分分布于枯否细胞, 其次为

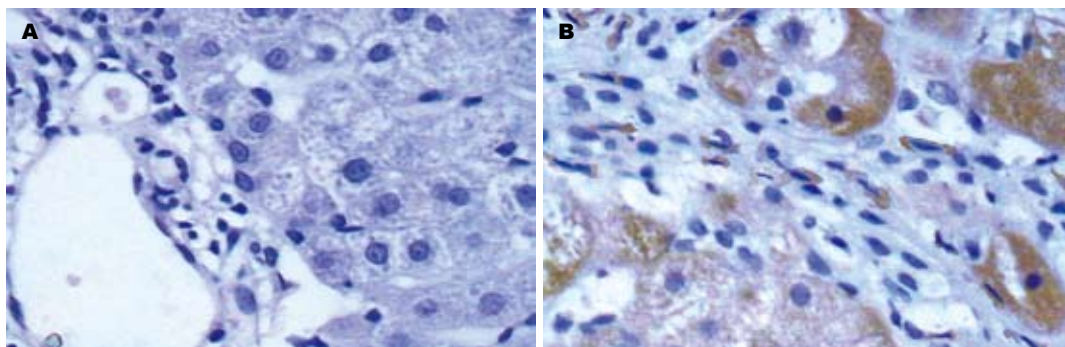


图2 慢性乙型肝炎肝组织CTGF表达(SABC×400). A: S<sub>0</sub>期; B: S<sub>4</sub>期.

肝星状细胞, 而肝窦内皮细胞和肝细胞则无表达. 研究表明TGF- $\beta_1$ 活化后生物学作用是由细胞膜上的特异受体与TGF- $\beta$ 特异结合, 亲和力很高, 分别是I, II, III型受体, 3型受体在大多数情况下共存于细胞膜上. TGF- $\beta_1$ 活化后与细胞膜表面受体结合, 激活Smads蛋白并形成复合物, 由此转入核内与各种转录因子相结合, 从而调控基因转录<sup>[4-5]</sup>. TGF- $\beta_1$ 在所有类型的细胞中均以无活性形式合成和分泌, 在体内通过二硫键结合而活化, 活化后可与受体结合并表现出生物活性<sup>[6]</sup>.

肝纤维化的形成机制为细胞外基质(ECM)的合成和降解失调. 病理特征为胶原纤维生成及大量细胞外基质在Disse间隙沉积. 而ECM的合成和降解过程很大程度由TGF- $\beta_1$ 控制<sup>[7]</sup>. 他既能促进基质合成, 又可抑制其降解, 同时又抑制肝细胞再生、促其凋亡, 从而使肝脏内肝实质细胞与间质成分比例失调, 使肝脏外基质代谢紊乱, 在Disse间隙过度沉积, 继之肝窦毛细血管瘤. 国内外的研究证实, TGF- $\beta_1$ 与纤维化关系极为密切, 但在肝纤维化的不同阶段其来源和分布尚有不同看法. 多数学者认为, 肝纤维化时肝内TGF- $\beta_1$ 主要由肝间质细胞合成, 而肝细胞是否为TGF- $\beta_1$ 的来源一直存在争议. 本实验发现在不同纤维化肝组织中, TGF- $\beta_1$ 染色阳性物质其分布及表达浓度有一定差异. S<sub>0</sub>期末未见明显阳性物质; S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>期主要分布于汇管区、窦壁及窦内皮细胞, 肝实质细胞内未出现; S<sub>3</sub>期主要分布于纤维间隔、炎症坏死灶与纤维化发生活跃部位的肝细胞也有表达; S<sub>4</sub>期在肝细胞内可见大量染色阳性物质, 这与张敏 *et al*<sup>[8]</sup>研究一致, 实验提示肝纤维化早期TGF- $\beta_1$ 表达增加主要来源于肝间质细胞, 发展至后期肝细胞亦成为重要来源. 有报道大鼠退变肝细胞中原位杂交TGF- $\beta_1$  mRNA阳性<sup>[9]</sup>, 也有用RT-PCR法检测培养人肝

细胞TGF- $\beta_1$  mRNA表达<sup>[10]</sup>. 通过肝组织病理切片TGF- $\beta_1$ 免疫组化定量分析可以得出, 在肝纤维化早期TGF- $\beta_1$ 的表达就有升高. 除S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>期无统计学差别意义外, 其余各组间有明显差异( $P<0.05$ ). 而对于其他血清肝纤维化指标, 除PC III之外, 其余各项在纤维化S<sub>1</sub>期与S<sub>0</sub>期比较均无明显差异, 显示TGF- $\beta_1$ 与PC III在反映轻度纤维化或早期纤维化方面比其他各项指标更敏感. 这与Czaja *et al*<sup>[11]</sup>通过肝纤维动物模型得出结果相符. 实验发现肝纤维化分级与TGF- $\beta_1$ 之间呈正相关, 因此临床可以通过定量检测TGF- $\beta_1$ 观察病理变化及判断抗纤维化药物治疗作用.

CTGF属即刻早期基因, 最初是从人脐静脉血管内皮细胞培养上清液中分离得到, 分子量38 kDa, 富含半胱氨酸的肝磷脂多肽, 是一种新近发现的致纤维化生长因子, 实验研究认为, 星状细胞(HSC)是其主要来源, 而CTGF表达上调, 也是星状细胞活化的中心通道. CTGF在TGF- $\beta_1$ 下游起作用, 介导TGF- $\beta_1$ 促ECM聚集和组织器官纤维化的效应, 而TGF- $\beta_1$ 对CTGF基因转录有明显调控作用. 人和动物的研究资料表明, 在器官纤维化时CTGF表达增加是一共同现象. CTGF长期过度表达能明显促进纤维化的发生、发展. 如果与TGF- $\beta_1$ 共同注入小鼠皮下, 前者诱导纤维化形成, 而CTGF则促进皮下纤维化的持久延续. CTGF能被数种因子转录激活, 其中以TGF- $\beta$ 最引人注目, 另外, PDGF, EGF, FGF也被证实可以引起CTGF的表达, 但是其作用微弱和短暂. CTGF的主要作用是: (1)促进细胞有丝分裂和成纤维细胞增殖, 合成胶原; (2)介导细胞黏附和趋化作用; (3)诱导细胞凋亡; (4)促进血管形成. 在肝、肾、肺、胰腺、血管及皮肤等许多器官组织纤维化病变中, CTGF与TGF- $\beta$ 大多协同表达增加, 以提升促纤维化效应<sup>[12-14]</sup>. 临床及实验研究均发现CTGF表达增高, 与器官纤

维化程度积分呈显著正相关, 而应用药物或反义核苷酸阻断CTGF表达, 可显著减少 I, III, IV型胶原及纤维连接蛋白间表达, 显著减轻器官纤维化病理改变. Tamatani *et al*<sup>[15]</sup>用ELISA在胆道闭锁患者血清中检测出的CTGF的含量明显高于正常人. 此外组织学研究也显示在纤维化模型大鼠和人纤维化的肝组织中CTGF mRNA的水平均明显高于正常对照组, 且CTGF水平的增高与肝纤维化进展程度相平行, 证实了CTGF自始至终参与了纤维化的过程, 与肝纤维化的发生、发展密切相关<sup>[16-17]</sup>. Hayashi *et al*<sup>[18]</sup>对正常人、肝硬化及肝癌患者活检标本进行了研究, 发现在肝硬化结节纤维化区域, CTGF大量表达, 而肝细胞甚至肝癌细胞无CTGF表达, 正常肝组织无或极少表达CTGF. 提示CTGF基因表达与肝纤维化病变具有直接相关性.

我们经免疫组化检测发现, CTGF在S<sub>0</sub>期仅见于汇管区少量梭状间质细胞内, 表达水平很低, 随肝纤维化程度的增加表达呈增加趋势. 可见于小叶周围扩大的纤维组织内的成纤维细胞、窦内皮细胞、胆管上皮细胞也可表达CTGF, 但不起主导作用. 提示肝脏损伤后, 以TGF- $\beta$ 等多种细胞因子分泌增多, 特异性的诱导CTGF表达增加, 促进ECM合成与积聚. 结果与宋仕玲 *et al*<sup>[19]</sup>应用肝纤维化大鼠实验结果相似. 研究表明, CTGF与TGF- $\beta_1$ 有良好的相关性, 相关系数为0.855 ( $P<0.05$ ), 但比较起来与血清肝纤维化指标相关程度来看TGF- $\beta_1$ 似乎更密切一些. 虽然TGF- $\beta_1$ 是诱导胶原沉积致纤维化最重要的因子, 阻断潜在TGF- $\beta_1$ 的活化, 抑制配体和受体间的相互作用以及抑制信号向上传导, 是有效的治疗手段; 但由于他还有抗增殖和抗炎作用, 长期直接干预TGF- $\beta_1$ 及其下游分子可出现严重副作用. 例如去除TGF- $\beta_1$ 基因的小鼠因失去对炎症过程的抑制, 而在出生后很快死于全身性炎症<sup>[20]</sup>. 而CTGF对结缔组织细胞起作用, 能维持成纤维细胞表型, 在正常状态下CTGF表达水平很低, 而且主要在间质细胞中表达, 其作用亦限于结缔组织, 是一个更具特异性的靶位, 故阻断他可能逆转纤维化, 开创治疗纤维化疾病的新纪元.

从肝组织炎症活动度分级来看, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>的肝组织内TGF- $\beta_1$ 和CTGF表达水平均比G<sub>0</sub>显著增高, 但炎症分级处于G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>的肝组织之间相互比较TGF- $\beta_1$ 水平却无显著性差异, 提示肝组织炎症的存在是促使TGF- $\beta_1$ 表达的必

要条件, 而与肝组织炎症活动度之间无必然联系. 而G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>期CTGF的表达无显著性差异, G<sub>4</sub>期则有统计学意义, 这说明CTGF的表达与肝细胞炎症活动在一定程度上存在相关性, 肝纤维化程度越高, CTGF表达越强烈. 而在早期肝硬化阶段检测CTGF则有明确诊疗意义, 因而推测他可作为一个更为可靠的反映肝纤维化的检测指标.

#### 4 参考文献

- 1 Roberts AB, Piek E, Bottinger EP, Ashcroft G, Mitchell JB, Flanders KC. Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 2001; 120: 43S-47S
- 2 Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316: 701-705
- 3 Boesen CC, Radaev S, Motyka SA, Patamawenu A, Sun PD. The 1.1 A crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain. *Structure* 2002; 10: 913-919
- 4 赵俊芳, 刘成, 刘成海. 转化生长因子 $\beta$ 胞内信号转导与Smads蛋白. *中国病理生理杂志* 2002; 18: 321-325
- 5 梁志清, 何振平. 贮脂细胞TGF $\beta_1$ 反义基因转移及对细胞外基质合成的抑制作用. *中国医学杂志* 1998; 78: 850-852
- 6 Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791
- 7 Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto N, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 257-268
- 8 张敏, 张玲霞, 辛绍杰, 赵景民, 王松山, 王林杰. 转化生长因子 $\beta_1$ 与病毒性肝炎肝纤维化的关系. *临床肝胆病杂志* 2000; 16: 32-33
- 9 Oberhammer F, Nagy P, Tiefenbacher R, Froschl G, Bouzahzah B, Thorgeirsson SS, Carr B. The antiandrogen cyproterone acetate induces synthesis of transforming growth factor beta 1 in the parenchymal cells of the liver accompanied by an enhanced sensitivity to undergo apoptosis and necrosis without inflammation. *Hepatology* 1996; 23: 329-337
- 10 Gao C, Gressner G, Zoremba M, Gressner AM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) expression in isolated and cultured rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1996; 167: 394-405
- 11 Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambrone MA, Wind R, Biempica L, Zern MA. *In vitro* and *in vivo* association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 1989; 108: 2477-2482
- 12 Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2003; 26: 1-9
- 13 Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2002; 82: 767-774
- 14 Tsuneyama K, Kouda W, Nakanuma Y. Portal and parenchymal alterations of the liver in idiopathic portal hypertension: a histological and



- immunochemical study. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 597-603
- 15 Tamatani T, Kobayashi H, Tezuka K, Sakamoto S, Suzuki K, Nakanishi T, Takigawa M, Miyano T. Establishment of the enzyme-linked immunosorbent assay for connective tissue growth factor (CTGF) and its detection in the sera of biliary atresia. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 748-752
- 16 Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratzu V, Bedossa P. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30: 968-976
- 17 Sedlaczek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 158: 1239-1244
- 18 Hayashi N, Kakimura T, Soma Y, Grotendorst GR, Tamaki K, Harada M, Igarashi A. Connective tissue growth factor is directly related to liver fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 133-135
- 19 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 实验性肝纤维化大鼠 TGF- $\beta$ 1、Smad3、Smad7、CTGF的表达及其意义. *陕西医学杂志* 2004; 33: 486-490
- 20 Letterio JJ, Bottinger EP. TGF-beta knockout and dominant-negative receptor transgenic mice. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 161-167

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 暨第三届全国普通外科主任论坛通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

在各方面的大力支持下,国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于2004-12在武汉成功举办,与会代表一千余人,中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli教授,国际肝胆胰协会候任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会。会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏,并受到国际肝胆胰协会的通报好评,会议取得巨大成功。

第二届会议将邀请国内外著名专家做专题讲座,针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论;并交流诊治经验,推广新理论、新技术、新方法,了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势;同时放映手术录像。大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加。

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛,因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加。

本次会议已列入2006年国家级继续医学教育项目,参会代表均授予国家级继续医学教育学分10分。

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要,同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。以附件的形式发送至 chenxp@medmail.com.cn,也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号,武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收),邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599。

# ASPP蛋白家族的研究进展

李彦, 姜政

李彦, 姜政, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市 400016

国家自然科学基金资助课题, No.30500234

通讯作者: 姜政, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院 消化内科. jianggooddoctor@mail.china.com

电话: 023-68891218

收稿日期: 2006-06-17 接受日期: 2006-07-10

## 摘要

P53凋亡刺激蛋白(apoptosis stimulating protein of P53, ASPP)家族是新近发现的与P53有关的肿瘤抑制基因家族. P53是目前公认的肿瘤抑制基因, 他能诱导细胞周期阻滞或直接诱导细胞凋亡, 但其如何作用这两种不同选择的机制一直不清, 直到ASPP家族的发现, 才使这一问题逐渐明了. ASPP与P53的作用主要是能特异性增强P53的细胞凋亡功能, 而对P53的细胞生长停滞功能则没有影响.

**关键词:** P53凋亡刺激蛋白; 细胞凋亡; P53

李彦, 姜政. ASPP蛋白家族的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2527-2530

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2527.asp>

## 0 引言

P53凋亡刺激蛋白(apoptosis stimulating protein of P53, ASPP)是Samuels *et al*<sup>[1]</sup>在2001年发现的一种新的肿瘤抑制基因家族, 随后在2003年又宣布发现了ASPP家族的另一个成员iASPP (inhibitory member of the ASPP family)<sup>[2]</sup>. 目前, 已经发现了该基因家族的3个成员: ASPP1, ASPP2和iASPP. ASPP1和ASPP2与P53结合后能激活P53的抑癌功能, 而iASPP与P53结合后却是抑制P53的抑癌功能, 这是首次发现功能完全相反的成员共存于同一基因家族的现象. 现对ASPP蛋白家族的结构、功能、与P53及其他蛋白质之间的关系等方面的研究进展进行综述.

## 1 结构

ASPP家族共有3个成员: ASPP1, ASPP2和iASPP. 其命名源于结构上的共同点<sup>[3,8]</sup>, 即: 都含有大量谷氨酰胺重复(ankyrin repeat), SH3结构

域(SH3 domain), 丰富的锚蛋白结构域(proline-rich domain)的相关蛋白质. 研究证实, ASPP家族成员均通过谷氨酰胺重复和SH3结构域与P53发生作用<sup>[4]</sup>.

关于ASPP家族结构的探索经历了一个较为漫长的过程, 最早发现的是ASPP的不完整片段(53BP2及Bbp<sup>[6]</sup>). 早在1994年, Iwabuchi *et al*<sup>[5]</sup>通过酵母双杂交技术, 利用P53 DNA结合区域作为诱饵, 结果发现了与P53相互作用的2种蛋白: 53BP2(目前证实的ASPP2的C末端的528个氨基酸)以及与ASPP2无关的BRCA1(53BP1). 1996年, Naumovski *et al*<sup>[6]</sup>发现了ASPP2的另一个不完整片段: Bbp(即不包含N末端123个氨基酸的ASPP2片段); 2001及2003年, Samuels *et al*<sup>[1]</sup>先后通过实验发现了ASPP的完整结构. ASPP1由PPP1R13B基因编码, 由1090个氨基酸组成, 其功能区域包括pro, ank及SH3. ASPP2由TP53BP2编码, 由1128个氨基酸组成, 其功能区域由pro, ank, SH3和 $\alpha$ -helical组成. ASPP1和ASPP2蛋白在N末端和C末端有很大相似性<sup>[7]</sup>, 都是MMPM序列开始, 且都从蛋氨酸开始转录. iASPP在人类由PPP1R13L基因编码, 而在线虫中由ape-1基因编码, 他由351个氨基酸组成, 是一个P56A结合蛋白, 其C末端的223个氨基酸与53BP2的C末端有52%相同, iASPP和线虫P53凋亡刺激蛋白家族抑制成员(Ce-iASPP)在C末端有广泛相似性. 而最近Slee *et al*<sup>[8]</sup>又发现了1个与iASPP的C端同源, N端更长的iASPP, 由828个氨基酸组成, 故将以前的短iASPP称为iASPP/RIA(因为iASPP曾被鉴定为Rel-associated inhibitor, RIA), 将长iASPP称为iASPP.

## 2 功能及与P53的关系

**2.1 功能** 对ASPP家族功能的研究, 最初是从其片段(53BP2和Bbp)开始的, 故得出的结论亦有较大差异. Iwabuchi *et al*<sup>[5]</sup>认为, 因为53BP2能与P53的DNA结合区域结合, 故其能通过该结合而阻止P53与DNA结合, 从而抑制P53的促凋亡作用. 而Yang *et al*<sup>[9]</sup>将53BP2转染到Hela及Cos-1细

## ■背景资料

P53凋亡刺激蛋白(ASPP)家族是新近发现的与P53有关的肿瘤抑制基因家族, 能诱导细胞周期阻滞或直接诱导细胞凋亡, 但其作用机制一直不清. 直到ASPP家族的发现, 才使这一问题逐渐明了. ASPP与P53的作用主要是能特异性增强P53的细胞凋亡功能, 而对P53的细胞生长停滞功能则没有影响.

# ■研究前沿

ASPP蛋白与其他蛋白质的关系,及他们相互作用的具体机制亦是亟待研究的问题.

胞中发现其能导致细胞凋亡,这与Ao *et al*<sup>[10]</sup>的结果相一致,即当53BP2高水平表达时促进细胞凋亡,而低水平表达将导致细胞对DNA损失物质敏感性增强. Naumovski *et al*<sup>[6]</sup>将Bbp转染入细胞,发现其并不能引起细胞凋亡,但能引起G2/M期阻滞. Iwabuchi *et al*<sup>[11]</sup>通过转染实验发现,53BP2在加强P53应答基因P21的转录的同时,还增加P53抑制转染了癌基因*ras*和E1A的小鼠胚胎成纤维细胞的转化病灶的形成的能力.

张云 *et al*<sup>[12]</sup>利用RT-PCR方法,测定ASPP2 mRNA在正常人血液单核细胞与人淋巴瘤细胞株Jurkat及成纤维细胞和结肠癌细胞株HT-29的表达水平,结果发现ASPP2 mRNA在正常人血液单核细胞中的表达水平比淋巴瘤细胞株Jurkat的表达水平高,而正常人成纤维细胞中ASPP2的表达水平比结肠癌细胞株HT-29低,表明ASPP2的mRNA表达量是在P53野生型的肿瘤细胞中降低而不是在P53突变型的肿瘤细胞中,说明ASPP2调节着肿瘤抑制功能. Lossos *et al*<sup>[13]</sup>用荧光定量RT-PCR和免疫组化方法对弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)和滤泡性淋巴瘤(follicular center lymphoma, FCL)等进行研究发现,ASPP2表达高的患者存活时间长,而ASPP2表达低患者存活时间短,提示ASPP2表达量的高低可能与肿瘤的预后亦有关. Samuels *et al*<sup>[1]</sup>对野生型P53乳腺癌的ASPP1和ASPP2的mRNA表达研究发现,有60%的肿瘤ASPP1表达水平下降,23%的肿瘤ASPP2表达水平下降,且在这23%的肿瘤中有90%的ASPP1表达水平下降,同时通过对Jw2, Tero, Saos-2细胞株研究,发现ASPP1/ASPP2和P53共表达,可使转染的肿瘤细胞株50%凋亡,而ASPP1和ASPP2与E2F1和Bax等肿瘤抑制基因共表达则不能使细胞凋亡增加.

Bergamaschi *et al*<sup>[2]</sup>检测了8例野生型P53和ASPP水平正常的乳腺癌患者的iASPP含量,结果发现7例患者的iASPP都增高,同时他们还利用RNA干扰或反义RNA技术阻段iASPP表达,发现能诱导美丽线虫及人类细胞发生依赖P53的凋亡,这表明新发现的ASPP家族成员对细胞凋亡具有抑制作用,故将其命名为iASPP. Zhang *et al*<sup>[14]</sup>采用半定量RT-PCR方法检测iASPP mRNA在急性白血病(acute leukemia, AL)细胞中的表达,发现与正常人及CR期AL患者相比,初发AL细胞存在iASPP高表达,提示iASPP的高表达可能在部分AL的发生或进展中起一定作

用. Yang *et al*<sup>[9]</sup>研究发现, iASPP能与核因子-Kappa B(nuclear factor-Kappa B, NF-κB)的亚单位P65(Re1A)结合,控制NF-κB的转录活性,在心脏、胎盘、前列腺等组织中高表达,在肝脏、睾丸组织和白细胞中低表达.

通过以上一系列研究证实, ASPP蛋白家族与人类肿瘤密切相关. ASPP1及ASPP2通过增强P53与DNA的结合,促进P53促凋亡基因启动子的活化<sup>[1]</sup>,从而特异性增强P53的促细胞凋亡功能,但对P53的细胞生长停滞功能没有影响, Samuels *et al*<sup>[1]</sup>通过体外实验证实了这一点,在表达ASPP2的U2OS细胞内,检测P53是选择与抗凋亡基因Bax的启动子结合还是与细胞周期依赖性激酶抑制剂P21的启动子结合,结果显示P53更易与促凋亡基因Bax的启动子结合. 而iASPP与ASPP1及ASPP2的功能刚好相反,他能抑制细胞凋亡,因为iASPP与ASPP1/ASPP2一样,具有相同的与P53结合的区域,故其可通过与ASPP1和ASPP2竞争与P53结合,从而抑制P53的抑癌功能.

2.2 与P53的关系 众所周知, P53蛋白在细胞凋亡过程中起着至关重要的作用. 根据细胞内P53的状态可将肿瘤分为2类,即野生型P53肿瘤和突变型P53肿瘤. 据多项研究表明,在50%的肿瘤细胞中存在着P53突变. Vogelstein *et al*<sup>[15]</sup>观察发现,具有遗传性P53基因突变的小鼠在幼年时即自发发生肿瘤, P53的突变区域主要集中在P53的核心区域或DNA结合区,与ASPP作用区域相一致. Iwabuchi *et al*<sup>[5]</sup>在早期的研究中发现,当P53DNA结合区域的R175H或R273H发生突变后, 53BP2就不能与P53相互作用. 随后Gorina *et al*<sup>[4]</sup>又观察到, P53最易发生突变的2个区域(R248W和R273H),也是P53的DNA结合区域及与ASPP2结合的区域,尽管Samuels *et al*<sup>[1]</sup>通过体外实验发现, ASPP1及ASPP2既能与野生型P53结合,也能与突变型P53结合,但突变后的P53已不再能与ASPP蛋白相互作用,这样, ASPP就不能发挥其增强P53的促凋亡作用而诱导细胞凋亡. 研究者进一步研究发现,在肿瘤中当介导P53与ASPP2相互作用的一个重要氨基酸残基R181突变成亮氨酸或异亮氨酸,这些残基就不再能与ASPP1或ASPP2共同作用来增强肿瘤抑制基因Bax的促凋亡作用.

与此同时,研究者又发现,仍有大量肿瘤发生于含有未突变P53即野生型P53细胞中,例如在白血病、乳腺肿瘤以及肝脏的恶性肿瘤中,

P53的突变率小于25%, 此时肿瘤细胞主要通过下调ASPP1及ASPP2的表达量或使iASPP的表达量升高来抑制细胞凋亡. Liu *et al*<sup>[16]</sup>发现在含有野生型P53的肿瘤细胞中, ASPP1及ASPP2的mRNA的表达下降, 其下降可能与ASPP的5'非转录区CpG岛的异常高甲基化有关, 但因目前对ASPP的上游调节器的研究尚处于探索之中, 故导致其甲基化的具体机制尚待进一步研究. 此外, 在含有野生型P53的肿瘤细胞中, ASPP蛋白自身是否发生了突变也是值得思考的问题, 尽管Mori *et al*<sup>[17]</sup>通过对大量不论是表达野生型还是突变型P53的肿瘤细胞进行观察, 均未发现53BP2存在突变, 但这并不能说明ASPP蛋白自身是否发生了突变.

### 3 与其他蛋白质的关系

ASPP作为能决定细胞凋亡的重要蛋白, 他们自身是否受到严格的调节亦是科学家们一直探索的问题. 到目前为止, 通过酵母双杂交实验已发现至少6种能与ASPP2发生作用的蛋白质, 即: Bcl-2 (Espanel *et al*)<sup>[18]</sup>, p65/Rel (Helps *et al*)<sup>[19]</sup>, 蛋白质磷酸酶(Naumovski *et al*)<sup>[6]</sup>, c-Yes相关蛋白/YAP(Yang *et al*)<sup>[9]</sup>, 结肠腺瘤样息肉病同系物/APLI (Nakagawa *et al*)<sup>[20]</sup>及丙型肝炎病毒(Cao *et al*)<sup>[21]</sup>. ASPP2仍然通过其谷氨酸重复和SH3结构域与这些蛋白结合; 同时, 除P53之外的能与ASPP1结合的蛋白质也相继被发现.

**3.1 Bcl-2** Bcl-2是一种早已被证实能抑制细胞凋亡, 延长细胞寿命的蛋白质. 他能够抑制P53诱导的细胞凋亡而不影响其对细胞周期的阻滞作用. ASPP2与Bcl-2的结合区域和其与P53的结合区域相同, 即SH3结构域和谷氨酸重复序列, 故P53与Bcl-2不能同时与ASPP2结合, 他们通过竞争与ASPP2结合. 已知Bcl-2能够抑制P53介导的凋亡而不影响其对细胞周期的调节, 其中可能的机制是, ASPP2通过与Bcl-2竞争与P53结合, 使Bcl-2与P53隔离, 抑制Bcl-2, 从而加强了P53介导的促细胞凋亡作用. 但是, Bcl-2还可以通过抑制另一种与P53类似的能导致细胞凋亡的转录因子E2F-1来抑制凋亡, 而研究发现, ASPP并不能影响E2F-1介导的细胞凋亡. 这是否意味着Bcl-2是通过两套不同的机制分别作用于P53和E2F-1从而达到抑制细胞凋亡的作用的, 或者说ASPP1和ASPP2的促进细胞凋亡的作用并不是完全通过抑制Bcl-2来实现的, 而只能说是增强了P53的促凋亡作用<sup>[1]</sup>. 总之, ASPP2与Bcl-2

的相互作用的结果及其重要性尚待进一步阐明.

**3.2 P65** Yang *et al*<sup>[9]</sup>通过实验发现, ASPP2能与NF- $\kappa$ B的亚单位P65(RelA)发生相互作用. NF- $\kappa$ B是核因子中重要的一组蛋白质, 包括NF- $\kappa$ B1(P50), NF- $\kappa$ B2(P52)和Rel癌蛋白如RelA(P65), RelB(P68)及c-Rel等, 是普遍存在于细胞质中的一种快反应转录因子, 一般以二聚体形式存在. 在静息时他与抑制性 $\kappa$ B(inhibitory  $\kappa$ B, I $\kappa$ B)结合而形成一种无活性的三聚体形式, 当细胞受到应激原等外界刺激时, I $\kappa$ B的丝氨酸残基磷酸化, 并进一步泛素化, I $\kappa$ B与NF- $\kappa$ B分离, NF- $\kappa$ B得以释放出来, 迅速发生核易位, 与相应的序列结合, 从而启动或增强某些基因的转录. 53BP2(即ASPP2的第123-1128个氨基酸)能与P65的中心区域, 包括: 二聚体化功能区, 核定位信号及富含脯氨酸的基序结合, 过表达的P65能导致53BP2过表达从而抑制细胞凋亡, 但53BP2只是ASPP2的一个片段, P65对完整的ASPP1及ASPP2的作用和影响尚待进一步研究.

总之, 癌症是对人类生命威胁最严重的疾病, 全世界科学家多年来一直致力于寻找根除他的有效方法, ASPP的发现又一次证明了抑癌基因的力量, 也大大激发了科学家前进的信心, 但目前对ASPP的研究才刚起步, 对ASPP的调控机制的进一步探讨, 通过抑制iASPP或激活ASPP来提高P53的诱导细胞凋亡的功能, 开发能对ASPP基因产生修复和激活作用的药物, 并将之应用于临床, 将是科学家下一步努力的方向.

### 4 参考文献

- 1 Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 2001; 8: 781-794
- 2 Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK, O'Connor DJ, Zhong S, Campargue I, Tomlinson ML, Kuwabara PE, Lu X. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet* 2003; 33: 162-167
- 3 Slee EA, Lu X. The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage. *Toxicol Lett* 2003; 139: 81-87
- 4 Gorina S, Pavletich NP. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* 1996; 274: 1001-1005
- 5 Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6098-6102
- 6 Naumovski L, Cleary ML. The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol Cell Biol* 1996; 16:

### ■应用要点

肿瘤的基因治疗已成为继手术、放疗、化疗后发展起来的肿瘤治疗第四大疗法, 在提高恶性肿瘤治疗效果、延长生存时间、降低放疗和化疗副作用方面发挥了重要作用. 而ASPP家族的发现又一次证明了抑癌基因的作用, 但目前对ASPP的研究才刚起步, 对ASPP的调控机制的进一步探讨, 通过抑制iASPP或激活ASPP的手段来提高P53的诱导细胞凋亡的功能, 开发能对ASPP基因产生修复和激活作用的药物, 并将之应用于临床, 将是科学家下一步努力的方向.



## ■同行评价

本文较全面、细致地介绍了ASPP家族的结构、功能及与肿瘤抑制基因P53的关系的研究进展,使人们对P53诱导细胞凋亡或细胞周期阻滞的分子机制有了更进一步认识,为通过抑制iASPP或激活ASPP来提高P53的诱导细胞凋亡的功能来达到治疗肿瘤的目的提出了新的研究思路。该文对肿瘤治疗研究具有一定指导意义。

- 3884-3892
- 7 Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 2004; 23: 2809-2818
- 8 Slee EA, Gillotin S, Bergamaschi D, Royer C, Llanos S, Ali S, Jin B, Trigiante G, Lu X. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization. *Oncogene* 2004; 23: 9007-9016
- 9 Yang JP, Hori M, Takahashi N, Kawabe T, Kato H, Okamoto T. NF-kappaB subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2. *Oncogene* 1999; 18: 5177-5186
- 10 Ao Y, Rohde LH, Naumovski L. p53-interacting protein 53BP2 inhibits clonogenic survival and sensitizes cells to doxorubicin but not paclitaxel-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 2720-2725
- 11 Iwabuchi K, Li B, Massa HF, Trask BJ, Date T, Fields S. Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J Biol Chem* 1998; 273: 26061-26068
- 12 张云, 刘泽军, 李维, 杨丽华, 顾寿智, 卢欣. 肿瘤细胞中ASPP2 mRNA的表达及意义. 第三军医大学学报 2003; 25: 2103-2105
- 13 Lossos IS, Natkunam Y, Levy R, Lopez CD. Apoptosis stimulating protein of p53 (ASPP2) expression differs in diffuse large B-cell and follicular center lymphoma: correlation with clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 2309-2317
- 14 Zhang X, Wang M, Zhou C, Chen S, Wang J. The expression of iASPP in acute leukemias. *Leuk Res* 2005; 29: 179-183
- 15 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310
- 16 Liu ZJ, Lu X, Zhang Y, Zhong S, Gu SZ, Zhang XB, Yang X, Xin HM. Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in cancer cell lines retaining wild-type p53. *FEBS Lett* 2005; 579: 1587-1590
- 17 Mori T, Okamoto H, Takahashi N, Ueda R, Okamoto T. Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines. *FEBS Lett* 2000; 465: 124-128
- 18 Espanel X, Sudol M. Yes-associated protein and p53-binding protein-2 interact through their WW and SH3 domains. *J Biol Chem* 2001; 276: 14514-14523
- 19 Helps NR, Barker HM, Elledge SJ, Cohen PT. Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53. *FEBS Lett* 1995; 377: 295-300
- 20 Nakagawa H, Koyama K, Murata Y, Morito M, Akiyama T, Nakamura Y. APCL, a central nervous system-specific homologue of adenomatous polyposis coli tumor suppressor, binds to p53-binding protein 2 and translocates it to the perinucleus. *Cancer Res* 2000; 60: 101-105
- 21 Cao Y, Hamada T, Matsui T, Date T, Iwabuchi K. Hepatitis C virus core protein interacts with p53-binding protein, 53BP2/Bbp/ASPP2, and inhibits p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 788-795

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

## ● 消息 ●

## 第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知

本刊讯 由泰国Chulalongkorn医院承办的第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议将于2006-11-12/14在泰国曼谷举行, 欢迎各国研究幽门螺旋杆菌的学者报名参加。

## 1 地址

General Secretariat, GI Unit, Department of Medicine, 1873 Prompun Building 1st Floor. Chulalongkorn Hospital, Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330 Thailand

## 2 联系方式

电话: +662-256-4265; 传真: +662-253-8272, +662-652-4219;

Email: wphc\_2006@mail.com; 网址: www.6wphc2006.com; 联系人: Dr. Duangporn Thong-Ngam

# 肠道产丁酸细菌及其丁酸产生机制的研究进展

于卓腾, 杭苏琴, 姚文, 朱伟云

于卓腾, 杭苏琴, 姚文, 朱伟云, 南京农业大学动物科技学院  
消化道微生物研究室 江苏省南京市 210095  
国家杰出青年科学基金资助项目, No. 30025034  
通讯作者: 朱伟云, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学动物  
科技学院消化道微生物研究室. zhuweiyun@njau@hotmail.com  
电话: 025-84395523 传真: 025-84395314  
收稿日期: 2006-06-14 接受日期: 2006-07-10

## 摘要

哺乳动物大肠中的厌氧微生物能发酵产生大量的短链脂肪酸(SCFA), 包括乙酸、丙酸和丁酸, 其中丁酸是结肠能量的首选来源, 对肠黏膜修复及结肠炎和结肠癌的预防起作用. 近年来, 随着分子生物学技术的发展, 关于肠道产丁酸菌种类、数量及发酵特性的研究有了很大进展. 本文就单胃动物肠道产丁酸菌种类、丁酸产生途径的研究新进展进行综述.

关键词: 产丁酸菌; 丁酸; 结肠

于卓腾, 杭苏琴, 姚文, 朱伟云. 肠道产丁酸细菌及其丁酸产生机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2531-2534  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2531.asp>

## 0 引言

哺乳动物大肠中的厌氧微生物可发酵产生大量的短链脂肪酸(SCFA), 包括乙酸、丙酸和丁酸. 这些SCFA能够为结肠提供能量, 其中丁酸是肠黏膜细胞的主要能量来源<sup>[1]</sup>. 人肠道细胞体外研究表明, 丁酸可促进肠黏膜修复及其功能恢复, 并且能抑制炎症细胞因子的形成, 从而起抗炎作用<sup>[2-3]</sup>. 通过肠道灌注, 丁酸钠可促进三硝基苯磺酸实验性结肠炎的愈合<sup>[4]</sup>. 体外研究表明, 丁酸还具有抗肿瘤作用, 他可减少肠道上皮细胞的肿瘤坏死因子的分泌<sup>[3]</sup>, 能诱导肿瘤细胞分化和凋亡, 从而抑制肿瘤生长, 并且这种作用对肿瘤等转化细胞具有特异性<sup>[1]</sup>. 国内外已有许多关于丁酸对肠道功能的报道, 但对肠道内产丁酸菌的报道还较少, 肠道内产丁酸菌可产生大量丁酸, 因此本文就肠道产丁酸菌的种类及其产丁酸的调控作一综述.

## 1 肠道产丁酸菌种类及分布

在正常生理状态下, 胃肠道微生物的生态环境保持相对稳定, 但不同肠段因环境条件不同其微生物的种类和数量存在差异. 胃中的低pH (2.5-3.5)对大多数微生物有抑制作用, 细菌平均数量为 $10^3$  CFU/mL; 小肠由于胆汁和胰液的作用, 停留在其中的微生物种类和数量也相对较少, 细菌平均数量为 $10^8$  CFU/mL. 大肠由于特殊的位置、结构、酸碱条件和厌氧环境使得其中的微生物种类最复杂, 数量最多. 有研究表明在健康成年人结肠中栖息的细菌数量达到 $10^{13}$ - $10^{14}$  CFU/L, 有300-400种, 主要为*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Faecalibacterium*和*Lactobacillus*等<sup>[5]</sup>.

产丁酸菌主要存在于盲肠和结肠, 主要属于梭菌属(*Clostridium*)、真杆菌属(*Eubacterium*)和梭杆菌属(*Fusobacterium*). 由于传统培养方法的限制, 关于肠道中产丁酸菌的种类和数量知之甚少. 近年来, 随着分子生物学技术的发展, 肠道产丁酸菌的研究有了很大进展, 许多产丁酸菌得以被认识或重新被命名. 过去的研究认为, *Fusobacterium prausnitzii*的一些菌株是肠道中主要的产丁酸菌之一<sup>[6]</sup>. 但是最近研究发现, 表型上属于*F. prausnitzii*的产丁酸菌菌株在16S rDNA序列遗传进化上并不与真正的*Fusobacterium*菌株相关<sup>[7]</sup>, 进一步研究被鉴定归为新属的种, 即*Faecalibacterium prausnitzii*<sup>[8]</sup>. *Eubacterium*菌也是肠道和粪样中主要产丁酸菌, 如*E. rectale*, *E. ramulus*, *E. ventriosum*, *E. oxidoreducens*等都可在人粪样中分离到. Duncan et al<sup>[9-10]</sup>从人粪样中分离到*E. oxidoreducens*和*F. prausnitzii*外, 还发现了5株与已有菌不同的产丁酸菌. 这5株菌之间其16S rDNA序列相似性在98.5%以上, 表型及发酵特性相似, 且均与*E. rectale*最为接近, 但通过16S rDNA序列分析后发现这些菌株与*R. cecicola*关系更近, 但与

## ■背景资料

丁酸是结肠能量的首选来源, 对肠黏膜修复及结肠炎和结肠癌的预防起作用. 肠道产丁酸菌是丁酸产生的主要来源, 国内外已有许多关于丁酸对肠道功能的报道, 但对肠道内产丁酸菌的报道还较少, 近年来随着分子生物学技术的发展, 关于肠道产丁酸菌群组成及丁酸调控的研究有了很大的进展, 肠道产丁酸菌及其丁酸产生、食物或日粮及宿主健康三者之间的关系将会进一步阐明, 而调控肠道丁酸产量的新型益生菌和化学益生菌将具有良好的应用前景.

### ■同行评价

本文语言流畅,对肠道产丁酸细菌及其丁酸产生机制的研究进展作了综述,思路清晰,能反映研究工作的科学问题和特定内容,文章科学性和可读性较好。

所有已知菌的相似性都低于95%,经进一步研究鉴定认为属于新种*Roseburia intestinalis*。迄今,根据16S rRNA (rDNA)进化树分析,肠道中产丁酸的*Eubacterium*属的菌以及*R. cecicola*, *R. intestinalis*和*F. prausnitzii*种的菌株都属于梭菌聚类(Clostridial clusters),但分散在不同的亚群,其中*R. cecicola*, *R. intestinalis*属于Cluster XIVa,与*E. rectale*最接近,而*F. prausnitzii*与其他产丁酸菌的进化关系稍远,而与多个*Ruminococcus*种相近,属同一个亚群Cluster IV<sup>[1]</sup>。

不同个体中其肠道产丁酸菌在种类和数量分布上存在差异。Barcenilla *et al*<sup>[11]</sup>利用厌氧滚管技术从3个健康人(婴儿,成年素食者和成年杂食者)的新鲜粪样中分离了313株产丁酸菌,发现有74株细菌体外发酵产丁酸量大于2 mmol/L,其中从婴儿粪样中分离到的产丁酸菌产丁酸浓度最高,约有50%的菌株产丁酸量大于10 mmol/L。通过16S rDNA和RFLP分析进一步发现,3种粪样中的主要产丁酸菌种类存在很大差异:婴儿粪样中产丁酸菌种类最多,而素食者次之,杂食者粪样中产丁酸菌种类要明显少于前两者。通过对24株代表性菌株进行全序列测定分析,发现其中10株分别属于*E. rectale*, *E. ramulus*或*R. cecicola*,有部分菌株与*E. ventriosum*或*F. prausnitzii*的全序列相似性大于97%,另有部分为未知菌。Hold *et al*<sup>[12]</sup>利用16S rRNA种特异性探针对10人粪样中产丁酸菌*Eubacterium hallii*, *F. prausnitzii*, *R. intestinalis*和*Coprococcus eutactus*进行流式细胞计数,发现每个人粪样中至少栖息着3种产丁酸菌,即*E. hallii*, *F. prausnitzii*, *R. intestinalis*,分别占整个粪样中细菌总数0.6%, 3.8%, 2.3%,其中*R. intestinalis*和*F. prausnitzii*相关菌株是人粪样中数量最多的产丁酸菌。与人肠道产丁酸菌研究相比,对动物的研究较少。Gong *et al*<sup>[13-14]</sup>利用16S rRNA基因克隆和序列技术研究肉仔鸡肠道微生物菌群结构,在发现肉仔鸡盲肠和回肠中产丁酸菌和乳酸杆菌、真杆菌一起为三大主要菌群的同时,平板计数分析发现产丁酸菌*F. prausnitzii*在盲肠中数量最多,其他肠道部位较少。但是,其他产丁酸菌的种类和数量尚不清楚。

以上研究表明, *F. prausnitzii*和*R. intestinalis*可能是人和动物肠道中优势的产丁酸菌。而且最新研究还表明,这两种菌在体外发酵时可产生大量丁酸,丁酸产量高于10 mmol/L<sup>[8-9]</sup>。因此,这两种产丁酸菌可能对肠道健康起着重要的作用。

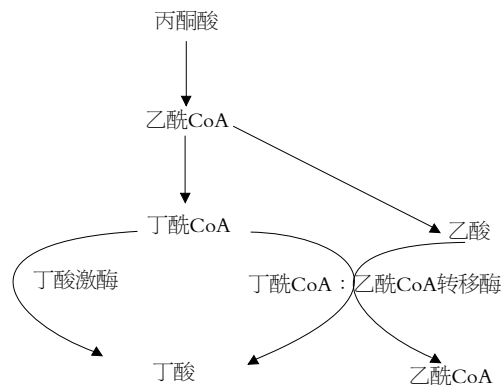


图1 丁酸产生途径(引自Pryde S E, 2002)。

## 2 产丁酸途径

产丁酸菌可通过丙酮酸途径经过丁酰CoA生成丁酸(图1)。一般认为,丁酸激酶作用是生成丁酸的主要途径。但近年来研究表明,丁酰CoA:乙酰CoA转移酶可能是丁酸形成过程中的主要酶。Barcenilla *et al*<sup>[11]</sup>体外培养研究发现,分离自人粪样的74株产丁酸菌中50%需要消耗乙酸产生丁酸,表明他们都是利用丁酰CoA:乙酰CoA转移酶来形成丁酸。

Duncan *et al*<sup>[15-16]</sup>发现来自人粪样的*R. intestinalis*, *F. prausnitzii*和*Coprococcus* sp.,在体外培养时均可产生大量丁酸,其中*R. intestinalis*和*F. prausnitzii*具有丁酰CoA:乙酰CoA转移酶的活性,而无丁酸激酶活性,当以葡萄糖为底物进行体外培养时需要添加乙酸才能产生丁酸,说明这两种菌是纯乙酸利用菌。相反,*Coprococcus* sp.本身能够产生乙酸,在其培养液中能同时检测到丁酰CoA:乙酰CoA转移酶和丁酸激酶的活性。Louis *et al*<sup>[17]</sup>利用对丁酸激酶基因的检测,发现来自不同梭菌亚群(Cluster IV, XIVa和XVI)的38株代表性产丁酸菌中只有4株具有丁酸激酶活性,而酶活分析表明38株菌都有丁酰CoA:乙酰CoA转移酶活性。一般情况下,肠道中乙酸是浓度最高的一种脂肪酸,因此,丁酰CoA:乙酰CoA转移酶可能是肠道中生成丁酸的主要途径。Charrier *et al*<sup>[18]</sup>在结肠细菌*Roseburia* sp.中发现了一种新的CoA转移酶的基因,他与乙酰CoA水解酶和4-羟基丁酰CoA转移酶的序列相似,在大肠杆菌中表达后在乙酸存在时表现出利用丁酰CoA的活性。这种新发现的CoA转移酶可能在结肠丁酸的形成过程中起重要作用。

我们研究发现在仔猪后肠甘露寡糖显著降低乙酸含量,而显著提高丁酸含量;甜菜汁组乙

酸比例随剂量增加而下降, 而丁酸则随之显著上升, 因此可能存在明显的乙酸转化为丁酸的过程.

### 3 对产丁酸的影响

**3.1 肠道乳酸产生菌和利用菌** 结肠中许多细菌包括双歧杆菌和乳杆菌可产生乳酸, 但在正常状态下乳酸不能在健康人肠道中积聚; 相反, 当结肠产生病变如发生结肠炎时, 乳酸却会积聚. 乳酸浓度升高将会影响营养、水的吸收, 改变结肠微生物区系及结肠pH值. 因此维持结肠生态系统中乳酸利用菌和产丁酸菌的平衡对于防止乳酸积累以及稳定结肠代谢有重要作用(图2). Duncan *et al*<sup>[19]</sup>从粪样中分离到9株乳酸利用菌, 他们均能利用乳酸和乙酸产生丁酸, 其中4株经序列鉴定为*E. hallii*, 两株为*Anaerostipes caccae*. *E. hallii*代谢35 mmol/L乳酸可生成25 mmol/L丁酸, 但在葡萄糖存在时其活性受到抑制. 当以淀粉为底物, 乳酸利用菌株与淀粉利用菌双歧杆菌*Bifidobacterium adolescentis*菌株共培养时, 该双歧杆菌产生的所有乳酸全部转化成丁酸. 这种交互作用有助于解释日粮抗性淀粉的产丁酸作用(图2). 体外研究*Bifidobacterium adolescentis*, 乳酸利用菌和产丁酸菌如*E. hallii*, *Anaerostipes caccae*的相互作用时发现, *E. hallii*, *A. caccae*在用淀粉纯培养时不能生长, 但与*B. adolescentis*共生时则可产生丁酸<sup>[20]</sup>. Bourriaud *et al*<sup>[21]</sup>通过体外培养发现人肠道微生物可利用D型和L型乳酸作为前体合成丁酸. Tsukahara *et al*<sup>[22]</sup>利用猪粪研究发现, 葡萄糖酸可刺激丁酸的产生, 并经鉴定发现猪粪中*Megasphaera elsdenii*和*Mitsuokella multiacida*可利用乳酸和乙酸产生丁酸. 因此由乳酸转变为丁酸需要不同细菌的协同作用.

**3.2 发酵底物** 结肠中丁酸的产生与抗小肠消化而进入结肠的底物种类和含量相关. 食物中纤维成分是细菌发酵产丁酸的主要来源, 每天大约消耗80 g纤维残渣生成300-400 mmol短链脂肪酸, 其中60-80 mmol为丁酸<sup>[1]</sup>. Schneider *et al*<sup>[23]</sup>研究发现高纤维含量的食物可使人粪便丁酸浓度提高20%.

结肠内淀粉含量与丁酸产量也有密切的关系. Duncan *et al*<sup>[10]</sup>通过体外发酵发现支链淀粉和菊糖可促进产丁酸菌*Roseburia*菌株的生长, 而果胶和木聚糖则无促增殖作用. 当结肠内抗性淀粉的量增加时, 结肠丁酸浓度增加, 其在短

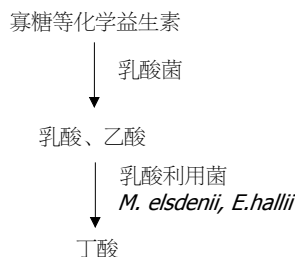


图2 益生菌和化学益生菌促进丁酸产生的作用机制.

链脂肪酸中所占的比例也随之增加. 抗性淀粉在盲肠和结肠中均可被发酵产生丁酸, 而添加麦麸可抑制抗性淀粉在盲肠中的发酵, 从而提高其在结肠的发酵, 使结肠中丁酸浓度显著增加<sup>[24]</sup>.

除抗性淀粉和菊糖外, 许多报道表明, 其他可作为化学益生菌的非降解寡糖如大豆纤维、异麦芽低聚糖、果寡糖、棉子糖和龙胆二糖等可以通过调控肠道微生物区系特别是促进乳酸杆菌和双歧杆菌的增殖从而起到保健作用<sup>[24]</sup>. Weaver *et al*<sup>[25]</sup>报道阿卡波糖是*Actinoplanes*形成的一种寡糖, 他能抑制双糖和淀粉的消化, 人服用后, 粪便中丁酸产量显著增加, 而乙酸和丙酸的产量下降. 而这些肠道有益菌的主要发酵产物通常是乳酸, 因此, 很多化学益生菌可能通过促进产乳酸间接地提高了丁酸的产量(图2). 本实验室在研究外源乳酸菌对仔猪肠道微生物发酵时发现, 仔猪断奶后, 结肠挥发性脂肪酸浓度明显下降, 但外源乳酸菌可促进仔猪结肠丁酸的产生<sup>[26]</sup>. 因此, 用于调控乳酸菌群的益生菌和化学益生菌可能都具有促进产丁酸的功能. pH也是影响丁酸产生的一个重要因素, 在添加混合碳水化合物时通过体外持续厌氧培养人粪样微生物发现, pH 5.5时丁酸浓度(24.9 mmol/L)显著高于pH 6.5时丁酸浓度(13.8 mmol/L), 同时发现低pH条件下产丁酸菌的数量增加<sup>[27]</sup>.

丁酸对肠道健康起重要作用, 产丁酸菌的研究正引起很多研究工作者的兴趣. 近年来随着分子生物学技术的发展, 关于肠道产丁酸菌群组成及丁酸调控的研究有了很大的进展, 肠道产丁酸菌及其丁酸产生、食物或日粮及宿主健康三者之间的关系将会进一步阐明, 而调控肠道丁酸产量的新型益生菌和化学益生菌将具有良好的应用前景.

## 4 参考文献

- 1 Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint



- HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 217: 133-139
- 2 Augenlicht LH, Mariadason JM, Wilson A, Arango D, Yang W, Heerdt BG, Velcich A. Short chain fatty acids and colon cancer. *J Nutr* 2002; 132: 3804S-3808S
- 3 Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 397-403
- 4 胡仁伟, 欧阳钦, 王皓. 丁酸钠对三硝基苯磺酸实验性结肠炎的疗效研究. *四川大学学报(医学版)* 2003; 34: 562-564
- 5 Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101
- 6 Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3202-3207
- 7 Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 341-343
- 8 Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 2141-2146
- 9 Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS, Flint HJ. *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 1615-1620
- 10 Duncan SH, Scott KP, Ramsay AG, Harmsen HJ, Welling GW, Stewart CS, Flint HJ. Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1136-1142
- 11 Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1654-1661
- 12 Hold GL, Schwiertz A, Aminov RI, Blaut M, Flint HJ. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4320-4324
- 13 Gong J, Forster RJ, Yu H, Chambers JR, Sabour PM, Wheatcroft R, Chen S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 208: 1-7
- 14 Gong J, Forster RJ, Yu H, Chambers JR, Wheatcroft R, Sabour PM, Chen S. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 41: 171-179
- 15 Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, Pryde SE, Flint HJ. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5186-5190
- 16 Duncan SH, Holtrop G, Lobley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr* 2004; 91: 915-923
- 17 Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, Flint HJ. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J Bacteriol* 2004; 186: 2099-2106
- 18 Charrier C, Duncan GJ, Reid MD, Rucklidge GJ, Henderson D, Young P, Russell VJ, Aminov RI, Flint HJ, Louis P. A novel class of CoA-transferase involved in short-chain fatty acid metabolism in butyrate-producing human colonic bacteria. *Microbiology* 2006; 152: 179-185
- 19 Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5810-5817
- 20 Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, Flint HJ. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 3593-3599
- 21 Bourriaud C, Robins RJ, Martin L, Kozlowski F, Tenailleau E, Cherbut C, Michel C. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 201-212
- 22 Tsukahara T, Koyama H, Okada M, Ushida K. Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria. *J Nutr* 2002; 132: 2229-2234
- 23 Schneider SM, Girard-Pipau F, Anty R, van der Linde EG, Philipsen-Geerling BJ, Knol J, Filippi J, Arab K, Hebuterne X. Effects of total enteral nutrition supplemented with a multi-fibre mix on faecal short-chain fatty acids and microbiota. *Clin Nutr* 2006; 25: 82-90
- 24 Govers MJ, Gannon NJ, Dunshea FR, Gibson PR, Muir JG. Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. *Gut* 1999; 45: 840-847
- 25 Weaver GA, Tangel CT, Krause JA, Parfitt MM, Jenkins PL, Rader JM, Lewis BA, Miller TL, Wolin MJ. Acarbose enhances human colonic butyrate production. *J Nutr* 1997; 127: 717-723
- 26 苏勇, 姚文, 黄瑞华, 朱伟云. 芽孢乳杆菌S1对断奶前后仔猪肠道乳酸菌、大肠杆菌和挥发性脂肪酸含量变化的影响. *福建农林大学学报(自然科学版)* 2006; 35: 73-76
- 27 Walker AW, Duncan SH, McWilliam Leitch EC, Child MW, Flint HJ. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 3692-3700

# 食管癌术后放疗的临床应用价值

卢绪菁, 王建华

卢绪菁, 王建华, 常州市肿瘤医院放疗科 江苏省常州市 213001

通讯作者: 卢绪菁, 213001, 江苏省常州市怀德南路44号, 常州市肿瘤医院放疗科. luxujing@cscsco.org.cn

电话: 0519-6868305 传真: 0519-6867830

收稿日期: 2006-06-26 接受日期: 2006-07-19

## 摘要

食管癌根治术后局部复发率高达40%-60%, 是导致食管癌患者死亡的主要原因, 自1970年起开始食管癌根治术后预防性放射治疗的研究, 多项回顾性研究认为术后放射治疗延长了食管癌患者的生存期, 但近年来的前瞻性随机对照研究未能确定这一结果, 本文就这一方面的研究进展作一综述.

**关键词:** 食管癌; 术后放射治疗

卢绪菁, 王建华. 食管癌术后放疗的临床应用. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2535-2537

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2535.asp>

## 0 引言

食管癌根治术后多发生局部复发或区域淋巴结转移, 复发率可高达40%-60%, 是影响食管癌患者远期生存的主要因素, 术后进行预防性放射治疗能否降低局部复发, 提高生存率, 目前仍看法不一致, 早期的多项回顾性研究认为术后放射治疗延长了食管癌患者的生存期, 而近年来的前瞻性随机对照研究未能确定这一结果. 本文就这一方面的研究进展作一综述.

## 1 食管癌术后放疗的价值

本文所指术后放疗是指食管癌根治术后预防性放射治疗. Kasai *et al*<sup>[1]</sup>首先报道了食管癌术后放疗的回顾性非随机研究, 认为术后放疗可使5 a生存率由单一手术的21%提高到35%, 并对颈部及纵隔淋巴结转移有预防作用, 能提高生存率, 进一步分层分析显示对手术后尚无淋巴结转移者进行术后放疗有价值, 而对已有淋巴结转移者则不能提高生存率. 此后多项回顾性研究结果均显示术后放疗延长食管癌患者的生存期. 1991年Teniere *et al*<sup>[2]</sup>首次报道了14个

单位联合的随机分组术后放疗研究结果, 术后放疗组102例, 术后3 mo开始放疗, 45-55 Gy/5-6 wk; 对照组单纯手术119例, 随访观察3-9 a, 结果显示, 5 a生存率术后放疗组18.6%, 对照组17.6%, 无论术后淋巴结转移情况如何, 术后放疗均未提高生存率, 仅能提高无淋巴结转移患者的局控率. Fok *et al*<sup>[3]</sup>对130例食管癌术后患者(60例根治性手术, 70例姑息性手术)随机分为术后放疗组和单纯手术组各65例, 术后放疗范围仅照射瘤床, 大分割3.5 Gy/F, 3次/wk, 照射剂量49-52.5 Gy, 结果显示, 术后放疗仅对姑息性术后患者可减低局部复发, 并发症显著高于对照组, 其中5例死于胃出血, 中位生存期分别为术后放疗组8.7 mo、单纯手术组15.2 mo( $P = 0.02$ ), 该研究病例混有贲门癌而且照射方式为大分割. Zieren *et al*<sup>[4]</sup>的随机对照研究也显示了术后放疗不提高总生存率和无复发生存率, 但增加了吻合口狭窄的发生并延长了患者的术后恢复. Yamamoto *et al*<sup>[5]</sup>分析了89例手术治疗的食管癌患者, 其中48例接受术后放疗, 22例接受术后化疗, 另19例未行术后放疗, 化疗方案采用PF方案, 术后放疗照射野包括双侧锁骨上引流区和上纵隔引流区, 脊髓用2 cm铅条遮挡, 照射剂量44-56 Gy, 2 a随访结果显示, 淋巴结阳性者局部控制率在术后放疗组为94%, 术后化疗组为74%, 术后未接受放疗者为40%( $P = 0.006$ ), 术后放疗可降低局部复发.

国内对术后放疗进行了多项研究, 研究结果也不尽一致: 刘明 *et al*<sup>[6]</sup>和朱海文 *et al*<sup>[7]</sup>报道术后放疗能减少复发, 提高生存率; 李云英 *et al*<sup>[8]</sup>报道术后放疗能提高无淋巴结转移患者的局控率和生存率, 但不能提高淋巴结转移患者的生存率, 上述报道为非随机性研究; 1997年梅泽如 *et al*<sup>[9]</sup>报道了105例胸腹食管癌术后放疗的随机研究结果: 术后放疗减少局部失败但未能提高5 a生存率; 2003年Xiao *et al*<sup>[10]</sup>报道了1986-1997的495例食管癌手术治疗的前瞻性随机试验结果, 为目前前瞻性随机试验中病例数最多者, 其中

## ■背景资料

食管癌术后放疗能否降低局部复发率, 提高生存率, 目前尚未形成共识, 关键是缺少多中心、大样本、随机对照研究.

## ■应用要点

本文对食管癌术后放疗的应用价值包括放疗效果、剂量、照射野范围和时机进行了较全面的综述,对今后的研究方向提出新的见解。

275例行单纯手术治疗, 220例接受术后50-60 Gy常规分割放疗, 照射野包括全食管床及双侧锁骨上引流区, 单纯手术组与术后放疗组的5 a总生存率分别为37.1%, 41.3% ( $P = 0.4474$ ), 其中III期患者5 a生存率分别为13.1%, 35.1% ( $P = 0.0027$ ), 术后淋巴结转移者的5 a生存率分别为14.7%, 29.2%, 局部复发率分别为25.0%, 16.2% ( $P = 0.002$ ). 结果说明, 术后预防性放疗可提高III期食管癌根治术后的生存率, 降低局部复发率. 2005年Xiao *et al*<sup>[11]</sup>进一步分析了食管癌术后淋巴结转移数目对预后的影响和术后放疗的结果, 549例食管癌术后患者(单纯手术组275例、术后放疗组274例), 根据术后淋巴结转移数目分为A组(淋巴结转移阴性、269例)、B组(淋巴结转移1-2枚、159例)、C组(淋巴结转移 $\geq 3$ 枚、121例), 结果显示, 相同T3患者A, B, C组的5 a生存率分别为50.6%, 29.3%, 11.7% ( $P = 0.0000$ ); 相同III期患者A组( $T_4N_0M_0$ ), B组( $T_{3-4}N_1M_0$ ), C组( $T_{3-4}N_2M_0$ )的5 a生存率分别为58.1%, 30.6%, 14.4% ( $P = 0.0092$ ); 淋巴结转移患者单纯手术组和术后放疗组的5 a生存率分别为17.6%, 34.1% ( $P = 0.0378$ ), 术后出现胸腔内淋巴结转移及锁骨上淋巴结转移的发生率差别很大(35.9% vs 21.5%, 19.7% vs 4.6%,  $P < 0.012$ ); 淋巴结转移阴性患者单纯手术组和术后放疗组的胸腔内淋巴结转移率分别为27.8%, 13.3% ( $P = 0.006$ ), 进一步说明, 术后放疗可提高淋巴结转移患者的生存率, 并能减低所有食管癌患者的胸腔内及锁骨上复发. 陆进成 *et al*<sup>[12]</sup>对食管癌根治术后预防性放疗随机研究的Meta分析也表明对食管癌根治术后淋巴结阳性患者进行预防性放疗可明显提高5 a生存率.

## 2 食管癌术后放疗的照射范围

食管癌根治术后预防性放射治疗的照射范围包括双侧锁骨上、纵隔, 下胸段食管癌上腹部贲门旁、胃左动脉、腹腔动脉区也包括在照射野内, 照射范围大, 毒性反应损伤明显, 易产生放射性食道炎、放射性胃炎、放射性肺炎、放射性心脏损伤、气管狭窄等并发症, 影响患者的生存质量, 近来这种照射方式受到了挑战.

食管癌淋巴结转移途径与正常的淋巴引流基本上是一致的, 主要是区域性和上下双向性的转移. 首先主要是肿瘤所在部位的食管旁淋巴结, 然后是颈段的颈深淋巴结和锁骨上淋巴结, 当癌细胞侵入到食管黏膜深层至黏膜下的淋巴管内后, 开始上下流动, 离开局部主病灶, 直接随

淋巴管流动转移至远隔淋巴结, 构成跳跃性淋巴结转移. 当癌浸润至食管外膜时, 肿瘤不仅浸润浅部黏膜深层及黏膜下淋巴管, 而且直接浸润至肌层外膜的深部淋巴管, 所以随着远处跳跃性转移的同时, 连续性转移也增加了. 因此区域淋巴结转移是影响食管癌预后的重要因素, 食管癌手术时淋巴结的清扫是根治手术的重要组成部分.

对胸中下段食管癌常有的手术路径是采用左后外开胸加开腹径路, 此手术进路的优点为胸中下段食管暴露好, 对肿瘤的广泛切除和下纵隔、腹腔淋巴结的清扫较满意, 但其缺点主要为上纵隔内及锁骨上区的淋巴结难以清扫, 因此手术后解剖关系已经发生变化: 残胃上提, 原来的贲门旁及胃左淋巴结区已不复存在, 而上纵隔及锁骨上区的淋巴区域有可能成为亚临床病灶侵及区域. 刘明 *et al*<sup>[13]</sup>报道食管癌根治术后纵隔淋巴结转移的部位有一定规律: 发生左、右上纵隔气管旁淋巴结转移发生率最高(64.1%), 应该是术后预防性照射的重点区域. 郑明章 *et al*<sup>[14]</sup>报道食管癌术后淋巴结转移最常见是在锁骨上区和上纵隔, 共占85.2%, 左、右锁骨上淋巴结转移发生率在统计学上无差异; 上纵隔转移最常见于右锁骨头后区, 中纵隔也较常见, 这三个部位占了98.2%, 未显示出不同病变部位术后出现淋巴结转移部位上的差异. 国外学者<sup>[15-17]</sup>的回顾性研究结果亦表明胸中上段食管癌术后复发主要在颈部及纵隔淋巴结并建议进行术后放疗. 因此对胸上、中段食管癌术后放疗的靶区确定为双锁骨上区及上、中纵隔, 但对于原发灶位于胸下段者, 靶区应包括双锁骨上区、纵隔及食管床, 尤其近年来胸段食管癌多采用颈胸腹三野清扫术, 淋巴结清扫比较彻底<sup>[14,18-19]</sup>, 术后照射野相对缩小, 从而使放射反应会大大减轻, 使放疗能按计划顺利完成, 保证了治疗效果. 何健 *et al*<sup>[20]</sup>对86例根治性食管癌术后患者进行小野放疗, 照射范围仅包括瘤床, 野长度一般 $< 15$  cm(术前病变长度2.5-10 cm), 常规分割治疗32.0-72.7 Gy/16-45次/25-54 d, 所有患者均能耐受, 无严重急性反应和后期并发症, 5 a生存率(30.3%), 5 a局控率与大野照射相似(57.4%).

## 3 食管癌术后放疗开始的时间

食管癌术后放射治疗何时开始, 是否越早越好, 对预后影响如何, 目前尚未见随机性研究报道. 蒋月 *et al*<sup>[21]</sup>的回顾性研究表明食管癌根治术后

4-6 wk开始放射治疗生存率明显好于放疗时间<4 wk和>6 wk者, 建议食管癌术后放射治疗开始的时间应在术后4-6 wk为宜, 使得患者有充分的恢复时间; 对术后高危患者缩短术后放射治疗开始的时间是不必要的, 可以通过改变放疗分割方式, 来提高肿瘤局部控制率, 延长生存率。

总之, 食管癌根治术后预防性放射治疗可提高III期食管癌根治术后的生存率, 降低局部复发率, 对于淋巴结转移个数 $\geq 3$ 枚者应结合术后化疗。术后放疗照射靶区应进一步开展研究, 以找出更合适的食管癌术后放疗范围。

#### 4 参考文献

- 1 Kasai M, Mori S, Watanabe T. Follow-up results after resection of thoracic esophageal carcinoma. *World J Surg* 1978; 2: 543-551
- 2 Teniere P, Hay JM, Fingerhut A, Fagniez PL. Postoperative radiation therapy does not increase survival after curative resection for squamous cell carcinoma of the middle and lower esophagus as shown by a multicenter controlled trial. French University Association for Surgical Research. *Surg Gynecol Obstet* 1991; 173: 123-130
- 3 Fok M, Sham JS, Choy D, Cheng SW, Wong J. Postoperative radiotherapy for carcinoma of the esophagus: a prospective, randomized controlled study. *Surgery* 1993; 113: 138-147
- 4 Zieren HU, Muller JM, Jacobi CA, Pichlmaier H, Muller RP, Staar S. Adjuvant postoperative radiation therapy after curative resection of squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus: a prospective randomized study. *World J Surg* 1995; 19: 444-449
- 5 Yamamoto M, Yamashita T, Matsubara T, Kitahara T, Sekiguchi K, Furukawa M, Uki A, Kobayashi M, Tanaka E, Ueda M, Nakajima T. Reevaluation of postoperative radiotherapy for thoracic esophageal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37: 75-78
- 6 刘明, 李任, 王敬一, 万钧, 平育敏. 食管癌根治术后预防性照射的研究. *中华放射肿瘤学杂志* 1994; 3: 268
- 7 朱海文, 陈国雄, 王迎选, 汪力, 曾述闻. 食管癌术后放疗治疗. *中华放射肿瘤学杂志* 1998; 7: 46-48
- 8 李云英, 林祥松, 余志廉, 张乐道, 李建成, 朱坤寿. 食管癌根治术后预防性T型野放射治疗意义的探讨. *中华放射肿瘤学杂志* 1996; 5: 53-54
- 9 梅泽如, 项其昌, 吴维继, 蒋向民, 冯存伟, 穆怀德. 食管癌术后预防性放疗前瞻性研究. *中华放射肿瘤学杂志* 1997; 6: 188-189
- 10 Xiao ZF, Yang ZY, Liang J, Miao YJ, Wang M, Yin WB, Gu XZ, Zhang de C, Zhang RG, Wang LJ. Value of radiotherapy after radical surgery for esophageal carcinoma: a report of 495 patients. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 331-336
- 11 Xiao ZF, Yang ZY, Miao YJ, Wang LH, Yin WB, Gu XZ, Zhang DC, Sun KL, Chen GY, He J. Influence of number of metastatic lymph nodes on survival of curative resected thoracic esophageal cancer patients and value of radiotherapy: report of 549 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 82-90
- 12 陆进成, 钱普东, 查文武, 张宜勤. 食管癌根治术后预防性放射治疗随机研究的Meta分析. *循证医学* 2005; 5: 166-168
- 13 刘明, 李彩英, 周道安, 彭俊杰. 食管癌根治术后纵隔淋巴结转移的特点. *中华放射肿瘤学杂志* 2001; 10: 83-84
- 14 郑明章, 林柏翰, 陈志坚, 林灿峰, 李东升. 食管癌术后放疗靶区的确定. *广东医学* 2004; 25: 301-302
- 15 Lee SJ, Lee KS, Yim YJ, Kim TS, Shim YM, Kim K. Recurrence of squamous cell carcinoma of the oesophagus after curative surgery: rates and patterns on imaging studies correlated with tumour location and pathological stage. *Clin Radiol* 2005; 60: 547-554
- 16 Doki Y, Ishikawa O, Takachi K, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Yamada T, Noura S, Eguchi H, Kabuto T, Imaoka S. Association of the primary tumor location with the site of tumor recurrence after curative resection of thoracic esophageal carcinoma. *World J Surg* 2005; 29: 700-707
- 17 Mariette C, Balon JM, Piessen G, Fabre S, Van Seuning I, Triboulet JP. Pattern of recurrence following complete resection of esophageal carcinoma and factors predictive of recurrent disease. *Cancer* 2003; 97: 1616-1623
- 18 刘祥. 胸段食管癌术后预防性放疗的价值及照射范围的探讨. *实用癌症杂志* 2005; 20: 425-426
- 19 葛红, 蒋月, 刘劲松. 胸段食管鳞癌术后放疗靶区的确定. *临床肿瘤学杂志* 2005; 10: 526-527, 544
- 20 何健, 赵快乐, 曾昭冲, 王凤英. 食管癌局部小野术后放疗的疗效分析. *复旦学报(医学版)* 2002; 29: 390-392
- 21 蒋月, 单娟, 葛红. 食管癌术后放疗治疗开始时间与预后. *中原医刊* 2005; 32: 1-2

#### ■同行评价

本文对食管癌根治性手术切除后的预防性放疗的价值进行了文献综述, 包括放疗效果, 剂量, 照射野和时机, 有一定的学术讨论价值。

电编 李琪 编辑 王晓瑜



# 转化生长因子 $\beta$ 与肿瘤转移的研究进展

俞清翔

## ■背景资料

TGF- $\beta$ 一度被认为对肿瘤细胞的增殖起负调控作用,是最有潜力的癌症治疗的研究热点;但随着研究的深入,人们发现TGF- $\beta$ 在肿瘤的发生、发展中是一把“双刃剑”,在肿瘤进展期能够促进肿瘤侵袭和转移。

俞清翔, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

通讯作者: 俞清翔, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化科. hazeyu@sohu.com

电话: 022-60362810

收稿日期: 2006-06-26 接受日期: 2006-07-31

## 摘要

转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )在肿瘤发生、发展中具有双重作用: 在肿瘤发生的起始阶段TGF- $\beta$ 扮演着肿瘤抑制者的角色, 而在进展期TGF- $\beta$ 起着促使肿瘤细胞浸润转移的作用. TGF- $\beta$ 促进肿瘤浸润和转移的机制有: 诱导肿瘤周围的基质环境改变; 诱导上皮细胞-间充质转化; 促血管新生和抑制宿主免疫系统杀伤肿瘤细胞。

**关键词:** 转化生长因子 $\beta$ ; 肿瘤; 转移

俞清翔. 转化生长因子 $\beta$ 与肿瘤转移的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2538-2541

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2538.asp>

## 0 引言

转化生长因子 $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )是一类功能复杂的细胞因子, 广泛参与哺乳动物的各种病理生理过程. 最初的研究发现, TGF- $\beta$ 抑制上皮细胞和造血细胞的增殖, 促进细胞凋亡. 随后的实验又证明TGF- $\beta$ 对多种上皮性肿瘤细胞(如胃癌、结肠癌、肝癌、肺癌、肾癌及前列腺癌)的体外增殖起负调控作用, 其信号传导通路中任何组分发生突变都将使细胞具有选择性生长优势, 导致肿瘤的发生<sup>[1]</sup>. 因为这种增殖抑制特性, TGF- $\beta$ 一度被认为是最有潜力的癌症治疗的研究热点<sup>[2]</sup>. 但随着研究的深入, 人们发现TGF- $\beta$ 在肿瘤进展期能够促进肿瘤侵袭和转移<sup>[1]</sup>. 因此有学者提出TGF- $\beta$ 在肿瘤的发生、发展中是一把“双刃剑”<sup>[1]</sup>. 本文就TGF- $\beta$ 促进肿瘤浸润和转移方面的研究进展做一综述。

## 1 TGF- $\beta$ 信号传导通路

TGF- $\beta$ 是以大分子无活性的蛋白前体形式由正常细胞和转化细胞分泌的, 需激活后才能发挥

其生物学活性. TGF- $\beta$ 信号从细胞膜传入细胞核, 经历配体-受体-细胞内信号转导分子-基因表达-细胞生长抑制、分化或凋亡组成的信号转导通路. TGF- $\beta$ 受体(TGF- $\beta$  receptors, T $\beta$ R)广泛表达于机体组织细胞表面. 被激活的TGF- $\beta$ 通过与细胞膜表面具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的T $\beta$ R I和T $\beta$ R II结合, 激活受体, 使之具有激酶活性, 将信号放大并磷酸化细胞内受体调控的Smads蛋白(R-Smads, 包括Smads2, 3), 磷酸化的R-Smads与共用介质Smads (Co-Smads, 包括Smads4)形成复合体进入细胞核. 细胞核内Smads寡聚体结合DNA和相关的转录因子调控靶基因的表达. 抑制型Smads可阻断受体磷酸化R-Smads, 启动泛素化作用, 使受体复合物降解, 抑制信号的传导<sup>[3]</sup>.

## 2 TGF- $\beta$ 促进肿瘤浸润和转移

恶性肿瘤之所以成为致命性疾病, 主要是因为肿瘤细胞具有对临近正常组织的浸润和远处转移的能力. 早在1990年代, Gorsch *et al*<sup>[4]</sup>应用原位免疫组化方法研究了57例乳腺癌组织中TGF- $\beta$ 1的表达情况, 结果显示TGF- $\beta$ 1表达水平越高, 癌细胞浸润转移的能力越强, 癌症相关的死亡率越高. 这种联系与患者年龄、肿瘤大小和雌激素受体水平无关. 对结肠癌、肝癌、胃癌、肺癌和前列腺癌的体外和体内研究也得到了类似的结果<sup>[2]</sup>. 同时, 有研究发现阻断TGF- $\beta$ 信号传导通路能够减少肿瘤的转移. Tian *et al*<sup>[5]</sup>运用截短的Smads2/3显负性突变体抑制乳腺肿瘤细胞系的TGF- $\beta$ 信号通路, 结果发现肿瘤细胞的转移能力被抑制. 结肠癌的微卫星不稳定性研究发现, T $\beta$ R II无活性的突变, 使转移减少, 增加了患者术后的存活率, 将T $\beta$ R II基因的cDNA转染到T $\beta$ R表达缺失的大肠癌细胞中, 这些细胞生长率降低, 但强刺激了细胞的浸润和转移能力<sup>[6]</sup>. 最近, Siegel *et al*<sup>[7]</sup>通过对TGF- $\beta$ 在MMTV/neu转基因鼠乳腺癌发生和肺转移中的作用的研究, 发现持续激活TGF- $\beta$ 信号传导能够延长乳腺肿瘤形成的潜伏期, 但同时增加了血管外的肺转移;

相反, T $\beta$ R II 的显负性突变减少了肿瘤形成的潜伏期, 但显著抑制了肺转移. Muraoka *et al*<sup>[8]</sup>在另一项类似的研究中证明TGF- $\beta$ /MMTV-neu双转基因鼠与MMTV-neu单转基因鼠形成肿瘤的潜伏期相近, 但前者的瘤体较小; 然而3 mo后双转基因鼠的肺转移是单转基因鼠的3倍. 这两项研究证明了TGF- $\beta$ 在肿瘤发生、发展中的双重作用: 在肿瘤发生的起始阶段TGF- $\beta$ 扮演着肿瘤抑制者的角色, 而在进展期TGF- $\beta$ 起着促使肿瘤浸润转移的作用.

### 3 机制

恶性肿瘤转移的级联反应涉及到一系列步骤, 包括局部浸润、肿瘤细胞渗入血管、肿瘤细胞在血管和淋巴管内循环、黏附于远处位点、外渗、最终在远处形成新的肿瘤. TGF- $\beta$ 调节这一过程中的多个环节, 如促进有利于浸润转移的基质环境形成、促进血管新生和抑制宿主抗肿瘤免疫反应等.

**3.1 TGF- $\beta$ 诱导肿瘤周围的基质环境改变以促进浸润与转移** 肿瘤细胞必须破坏与其邻近细胞的接触, 穿过基底膜和基质, 才能浸润邻近组织和转移到远处. 因此基底膜的降解和细胞外间质的重塑对于肿瘤浸润和转移而言是至关重要的. 在正常的细胞中, TGF- $\beta$ 上调细胞外间质基因和蛋白酶抑制剂的表达, 而抑制参与间质降解的蛋白酶的产生. 相反, 在乳腺、胰腺和前列腺肿瘤细胞系中, TGF- $\beta$ 促进蛋白酶(如基质金属蛋白酶、尿激酶等)的产生, 水解基底膜, 使肿瘤细胞得以进入结缔组织<sup>[9-10]</sup>. 肿瘤成纤维细胞也参与基质环境的降解和重塑. Ohuchida *et al*<sup>[11]</sup>应用体外侵袭测定的方法研究发现, 胰腺癌细胞与未经辐射处理后的胰腺成纤维细胞共培养可增强癌细胞的侵袭能力, 而将胰腺癌细胞与经辐射处理后的胰腺成纤维细胞共培养后, 癌细胞的侵袭能力更强. 这种现象与癌细胞C-met磷酸化增加、经辐射后胰腺成纤维细胞表达TGF- $\beta$ 1增加有关.

目前, 越来越多的证据显示在癌的发生过程中, 上皮细胞周围的基质会被“激活”, 形成癌相关基质, 然后反过来促进肿瘤的发生与进展<sup>[12]</sup>. 被“激活”的基质最主要的特征是成纤维细胞分化为肌成纤维细胞, 与创伤修复的基质反应相似. 体内外实验均证明TGF- $\beta$ 能够刺激成纤维细胞向肌成纤维细胞的表型转换, 提示我们由癌细胞产生的TGF- $\beta$ 对有促癌作用的基

质环境的形成有关键的作用<sup>[13]</sup>.

**3.2 诱导上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)** EMT是具有极性的上皮细胞转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的细胞的过程, 主要的特征有细胞黏附分子(如E-钙黏蛋白)表达的减少、细胞角蛋白细胞骨架转化为波形蛋白为主的细胞骨架及形态上具有间充质细胞的特征等. 这种表型的转换允许肿瘤细胞摆脱细胞-细胞间连接, 而表现得更具侵袭性<sup>[14]</sup>. 实验证明TGF- $\beta$ 能够诱导培养基中正常细胞和转化细胞形态的改变以及EMT特征的出现<sup>[15]</sup>. Xu *et al*<sup>[16]</sup>研究发现经TGF- $\beta$ 处理的肝癌细胞系SMMC-7721细胞明显变为梭形, 且E-钙黏蛋白表达减少, TGF- $\beta$ 还诱导 $\beta$ -连环蛋白的核转运, 这些都增强细胞移行能力. Han *et al*<sup>[17]</sup>报道TGF- $\beta$ 诱导皮肤鳞癌细胞发生EMT, 形成梭状细胞癌, 而肿瘤细胞的T $\beta$ R II 的显负性突变抑制这种转化, 进一步, 皮肤梭状细胞癌细胞转染显负性T $\beta$ R II 后, 其在体内的致癌性减弱, 且形成鳞癌. 对乳腺癌细胞和成纤维样结肠癌细胞系的研究也得到类似结果. Snail是E-钙黏蛋白基因表达的直接抑制剂, 乳腺浸润导管癌组织中Snail过表达. Peinado *et al*<sup>[18]</sup>发现TGF- $\beta$ 诱导MDCK细胞(犬肾细胞系)Snail表达, 而促使细胞发生EMT. TGF- $\beta$ 还可能经过RhoA和PI-3K途径诱导Akt/PKB激活, 作用于ZO-1, 使细胞形态改变, 细胞间连接变化, 引起细胞的迁移.

**3.3 促血管新生的直接和间接作用** 新生血管的形成对于肿瘤的生长和浸润转移是必不可少的. 血管提供肿瘤细胞需要的营养和氧分; 而肿瘤细胞内渗到循环系统, 导致肿瘤转移. 早期研究显示TGF- $\beta$ 能够使内皮细胞形成管样结构. 条件敲除TGF- $\beta$ 1信号传导途径上组分的研究和对遗传性毛细血管扩张症的研究均证明, TGF- $\beta$ 对正常血管的形成和保证血管完整性的重要作用<sup>[1]</sup>. Hasegawa *et al*<sup>[19]</sup>发现在非小细胞肺癌中TGF- $\beta$ 1的高水平表达与微血管密度增加相关, 二者均提示患者预后差. 而在体内实验中应用TGF- $\beta$ 抗体则可减少新生血管的生成. TGF- $\beta$ 还能诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)的表达间接刺激血管形成<sup>[20]</sup>. 另外TGF- $\beta$ 诱导金属蛋白酶表达, 抑制金属蛋白酶组织抑制剂的产生, 从而形成富含蛋白酶的微环境以利于内皮细胞的迁移.

**3.4 抑制宿主免疫系统杀伤肿瘤细胞** TGF- $\beta$ 是

#### ■创新盘点

本文详细阐述了TGF- $\beta$ 促进肿瘤浸润转移机制: 诱导肿瘤周围的基质环境改变; 诱导上皮细胞-间充质转化; 促血管新生和抑制宿主免疫系统杀伤肿瘤细胞. 加深了读者对TGF- $\beta$ 在肿瘤发生、发展中的双重作用的理解.

## ■应用要点

TGF- $\beta$ 在肿瘤发生、发展中的双重作用可以成为肿瘤预防与治疗的研究方向。

很强的免疫抑制因子,通过抑制宿主免疫系统杀伤肿瘤细胞,促进肿瘤的发生、侵袭和转移。其机制有: TGF- $\beta$ 对白介素2(IL-2)诱导的T淋巴细胞增殖和活化起负调控作用;抑制细胞毒性T淋巴细胞(CTL,包括肿瘤浸润淋巴细胞即TIL细胞)、自然杀伤细胞(NK)和淋巴因子激活杀伤细胞(LAK)的杀伤活性;增加CD8抑制性T细胞的产生;阻止免疫球蛋白的合成;抑制干扰素诱导的MHC II类抗原表达,阻止CTL对肿瘤细胞的识别<sup>[21]</sup>。实验研究也证实了TGF- $\beta$ 在肿瘤逃避免疫监视方面发挥重要作用。早期研究发现一种具有强免疫原性的紫外线诱导的肿瘤细胞系,转染了TGF- $\beta$ 质粒后,无论在体内还是体外均无法刺激CTL的应答。近期有研究显示,向表达T细胞靶向显负性T $\beta$ R II的转基因鼠体内注入高转移性肿瘤细胞,会刺激肿瘤特异性CTL的产生而抑制瘤体的形成<sup>[22]</sup>。同样,将转染表达显负性T $\beta$ R II逆转录病毒的骨髓干细胞移植入小鼠体内后,注入此种小鼠体内的肿瘤细胞生长受到抑制<sup>[23]</sup>。

## 4 展望

在TGF- $\beta$ 被单独分离出来25 a后的今天,对于TGF- $\beta$ 在肿瘤中的角色的研究主要围绕着其在肿瘤发生、发展中具有的双重作用,即癌变早期TGF- $\beta$ 作为抑癌因子出现,而在癌症晚期通过自分泌(作用于癌细胞本身)和旁分泌(作用于癌细胞周围的微环境)方式刺激肿瘤浸润转移。但是这种转换的分子生物学机制尚待进一步研究,这对于TGF- $\beta$ 在肿瘤防治方面的研究是必不可少的。

## 5 参考文献

- 1 Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S44-51
- 2 Akhurst RJ. TGF-beta antagonists: why suppress a tumor suppressor? *J Clin Invest* 2002; 109: 1533-1536
- 3 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
- 4 Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6949-6952
- 5 Tian F, DaCosta Byfield S, Parks WT, Yoo S, Felici A, Tang B, Piek E, Wakefield LM, Roberts AB. Reduction in Smad2/3 signaling enhances tumorigenesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63: 8284-8292
- 6 Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput

- A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 320-324
- 7 Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, Massague J. Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8430-8435
- 8 Muraoka RS, Koh Y, Roebuck LR, Sanders ME, Brantley-Sieders D, Gorska AE, Moses HL, Arteaga CL. Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8691-8703
- 9 Albo D, Berger DH, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin-1 and TGF-beta 1 on pancreatic cancer cell invasion. *J Surg Res* 1998; 76: 86-90
- 10 Farina AR, Coppa A, Tiberio A, Tacconelli A, Turco A, Colletta G, Gulino A, Mackay AR. Transforming growth factor-beta1 enhances the invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity. *Int J Cancer* 1998; 75: 721-730
- 11 Ohuchida K, Mizumoto K, Murakami M, Qian LW, Sato N, Nagai E, Matsumoto K, Nakamura T, Tanaka M. Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 2004; 64: 3215-3222
- 12 De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003; 200: 429-447
- 13 Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004; 45 Suppl 2: S163-175
- 14 Thiery JP, Chopin D. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 31-42
- 15 Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
- 16 Xu Z, Shen MX, Ma DZ, Wang LY, Zha XL. TGF-beta1-promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells. *Cell Res* 2003; 13: 343-350
- 17 Han G, Lu SL, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, Wang XJ. Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 1714-1723
- 18 Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2003; 278: 21113-21123
- 19 Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 964-971
- 20 Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR. Inhibition of transforming growth

- factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res* 2002; 62: 6021-6025
- 21 Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137-161
- 22 Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 2001; 7: 1118-1122
- 23 Shah AH, Tabayoyong WB, Kundu SD, Kim SJ, Van Parijs L, Liu VC, Kwon E, Greenberg NM, Lee C. Suppression of tumor metastasis by blockade of transforming growth factor beta signaling in bone marrow cells through a retroviral-mediated gene therapy in mice. *Cancer Res* 2002; 62: 7135-7138

电编 张敏 编辑 张焕兰

#### ■同行评价

转化生长因子与肿瘤的相互关系的研究已有较多的报道,主要的研究内容为对肿瘤的抑制作用,本综述从另一角度描述了转化生长因子对肿瘤生长的促进作用,有一定的新意,对科研有一定的指导作用。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

#### • 消息 •

## 2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

本刊讯 “2007中华肝胆胰脾外科(国际)论坛”应澳门特区外科学会的盛情邀请于2007-04-13/16在澳门举办,现将征文通知公布如下:

### 1 征文内容

(1)肝癌诊断及外科与综合治疗:新诊断技术-可切除与否的界定-综合治疗与序贯化思路-对复发转移的研究进展-微创技术实际应用的可能性;(2)医源性胆管损伤的预防-胆管下端功能状态对修复及重建的影响-肝胆管结石外科治疗的新经验-肝门胆管癌根治性切除的实施与效果;(3)胰腺炎-重症急性、出血坏死性、“凶险性”-治疗中早期复苏的策略与实施-相关并发症的预防和处理;(4)胰腺癌-早期诊断的思路与进展-根治术在当前的含义和尺度-术前减黄与并发症的处理;(5)脾功能研究进展-保脾和切脾含义和抉择-PH时单纯切脾的指征与价值;(6)肝移植-应用指征的决策-供肝切取与保存-技术性与非技术性并发症-再移植-远期存活的努力。

### 2 投稿要求及截稿日期

来稿请寄未曾公开发表过4000字以内全文及800字论文摘要各1份(无摘要不入汇编)并在信封上注明“会议征文”。截稿日期:2007-01-31。正式代表发论文证书并授一级继续教育学分。来稿请寄:《中华肝胆外科杂志》编辑部。

### 3 联系方式

地址:北京市复兴路28号;邮编:100853;电话:010-66936223;电传:010-68177009;  
E-mail: zhgdwkzz@vip.163.com; 详情请登陆网站: www.zhgdwkzz.net.



# 重症急性胰腺炎时肾损害的研究进展

王国品

## ■背景资料

肾是SAP最常受累的胰外器官之一,文献报道SAP并发肾损害高达53.9%,如进展为急性肾衰(ARF)则病死率高达50%。ARF是SAP独立的死亡危险因素。近年的研究表明,SAP肾损害与SAP时大量产生的细胞因子和炎症介质(IL-1, IL-6, IL-8, PAF, TNF, ET)等引起组织损伤和微循环障碍有关。

王国品,东南大学附属南京江北人民医院消化内科 江苏省南京市 210048

通讯作者: 王国品, 210048, 东南大学附属南京江北人民医院消化内科. yywgp@263.net

电话: 025-86086708

收稿日期: 2006-06-13 接受日期: 2006-06-30

## 摘要

肾是重症急性胰腺炎(SAP)最常受累的胰外器官之一,文献报道SAP并发肾损害高达53.9%,如进展为急性肾衰(ARF)则病死率高达50%。ARF是SAP独立的死亡危险因素。近年的研究表明,SAP肾损害与SAP时大量产生的细胞因子和炎症介质(IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, PAF, TNF, ET)等引起组织损伤和微循环障碍有关。SAP时肾及肾周间隙可出现包括肾周脂肪线等影像学异常,以及明显的肾组织学变化。细胞因子和炎症介质拮抗剂的应用是防治SAP肾损害的新进展。

**关键词:** 胰腺炎; 肾损害; 发病机制; 影像学; 病理组织学; 治疗

王国品. 重症急性胰腺炎时肾损害的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2542-2545

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2542.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)是指急性胰腺炎(AP)伴有其他器官功能不全和(或)局部并发症。胰外器官的损伤甚至功能衰竭主要累及肺、肾、心、肝、脑、胃肠道等;局部并发症包括胰腺坏死、假性囊肿和脓肿。SAP预后凶险,最近文献报告的病死率仍在20%-30%<sup>[1]</sup>,并发肾、肺等胰外器官损害是SAP死亡的主要原因,如并发多器官衰竭,则病死率高达50%。

## 1 SAP时的肾损害

由于局部炎症的侵袭、毒素、胰酶、各种炎症介质和细胞因子的作用,使肾脏成为SAP时最常受累的胰外器官之一。文献报道SAP并发肾损害高达53.9%,并发急性肾衰(ARF)达23%,其病死率高达50%<sup>[2-3]</sup>。Ljutic *et al*<sup>[4]</sup>回顾性分析

了554例AP患者,并发ARF者的病死率达58%,且患者均具有较高的Ranson评分。Kes *et al*<sup>[5]</sup>研究了563例AP患者,14%发生ARF,其中68.4%的ARF发生前已有多器官衰竭,仅8.9%的ARF为首先发生衰竭的器官,ARF与AP的严重程度有关,需要肾替代疗法的ARF患者预后更差,ARF组的病死率达74.7%,而肾功能正常组的病死率仅7.4%。Company *et al*<sup>[6]</sup>的结果显示,SAP时ARF的发生率为35.8%,而死亡组的ARF发生率高达71.4%,存活组仅为19.5%。ARF是AP独立的死亡危险因素,其优势比(odds ratio, OR)为10( $P = 0.009$ ),而呼吸衰竭的OR为7.086( $P = 0.017$ )。

## 2 SAP肾损害的机制

SAP并发肾损害的机制尚未完全明了。肾脏的血供十分丰富,是SAP早期休克最易受累的靶器官。胰腺出血坏死、大量液体渗出、血容量锐减、血压下降,从而导致肾缺血、肾小球滤过率降低,临床出现少尿。另外,胰酶产生的蛋白分解产物,成为肾毒性物质,加重了肾功能障碍。过去,常从以下3个方面来解释SAP的肾损害<sup>[7-8]</sup>: (1)胰源性肾毒性,即胰蛋白酶活性肽释放酶-激肽系统的产物所致; (2)肾内血流动力学失控: Greenstein *et al*<sup>[8]</sup>认为, SAP患者的活性蛋白酶可显著激活肾素-血管紧张素系统,对肾血管系统强烈作用造成肾血管阻力增高,组织形态学的研究已证实, SAP时存在肾微循环障碍,而微循环障碍是导致胰腺炎症进展、出血坏死,以及胰外重要器官损害的病理生理基础<sup>[9]</sup>; (3)高尿酸血症: 当血尿酸增高时,可因尿中尿酸的排量增多而损害肾脏。

实验研究表明, SAP早期即有细胞因子水平的升高和肠道屏障的损害,细胞因子通过损害肠道屏障引起肠源性细菌和内毒素移位;同时,肠源性细菌和内毒素移位又促进细胞因子的大量释放,加重肠黏膜屏障本身的损害,造成恶性循环,引起全身性炎症反应和多器官功能衰竭<sup>[10]</sup>。临床观察发现, AP患者74.6%有内毒素血症,患者血浆内毒素结合蛋白、内毒素受体

水平均升高, 而血浆内毒素抑制物水平却明显降低, 重症患者这一变化更为显著<sup>[11]</sup>. 近年来, 已经认识到SAP时大量产生的细胞因子和炎症介质在SAP肾损害中的重要作用<sup>[12-13]</sup>. SAP早期内毒素血症、细菌易位及其导致的体内单核巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞产生多种细胞因子和炎症介质, 如肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、血小板活化因子(PAF)、白细胞介素1(IL-1)、IL-6、IL-8、IL-10等, 引起全身性炎症反应及肾组织充血、水肿、肾小管上皮细胞坏死脱落. 同时, 内毒素又是内皮素(ET)最强烈的刺激剂, 大量产生的ET使肾动、静脉和直小血管强烈收缩, 是导致SAP肾损害的重要原因.

IL-1对SAP炎症反应具有放大和调节作用; IL-6主要参与脓毒症时机体的急性相反应, 包括发热、白细胞增多、血管通透性增加等, 其水平与AP的严重程度和并发症的发生率呈正相关<sup>[14]</sup>, 新的研究显示IL-6可用于并发症的早期评估<sup>[15]</sup>; IL-8通过其受体促使中性粒细胞黏附于内皮细胞, 对中性粒细胞产生强大的趋化性和激活作用, 产生氧自由基和各种酶类, 造成组织损伤. 尚能破坏血管内皮的完整性, 增加其通透性, SAP有并发症者IL-8水平明显高于无并发症者<sup>[16]</sup>; TNF- $\alpha$ 在SAP发展过程中起重要作用, 他可诱导IL-1 $\beta$ 和IL-6的产生, 并作用内皮细胞使其血栓调节蛋白活性降低, 加重肾缺血和形成血栓, 还能激活炎症细胞和NO与氧自由基释放, 直接造成肾组织损害. 目前已知PAF是SAP发生与发展过程中重要的炎症介质, 且与并发症的发生率和病死率有明显关系. PAF的大量释放及其直接和间接的系统性反应构成了全身性炎症反应综合征, 并造成了循环系统的功能障碍, 从而导致AP特征性的多器官功能衰竭<sup>[17]</sup>. 有实验表明, PAF参与肾和肝细胞的凋亡与坏死, 从而引起肝、肾的组织损伤<sup>[18]</sup>; ET是迄今发现的最强烈的血管收缩因子, 他在血中水平升高, 将强烈地收缩中、小动脉, 尤其是肾动、静脉. 目前, 已知肾小球、肾血管、近曲小管以及系膜细胞上都有高密度ET受体<sup>[19]</sup>, ET与这些受体结合将大大降低肾血流量, 造成肾脏缺血、坏死、功能障碍甚至衰竭. 血栓素A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)是强烈的血小板凝集剂和血管收缩剂, 可造成微循环障碍, 导致胰腺、肾脏缺血、坏死. 在大鼠SAP模型中研究显示, SAP时血浆及肾组织中TXA<sub>2</sub>水平明显增高, 与肾损害的严重程度密切相关, 且可被TXA<sub>2</sub>合成酶抑制剂ozagrel所阻断<sup>[20]</sup>.

SAP肾损害与肾小管细胞凋亡有关. Takase *et al*<sup>[21]</sup>研究发现, 在诱发实验性SAP 6 h后, SAP大鼠肾小管细胞出现凋亡, 将SAP大鼠产生的腹水注射到健康大鼠腹腔, 也导致肾小管细胞的凋亡. 内毒素和TNF- $\alpha$ 均可诱导肾小管细胞凋亡. 细胞凋亡是受基因调控的, *bcl-2*是重要的凋亡抑制基因, 而*bax*则促进细胞凋亡. 实验研究显示, SAP时*bax*在肾小球和肾小管的表达均明显上升, 且随病程延长而逐渐增高, *bcl-2/bax*比值逐渐下降, 细胞凋亡逐渐增加<sup>[22]</sup>. 因此, SAP时可能通过上调*bax*表达并下调*bcl-2*表达引起肾细胞凋亡, 从而导致肾损害.

### 3 SAP肾及肾周间隙的影像学改变

Mortelet *et al*<sup>[23]</sup>用螺旋CT研究了SAP患者肾及肾周的受累情况, 影像学的异常包括肾周脂肪线(stranding of perirenal fat)、肾周液体积聚、输尿管受侵、肾静脉血栓形成、肾实质异常等. 肾周脂肪线即肾周脂肪内明显衰减的线形或曲线形结构, 37例出现肾周脂肪线的患者中26例为双侧肾周受累. 肾周脂肪线的出现与胰腺炎严重程度相关<sup>[23]</sup>. 根据胰腺炎的严重程度(轻、中、重), 肾周脂肪线出现率在右侧分别为8.5%, 32.9%, 61.2%, 左侧分别为10.2%, 42.7%, 72.3%. 肾周和被膜下液体积聚在右侧分别为1.7%, 6.1%, 5.6%, 左侧分别为0, 6.1%, 11.1%. 肾血管异常包括肾静脉狭窄、肾周静脉曲张、肾静脉血栓形成. 由于弥漫炎症性病变对肾动脉形成的压力, 肾实质出现不对称强化. 肾集合系统异常主要见于大囊肿压迫致远端输尿管不全梗阻或近端输尿管被肾周囊肿包绕.

### 4 SAP肾损害的组织学改变

大体标本: 动物实验发现SAP大鼠肾明显充血、水肿, 伴有散在出血点<sup>[24]</sup>. 光镜检查: 肾小管细胞肿胀, 部分坏死, 肾小管内有大量管型形成. 从病变时间观察, SAP大鼠在术后24 h, 肾小管上皮水肿, 肾间质炎细胞浸润; 术后48 h可见肾小管上皮细胞肿胀、部分坏死, 肾小管内有大量管型形成. 电镜观察: 肾近曲小管线粒体肿胀、内嵴不清及空泡化, 次级溶酶体增多, 内质网扩张, 腔面大部分微绒毛因脱落而减少, 排列紊乱<sup>[25]</sup>. 进一步的研究发现, 在胰腺炎造模术后12 h肾脏肿胀, 表明点状出血; 术后48 h整个肾脏体积增大, 呈暗紫色. 光镜观察: 6 h肾小球未见明显改变, 肾近曲小管上皮细胞普遍呈明显

### ■创新盘点

关于SAP肾损害的研究资料不多. 本文较详细地阐述了SAP时肾损害的机制、肾及肾周影像学变化、病理组织学改变并指出SAP肾损害的防治重点是改善肾微循环、清除和抑制炎症介质和细胞因子.

### ■应用要点

本文对SAP肾损害的研究特别是SAP肾损害的防治研究有一定的指导意义,高渗盐水、生长抑素、炎症介质、细胞因子拮抗剂和清胰汤与大承气汤等中药汤剂对SAP肾损害有较好的防治作用。

的水样变性,胞质疏松,染色变浅,部分肾小管上皮细胞坏死、脱落,阻塞管腔;术后12 h,肾近曲小管上皮细胞变性、坏死、核固缩,胞质红染,部分肾小管管腔内可见蛋白管型;术后24 h,肾小球严重淤血,肾小管内充填红细胞管型,滤过膜受损。电镜观察:术后3和6 h可见肾小球毛细血管腔内血小板聚集、变形,伸出伪足,部分足细胞的足突局部融合;6 h还可见肾间质血管明显扩张充血,管腔内堵满红细胞及变形的血小板;12 h可见肾小球毛细血管腔内红细胞淤积,血小板变形圆化,伸出伪足,并黏附于血管内皮细胞,基底膜不均匀增厚;24 h可见肾小球毛细血管腔内更多的血小板聚集,此外还可见纤维素析出,基底膜局部增厚,间质血管内可见新鲜血栓形成<sup>[26]</sup>。

### 5 SAP肾损害的治疗

SAP时应积极防治肾损害的发生,避免使用一切可能引起肾实质损害的药物。临床上早期积极扩容是预防肾功能衰竭的重要措施之一。纠正水、电解质失衡,试用血管扩张剂,在补足血容量的前提下使用利尿剂等。高渗盐水可提高血容量、改善微循环和血液动力学、减轻血管内皮细胞肿胀、减少组织器官淤血水肿。Oreopoulos *et al*<sup>[27]</sup>的研究表明,高渗盐水能通过抑制巨噬细胞来调节促炎因子和抗炎因子之间的平衡,减轻SAP时的全身性炎症反应。一旦进展到肾功能衰竭,则血液净化是其主要的治疗手段,包括血液透析、腹膜透析、连续性动静脉血液滤过(CRRT)等,CRRT通透性和吸附能力强,可持续滤过和吸附各种中大分子的细胞因子和炎症介质,如TNF- $\alpha$ 、IL-1,心肌坏死因子、前列腺素、血栓素等。新近报道高容量的CRRT清除TNF- $\alpha$ 的作用强,能更有效的清除血液中的细胞因子和炎症介质<sup>[28]</sup>。

SAP并发器官功能障碍及死亡与早期的全身性炎症反应有关<sup>[29]</sup>,近年来,已经发现使用细胞因子和炎症介质的抑制剂治疗,能减轻胰腺病变的严重程度,降低并发症的发生率和病死率。如用抗TNF- $\alpha$ 抗体实施阻断能降低TNF- $\alpha$ 水平,减轻胰腺病变和胰腺炎的严重程度,降低实验动物的死亡率。临床与实验研究均显示,PAF的拮抗剂能明显降低SAP的全身性炎症反应以及SAP患者器官功能不全的发生率和病死率<sup>[30-31]</sup>。动物实验研究证实,ET受体拮抗剂能显著改善SAP大鼠的微循环、稳定毛细血管渗透

性、改善肾功能<sup>[32-33]</sup>。SAP时早期应用生长抑素有预防肾损害的作用,生长抑素治疗后SAP早期的内毒素、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等水平明显减低,肾间质和肾小球出血水肿等病理变化减轻<sup>[24]</sup>。生长抑素和生长激素能明显降低SAP炎症介质的过度释放,减轻全身性炎症反应,抑制肾组织的炎症反应,对SAP肾损害有重要保护作用<sup>[34]</sup>;并能减少并发症,提高生存率<sup>[35]</sup>。

中药对SAP及其胰外器官损害有较好的防治作用。有文献报道生大黄在治疗急性胰腺炎时能抑制PAF, TNF- $\alpha$ , IL等多种细胞因子,并能抑制肠道的细菌易位<sup>[36]</sup>。清胰汤能促进肠道内毒素的排泄,减轻内毒素血症,抑制内毒素对全身器官、组织的损伤<sup>[37]</sup>。大承气汤和活血清胰汤具有通理攻下、活血化淤和清热解毒作用,能抑制胰酶活性和PAF的释放,减少有毒物质吸收,促进肠道功能恢复,改善器官微循环,对实验性SAP的胰外器官有保护作用<sup>[38]</sup>。

### 6 参考文献

- 1 Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-S39
- 2 Pitchumoni CS, Agarwal N, Jain NK. Systemic complications of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 597-606
- 3 葛海燕, 王敖川. 急性重症胰腺炎并发症的防治. *普外临床* 1994; 9: 295-297
- 4 Ljetic D, Piplovic-Vukovic T, Raos V, Andrews P. Acute renal failure as a complication of acute pancreatitis. *Ren Fail* 1996; 18: 629-633
- 5 Kes P, Vucicevic Z, Ratkovic-Gusic I, Fotivic A. Acute renal failure complicating severe acute pancreatitis. *Ren Fail* 1996; 18: 621-628
- 6 Company L, Saez J, Martinez J, Aparicio JR, Laveda R, Grino P, Perez-Mateo M. Factors predicting mortality in severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2003; 3: 144-148
- 7 Marshall JB. Acute pancreatitis. A review with an emphasis on new developments. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1185-1198
- 8 Greenstein RJ, Krakoff LR, Felton K. Activation of the renin system in acute pancreatitis. *Am J Med* 1987; 82: 401-404
- 9 Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 130-138
- 10 王代宏, 张训臣. 重症急性胰腺炎时细胞因子与肠源性细菌和内毒素移位的实验研究. *中国医师杂志* 2004; 6: 1051-1054
- 11 段美丽, 张淑文, 王宝恩. 急性胰腺炎患者并发MODS的机制探讨. *中华急诊医学杂志* 2005; 14: 222-224
- 12 Brady MS, Eckels DD, Lee F, Ree SY, Lee JS. Cytokine production by CD4+ T-cells responding to

- antigen presentation by melanoma cells. *Melanoma Res* 1999; 9: 173-180
- 13 Raraty MG, Neoptolemos JP. Compartments that cause the real damage in severe acute pancreatitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 141-142
- 14 Norman JG, Fink G, Franz M, Guffey J, Carter G, Davison B, Sexton C, Glaccum M. Active interleukin-1 receptor required for maximal progression of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1996; 223: 163-169
- 15 Stimac D, Fistic E, Milic S, Bilic-Zulle L, Peric R. Prognostic values of IL-6, IL-8, and IL-10 in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 209-212
- 16 McKay C, Imrie CW, Baxter JN. Mononuclear phagocyte activation and acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 219: 32-36
- 17 Johnson CD. Platelet-activating factor and platelet-activating factor antagonists in acute pancreatitis. *Dig Surg* 1999; 16: 93-101
- 18 Andersson R, Wang X, Sun Z, Deng X, Soltesz V, Ihse I. Effect of a platelet-activating factor antagonist on pancreatitis-associated gut barrier dysfunction in rats. *Pancreas* 1998; 17: 107-119
- 19 王希倩. 内皮素与肾间质纤维化. 国外医学泌尿系统分册 2005; 25: 123-126
- 20 张彦荣, 李清怀. 血栓素A<sub>2</sub>、前列环素对重症急性胰腺炎并发肾损害的影响. 河北医科大学学报 2005; 26: 94-96
- 21 Takase K, Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y, Yamamoto M, Kuroda Y. Apoptotic cell death of renal tubules in experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 1999; 125: 411-420
- 22 朱明德, 方弛华, 史学深. 重症胰腺炎肾脏损伤中细胞凋亡相关基因的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2103-2107
- 23 Morteale KJ, Mergo PJ, Taylor HM, Ernst MD, Ros PR. Renal and perirenal space involvement in acute pancreatitis: spiral CT findings. *Abdom Imaging* 2000; 25: 272-278
- 24 殷保兵, 蔡端, 张群华, 张延龄, 侯兰娣. 急性坏死性胰腺炎肾损伤的机制及早期生长抑素治疗后的影响. 肝胆胰外科杂志 1999; 11: 74-76
- 25 倪泉兴, 张群华, 蔡端, 向阳, 侯兰娣, 张延龄. 急性坏死性胰腺炎对心肾损伤的影响. 中华实验外科杂志 1999; 16: 212-213
- 26 王云帆, 李海燕, 王民, 陈瑞芬. 大鼠急性出血坏死性胰腺炎时肾损害的超微结构研究. 电子显微学报 2005; 24: 524-528
- 27 Oreopoulos GD, Bradwell S, Lu Z, Fan J, Khadaroo R, Marshall JC, Li YH, Rotstein OD. Synergistic induction of IL-10 by hypertonic saline solution and lipopolysaccharides in murine peritoneal macrophages. *Surgery* 2001; 130: 157-165
- 28 李振江, 徐月清, 王汉民, 陈威. HV-CRRT对胰腺炎合并急性肾衰患者血中TNF- $\alpha$ 的影响. 细胞与分子免疫学杂志 2003; 19: 373-375
- 29 Mofidi R, Duff MD, Wigmore SJ, Madhavan KK, Garden OJ, Parks RW. Association between early systemic inflammatory response, severity of multi-organ dysfunction and death in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006; 93: 738-744
- 30 Lane JS, Todd KE, Gloor B, Chandler CF, Kau AW, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001; 99: 365-370
- 31 Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P, Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD. Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut* 2001; 48: 62-69
- 32 Forgacs B, Eibl G, Faulhaber J, Kahrau S, Buhr H, Foitzik T. Effect of fluid resuscitation with and without endothelin A receptor blockade on hemoconcentration and organ function in experimental pancreatitis. *Eur Surg Res* 2000; 32: 162-168
- 33 Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 2000; 128: 399-407
- 34 蔡端, 殷保兵, 张群华, 张延龄, 侯兰娣. 生长抑素和生长激素对急性坏死性胰腺炎肾损伤的保护作用. 肝胆胰外科杂志 1999; 11: 188-190
- 35 Wang S, Wu Q, Hu S, Xu J, Sun L, Song Y, Lu F. Surgical treatment of 52 patients with congenital coronary artery fistulas. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 752-755
- 36 杨正安, 陆宏伟. 大黄对重症急性胰腺炎的治疗价值研究. 中国急救医学 2001; 21: 717-717
- 37 兑丹华, 彭慈军, 高占峰, 李永渝. 清胰汤对香猪重症急性胰腺炎并发内毒素血症的防治研究. 遵义医学院学报 2004; 27: 343-346
- 38 韩恩昆, 吴咸中. 重型急性胰腺炎大鼠胰外器官损伤与大承气汤和活血清胰汤的保护作用. 中国中西医结合外科杂志 2004; 10: 185-188

## ■同行评价

SAP肾损害的研究不多, 本文题目明确, 内容合理, 条理清楚, 对指导SAP肾损害的研究有一定价值和意义。

电编 李琪 编辑 潘伯荣



## PGE<sub>2</sub>对胃癌MKN28细胞VEGF表达的影响

肖炜明, 施瑞华, 丁岩冰, 吴健, 童建东, 严志刚

### ■背景资料

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率居我国恶性肿瘤之首, 5 a存活率很低。因此寻找一种新的、有效的胃癌化学预防、治疗方案成为令人瞩目的课题。近年来COX-2及其产物PGE<sub>2</sub>在促肿瘤血管生成方面的作用受到研究者的关注。

肖炜明, 施瑞华, 南京医科大学附属第一医院消化科 江苏省南京市 210029

肖炜明, 丁岩冰, 吴健, 童建东, 严志刚, 扬州大学第二临床医学院 江苏省扬州市 225001

江苏省卫生厅135工程重点人才基金, No. RC2002053

通讯作者: 施瑞华, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化科, ruihuashi@126.com

电话: 025-83674636

收稿日期: 2006-07-10 接受日期: 2006-07-31

### Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on expression of vascular endothelial growth factor in human gastric cancer cell line MKN28

Wei-Ming Xiao, Rui-Hua Shi, Yan-Bing Ding, Jian Wu, Jian-Dong Tong, Zhi-Gang Yan

Wei-Ming Xiao, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Wei-Ming Xiao, Yan-Bing Ding, Jian Wu, Jian-Dong Tong, Zhi-Gang Yan, the Second Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Supported by the Key Talent Fund from '135' Project of Health Department of Jiangsu Province, No. RC2002053

Correspondence to: Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2006-07-10 Accepted: 2006-07-31

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human gastric cell line MKN28 *in vitro*, and identify whether exogenous prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) can increase the expression of VEGF.

**METHODS:** Human gastric cell line MKN28 was culture *in vitro* and then treated with 0.1, 1, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> for 3 h. Real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot were used to detect the expression of VEGF mRNA and protein, respectively.

**RESULTS:** The transcription of VEGF mRNA increased in a dose-dependent manner after PGE<sub>2</sub> treatment, and the difference between the

groups of 0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> treatment and the control group had statistical significances ( $0.67 \pm 0.093$ ,  $0.74 \pm 0.13$ ,  $0.87 \pm 0.07$ ,  $1.49 \pm 0.15$  vs  $0.42 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). PGE<sub>2</sub> also up-regulated the expression of VEGF protein in a dose-dependent manner, and except 0.1  $\mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> treatment group, the difference between the groups of 1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> treatment and the control group had statistical significances ( $51.02 \pm 2.16$ ,  $66.69 \pm 9.85$ ,  $136.49 \pm 6.89$  vs  $26.87 \pm 3.98$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** PGE<sub>2</sub> can promote VEGF mRNA transcription and protein expression in human gastric cancer cell line MKN28.

**Key Words:** Exogenous prostaglandin E<sub>2</sub>; Vascular endothelial growth factor; mRNA Transcription; Protein expression

Xiao WM, Shi RH, Ding YB, Wu J, Tong JD, Yan ZG. Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on expression of vascular endothelial growth factor in human gastric cancer cell line MKN28. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2546-2550

### 摘要

**目的:** 观察前列腺素E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)对胃癌MKN28细胞血管内皮生长因子(VEGF) mRNA转录、蛋白表达水平的影响。

**方法:** 对胃癌MKN28细胞分别给予0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$ 浓度的PGE<sub>2</sub>处理3 h, 分别以实时PCR, Western blot检测VEGF mRNA转录水平及VEGF蛋白表达水平的变化。

**结果:** 胃癌MKN28细胞经用不同浓度的PGE<sub>2</sub>作用3 h, VEGF mRNA表达呈剂量依赖性增加, 其表达在PGE<sub>2</sub>浓度为0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$ 时与对照组之间的差异均有统计学意义( $0.67 \pm 0.093$ ,  $0.74 \pm 0.13$ ,  $0.87 \pm 0.07$ ,  $1.49 \pm 0.15$  vs  $0.42 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。VEGF蛋白表达量与PGE<sub>2</sub>浓度存在正相关, 其表达在PGE<sub>2</sub>浓度为1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组之间的差异均有统计学意义( $51.02 \pm 2.16$ ,  $66.69 \pm 9.85$ ,  $136.49 \pm 6.89$  vs  $26.87 \pm 3.98$ ,  $P < 0.05$ 或

$P < 0.01$ ).

**结论:** 外源性PGE<sub>2</sub>可显著增加胃癌MKN28细胞VEGF的表达.

**关键词:** 前列腺素E<sub>2</sub>; 血管内皮生长因子; mRNA转录; 蛋白表达

肖炜明, 施瑞华, 丁岩冰, 吴健, 童建东, 严志刚. PGE<sub>2</sub>对胃癌MKN28细胞VEGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2546-2550  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2546.asp>

## 0 引言

环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)是一种诱导酶, 在细胞受到各种刺激时, 如组织损伤、炎症或细胞恶性转化时表达增强. 近年来大量的研究已表明, COX-2与胃癌的发生和进展高度相关. COX-2促进恶性肿瘤发生的主要作用机制之一是通过其重要产物前列腺素E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 而实现的, PGE<sub>2</sub>能够增加癌细胞与基质的黏附, 促进黏附分子表达, 激活细胞骨架系统, 促进新生血管形成并进而促进肿瘤浸润和转移<sup>[1-2]</sup>. 研究还表明PGE<sub>2</sub>可上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等血管生成因子的表达, 进而参与肿瘤的新生血管生成<sup>[3-4]</sup>. 我们探讨不同浓度的外源性的PGE<sub>2</sub>对胃癌MKN28细胞VEGF mRNA和VEGF蛋白的表达的影响, 以进一步阐明COX-2在胃癌发生、发展中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM-F12培养基(GIBCO), 胎牛血清(Life Technologies), TRIzol Reagent RNA抽提试剂盒(Invitrogen公司), RNase抑制剂(Promega公司), RNA Master SYBR Green I kit (Roche公司), DEPC (Promega公司), 荧光定量PCR仪(Roche公司), DNA Marker (DL2000) (TaKaRa公司), 丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺、SDS、 $\beta$ -巯基乙醇(Sigma公司, 北京夏斯生物技术公司分装), 牛血清白蛋白(Sigma公司), PGE<sub>2</sub> (Calbiochem公司),  $\beta$ -actin多抗(Santa Cruz公司), VEGF多抗、羊抗兔二抗(Santa Cruz公司), 其他试剂为进口分装或国产分析纯.

**1.2 方法** 将MKN28胃癌细胞株(上海瑞金医院消化科惠赠)在DMEM-F12培养基(含100 mL/L胎牛血清, 青霉素100 kU/L, 链霉素100 kU/L, 无菌状态下抽滤)中37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿

度培养. MKN28胃癌细胞株依PGE<sub>2</sub>浓度分成不同的处理组, PGE<sub>2</sub>作用浓度分别为0.1  $\mu$ mol/L, 1  $\mu$ mol/L, 5  $\mu$ mol/L, 10  $\mu$ mol/L, 作用3 h后收集细胞分别进行Real-Time PCR, Western blot检测. 不加PGE<sub>2</sub>处理的设为对照组.

**1.2.1 VEGF mRNA的测定** 收集细胞, 加入1 mL TRIzol试剂提取总RNA, 用紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 并用12 g/L甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总RNA的完整性. 取总RNA (500 mg/L) 1  $\mu$ L在Lightcycler仪器上进行Real-Time PCR, 反应程序: 61℃逆转录20 min, 95℃预变性2 min, 然后进入循环: 95℃变性5 s, 58℃退火5 min, 72℃延伸13 s, 30个循环. 逐渐降温至30℃. 在每个循环末80℃时进行实时荧光检测. 应用Primer Premier 5.0和Oligo 6设计PCR扩增引物. VEGF引物为: 5'-CCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACC-3'和5'-GAAGCTCATCTCTCCTATGTGCTGGC-3'; 设内参照GAPDH的引物为: 5'-CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3'和5'-TCACGCCACAGTTTCCCGGA-3'. 取扩增产物在15 g/L琼脂糖凝胶上电泳, 然后在High Performance Ultraviolet Transilluminator (UVP) 凝胶成像系统上扫描, 并分析结果. 采用瑞士Roche公司的定量分析系统进行相对定量, 用GAPDH的Ct值与VEGF基因Ct值的比值代表该基因在每份样本中的相对含量.

**1.2.2 Western blot检测VEGF的蛋白的表达** 收集细胞, 细胞裂解液裂解细胞, 制备总蛋白, 使最终上样总蛋白为40  $\mu$ g, 进行100 g/L SDS-PAGE蛋白电泳(100 V恒压电泳2-2.5 h), 电泳完毕后以湿转移的方法(288 mA, 88 min)将分离的蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上. 将转膜后的胶用考马斯亮蓝染液37℃染色并观察转膜效率. 使用50 g/L脱脂牛奶37℃封闭孵育1 h, 加入1:200稀释的VEGF多抗, 4℃摇动下过夜, 洗膜, 加入含1:2000稀释的过氧化物酶联二抗, 37℃摇动孵育2 h, 洗膜, 用ECL化学发光法显影. 以小鼠抗人 $\beta$ -actin抗体作为一抗进行Western blot检测, 作为判断结果的内参照. 显影之后根据Western blot彩色标准电泳指示条带(marker)中的位置, 分析所测电泳条带的性质. 电泳条带经Image J软件处理, 进行各实验组条带与对照组条带面积灰度值分析, 目的条带与内参照条带的比值代表目的蛋白的表达水平.

**统计学处理** 应用SPSS 10.0软件包分析处理, 数据用以mean $\pm$ SD表示, 两组数据比较采用

## ■ 研发前沿

COX-2, PGE<sub>2</sub>在肿瘤血管生成作用机制的研究成了肿瘤研究领域一个热点. VEGF是肿瘤血管形成的关键驱动因子, 和肿瘤的发生、发展密切相关. COX-2诱导肿瘤血管生成的机制之一可能是通过其催化合成的PGE<sub>2</sub>上调VEGF等血管生成因子有关.

## ■创新盘点

本研究以胃癌MKN28细胞株作为研究对象,首次证实PGE<sub>2</sub>对胃癌细胞VEGF mRNA转录、蛋白表达水平的影响,国内尚缺乏这方面的报道。

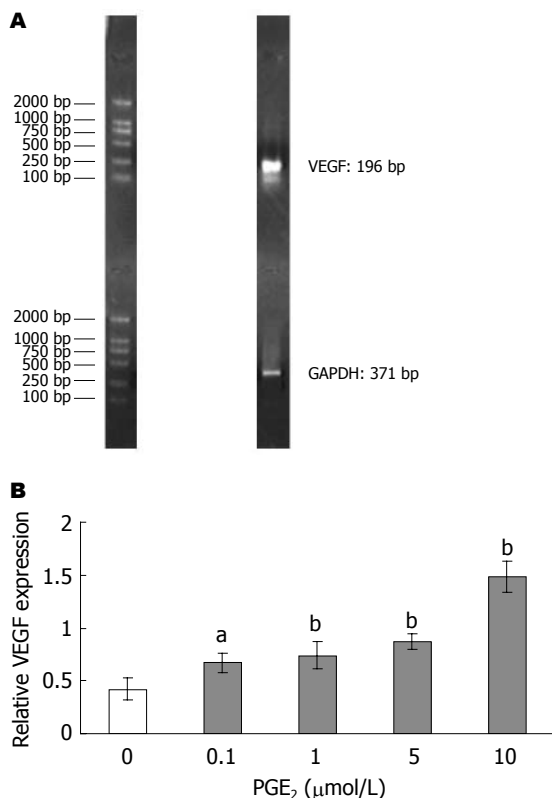


图1 不同浓度的PGE<sub>2</sub>作用MKN28细胞的Real-Time PCR结果。A: 电泳图; B: PGE<sub>2</sub>呈剂量依赖性促进VEGF mRNA的转录。<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组。

*t*检验。*P*<0.05有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Real-Time PCR结果** Real-Time PCR扩增产物的电泳结果显示: VEGF片段长度在100-250 bp之间, GAPDH片段长度在250-500 bp之间, 符合设计的长度(图1A)。经PGE<sub>2</sub>作用3 h, VEGF mRNA目的条带灰度随PGE<sub>2</sub>浓度的增高而逐渐增强。用内参照条带与目的基因条带的比值进行分析, 结果显示VEGF mRNA的表达在PGE<sub>2</sub>浓度为0.1 μmol/L, 1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L处理组与对照组之间的差异均有统计学意义(0.67±0.093 vs 0.42±0.10, *P*<0.05; 0.74±0.13, 0.87±0.07, 1.49±0.15 vs 0.42±0.10, *P*<0.01), 说明经PGE<sub>2</sub>作用3 h, VEGF mRNA表达呈剂量依赖性增加, PGE<sub>2</sub>在转录水平影响VEGF的表达(图1B)。

**2.2 Western blot结果** 胃癌MKN28细胞中可检测到较弱的VEGF蛋白水平表达, 经PGE<sub>2</sub>作用3 h, VEGF蛋白条带灰度逐渐增强, 用目的条带与内参照条带的比值代表目的蛋白的表达水平进行分析, 结果显示VEGF蛋白表达量与PGE<sub>2</sub>浓度存在正相关(图2)。VEGF蛋白表达在PGE<sub>2</sub>浓度为

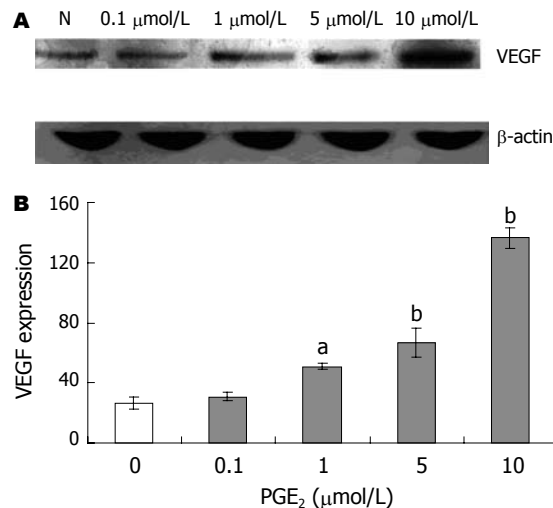


图2 不同浓度的PGE<sub>2</sub>作用MKN28细胞的Western blot检测。A: Western blot结果; B: PGE<sub>2</sub>呈剂量依赖性促进VEGF蛋白的表达。<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组。

1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L组与对照组之间的差异均有统计学意义(51.02±2.16 vs 26.87±3.98 *P*<0.05; 66.69±9.85, 136.49±6.89 vs 26.87±3.98, *P*<0.01), PGE<sub>2</sub>浓度为0.1 μmol/L时, VEGF蛋白表达量也增加, 但无统计学意义。

## 3 讨论

胃癌在我国是高发的恶性肿瘤之一, 其死亡率在所有恶性肿瘤中居第一位, 严重危害人民身体健康。近年来通过对COX-2在胃癌组织中表达的检测以及流行病学、细胞学实验、动物学实验等大量的研究已证实, COX-2与胃癌的发生和进展高度相关, COX-2在胃癌中呈高表达, 而且其表达水平和淋巴结转移、肿瘤分期存在高度的相关性<sup>[5]</sup>。已有的研究结果提示COX-2催化合成的前列腺素(PG)如前列腺素E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)有促进癌症发生、发展的作用<sup>[4,6]</sup>, 同时COX-2抑制剂通过减少PG的生成而具有防治胃癌、结肠癌等实体瘤的作用<sup>[7-8]</sup>, 但确切机制不详。近年来研究观察到PGE<sub>2</sub>具有促进肿瘤血管生成的作用, 而COX-2抑制剂可抑制肿瘤血管的生成<sup>[9]</sup>, 因而对PGE<sub>2</sub>在肿瘤血管生成中作用机制的研究成了肿瘤研究领域一个热点<sup>[10]</sup>。在癌症发生、发展的各个阶段均有血管新生过程。癌细胞来源的生长因子通过旁分泌途径刺激局部内皮细胞增殖形成血管芽, 并向分泌这些生长因子的部位(肿瘤)生长<sup>[11]</sup>。肿瘤组织内的新生血管越丰富, 肿瘤细胞生长越快、越容易发生血行转移。因此, 新生血管的形成在肿瘤的发生、发展过程中起着极其重要的作用。目前常采用微血管密

度(microvessel density, MVD)来定量评估肿瘤的新生血管. 不少研究发现, 随着肿瘤MVD的增加, 肿瘤侵袭转移等恶性潜能也明显增加<sup>[12-13]</sup>. 启动肿瘤血管新生的因子众多, 目前已知的血管生成促进因子包括VEGF、血小板源生长因子、转化生长因子、表皮细胞生长因子等. 其中VEGF是第1个确定性状特点的血管特异生长因子, 是最重要的血管形成促进因子, 在创伤和大多数肿瘤(包括实体瘤和血液系统瘤)的生长过程中高度表达, 为肿瘤细胞的生长和新生血管网的建立提供营养, 并与肿瘤的转移、预后相关<sup>[14]</sup>.

在胃癌的发生、发展过程中, 同样涉及到肿瘤新生血管的形成, 并与患者的预后密切相关. 研究<sup>[15-17]</sup>发现在胃癌组织中COX-2的表达、PGE<sub>2</sub>的含量和MVD存在高度的相关性, COX-2表达与VEGF表达也显著相关, COX-2与VEGF-C表达水平并与淋巴结转移相关. 我们认为COX-2促肿瘤血管形成可能是通过PGE<sub>2</sub>促进胃癌组织VEGF等相关基因表达来实现的. PGE<sub>2</sub>可刺激实体肿瘤中新生血管的产生, 从而促进肿瘤生长, 增加肿瘤转移的机率. 研究者在细胞水平上已证明PGE<sub>2</sub>可促进小鼠巨噬细胞和结肠癌细胞的VEGF表达增加<sup>[18-19]</sup>. Huang *et al*<sup>[20]</sup>也证实, COX-2质粒转染可增加HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )及VEGF在胃癌AGS细胞株中表达, 从而增加胃癌细胞向远处转移的机率, 选择性COX-2抑制剂NS398可以通过抑制COX-2酶活性, 减少PGE<sub>2</sub>产生而抑制这一过程. 本项研究检测了人胃癌MKN28细胞VEGF mRNA转录、蛋白表达的水平以及PGE<sub>2</sub>对胃癌MKN28细胞VEGF表达的影响. 研究结果显示, PGE<sub>2</sub>可正向调节胃癌MKN28细胞VEGF mRNA转录水平及VEGF蛋白表达. Real-Time PCR结果显示, 随PGE<sub>2</sub>作用浓度的增加, VEGF mRNA转录水平也明显增加. Western blot实验结果进一步显示, PGE<sub>2</sub>作用后, VEGF蛋白表达水平明显增加, 且蛋白表达水平与PGE<sub>2</sub>浓度呈正相关. 提示PGE<sub>2</sub>可以通过增加VEGF表达, 促进肿瘤新生血管的生成, 进一步增加肿瘤转移的机率.

由此可见, 在肿瘤的转移和侵袭过程中, COX-2/PGE<sub>2</sub>增加肿瘤细胞中的VEGF表达是其中重要的一环. COX-2/PGE<sub>2</sub>可通过增加VEGF表达, 增加实体肿瘤中MVD, 扩大肿瘤组织的营养来源, 给肿瘤细胞提供充足的营养条件, 进而促进肿瘤细胞增殖; 高表达的VEGF还可刺激局

部血管或淋巴管增殖, 增加肿瘤细胞转移的机率. 这可能是COX-2诱导肿瘤血管生成的机制之一, 提示COX-2抑制剂可抑制VEGF表达和肿瘤血管生成, 这为临床应用COX-2抑制剂抗胃癌血管生成提供了理论依据.

#### 4 参考文献

- 1 Dohadwala M, Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem* 2002; 277: 50828-50833
- 2 Han C, Wu T. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes human cholangiocarcinoma cell growth and invasion through EP1 receptor-mediated activation of the epidermal growth factor receptor and Akt. *J Biol Chem* 2005; 280: 24053-24063
- 3 Leung WK, To KF, Go MY, Chan KK, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 23: 1317-1322
- 4 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 135-138
- 5 Murata H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sawaoka H, Kimura Y, Shiozaki H, Hori M. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 451-455
- 6 Takafuji VA, Evans A, Lynch KR, Roche JK. PGE(2) receptors and synthesis in human gastric mucosa: perturbation in cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 71-81
- 7 Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1322-1327
- 8 Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994; 121: 241-246
- 9 Yao M, Zhou W, Sangha S, Albert A, Chang AJ, Liu TC, Wolfe MM. Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1618-1628
- 10 Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 96-102
- 11 Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410
- 12 Rasila KK, Burger RA, Smith H, Lee FC, Verschraegen C. Angiogenesis in gynecological oncology-mechanism of tumor progression and therapeutic targets. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 710-726
- 13 Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprosthetic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005; 46: 481-489
- 14 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and

#### ■应用要点

本文提示PGE<sub>2</sub>可以通过增加VEGF表达, 促进肿瘤新生血管的生成, 进一步增加肿瘤转移的机率. 这可能是COX-2诱导肿瘤血管生成的机制之一, 为临床应用COX-2抑制剂抗胃癌血管生成提供了理论依据.



## ■同行评价

本课题以胃癌细胞株为研究对象, 研究前列腺素E<sub>2</sub>对其VEGF转录及表达的影响, 实验设计合理, 方法学可靠, 结果显示前列腺素E<sub>2</sub>能增加VEGF转录及表达水平, 且与剂量正相关, 对于进一步阐明COX在胃癌发生、发展中的作用具有一定意义。

- other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257
- 15 Yu HG, Li JY, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F. Increased abundance of cyclooxygenase-2 correlates with vascular endothelial growth factor-A abundance and tumor angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 195: 43-51
- 16 Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 28-33
- 17 Zhang J, Ji J, Yuan F, Zhu L, Yan C, Yu YY, Liu BY, Zhu ZG, Lin YZ. Cyclooxygenase-2 expression is associated with VEGF-C and lymph node metastases in gastric cancer patients. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 2: S285-288
- 18 Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003; 63: 2330-2334
- 19 Mukutmoni M, Hubbard NE, Erickson KL. Prostaglandin E(2) modulation of vascular endothelial growth factor production in murine macrophages. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001; 65: 123-131
- 20 Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Hsieh CY, Kuo ML, Lin JT. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* 2005; 12: 229-241

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

## 中国中西医结合学会第九次全国中西医结合 影像学术交流大会

**本刊讯** 兹定于2007-05-10/14, 在泰安市泰山饭店召开中国中西医结合学会影像专业委员会第九次学术会议暨全国中西医结合影像诊断与研究学习班。欢迎相关领域研究人员、医师与会交流经验。现将有关征文事项通知如下:

### 1 征文内容及类别

大会征集内容包括: (1)中西医结合影像学的基础与临床应用研究; (2)影像学(包括X线、CT、MRI、USG及核素等)的临床应用; (3)介入技术的临床应用; (4)其他传统医学, 如针灸等方面的影像学及有关信息的交流; (5)影像学最新进展介绍及有关信息的发布。文章内容可涉及: 有创新意义的实验研究、临床论著、综述、技术交流、经验介绍及临床病例报告、短篇、个案等。

### 2 征文要求

来稿请寄3000字左右全文及300字左右摘要各一份, 统一用A4纸打印并附3.5寸Word文档软盘(发E-mail者可交软盘)。软盘文件名或E-mail的主题请注明“中西医结合影像学学术会议征文”; 来稿必须附单位介绍信, 注明论文作者署名无争议、不涉及保密、无一稿多投。已在全国公开发行的刊物上发表的论文不再采用; 稿件请自留底稿, 概不退稿。

### 3 联系方式及截止日期

山东省济南市文化西路42号《中国中西医结合影像学杂志》编辑部。邮编: 250011; 电话: 0531-82950414-6689; E-mail: yxbjb@163.com; ljb@sdzydfy.com。2006-12-30截止收稿, 以当地邮戳为准。

### 4 其他

大会同期将举办国家级继续教育项目: 中国中西医结合影像学诊断与研究学习班。届时将邀请国内知名专家前来讲学, 并授予国家级继续教育学分。

# 逆转录病毒介导双靶区反义RNA在转基因小鼠肝细胞中的表达及对HBV DNA复制的影响

张政, 席宏丽, 公维波, 李文刚, 于敏, 曾争, 徐小元

张政, 席宏丽, 公维波, 李文刚, 于敏, 曾争, 徐小元, 北京大学第一医院感染科 北京市 100034  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271182  
通讯作者: 徐小元, 100034, 北京市大红罗厂街8号, 北京大学第一医院感染科. yangpin@public3.bta.net.cn  
电话: 010-66551122-2311  
收稿日期: 2006-06-10 接受日期: 2006-07-10

## Retrovirus-mediated expression of dual-target antisense RNA in liver cells of transgenic mice and its influence on replication of hepatitis B virus

Zheng Zhang, Hong-Li Xi, Wei-Bo Gong, Wen-Gang Li, Min Yu, Zheng Zeng, Xiao-Yuan Xu

Zheng Zhang, Hong-Li Xi, Wei-Bo Gong, Wen-Gang Li, Min Yu, Zheng Zeng, Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271182

Correspondence to: Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China. yangpin@public3.bta.net.cn

Received: 2006-06-10 Accepted: 2006-07-10

## Abstract

**AIM:** To detect the expression of X and P region dual-target antisense RNA of hepatitis B virus (HBV) mediated by retroviral vector in the liver cells of transgenic mice and its effect on the replication of HBV DNA.

**METHODS:** The recombinant retroviral vector plasmids expressing dual-target antisense RNA complementary to HBV X and P region were constructed and then injected into the transgenic mice. The experimental mice were divided into blank, pLXSN, pLXSN-asX, pLXSN-asP, pLXSN-asXP, and pLXSN-seXP group. The total RNA, extracted from the mice at the 8<sup>th</sup> wk, was reversely transcribed, and then the cDNA was amplified with polymerase chain reaction (PCR). Thereafter, agarose gel electrophoresis, sequencing analysis and fluorescent PCR were

performed. The replication of HBV DNA was tested by fluorescence quantitative PCR.

**RESULTS:** The HBV dual-target antisense RNA was expressed in the liver cells of mice and with high efficiency. After 8 wk, the replications of HBV DNA ( $\times 10^5$  copies/g) were  $7.24 \pm 1.62$ ,  $9.49 \pm 3.34$ ,  $2.60 \pm 1.13$ ,  $2.83 \pm 1.67$ ,  $3.24 \pm 0.45$ ,  $6.52 \pm 1.53$  in blank, pLXSN, pLXSN-asX, pLXSN-asP, pLXSN-asXP and pLXSN-seXP group. The levels of HBV DNA were significantly higher in single- or dual-target antisense RNA groups than those in other groups ( $P < 0.05$ ). However, there were no marked differences between control groups as well as between single-target and dual-target group ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The hepatitis B virus dual-target antisense RNA can be expressed in the liver cells of transgenic mice with high efficiency, and it can inhibit the replication of HBV DNA in mice liver. However, there is no significant difference between single-target and dual-target RNA.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Dual-target antisense RNA; Transgenic mice; HBV DNA

Zhang Z, Xi HL, Gong WB, Li WG, Yu M, Zeng Z, Xu XY. Retrovirus-mediated expression of dual-target antisense RNA in liver cells of transgenic mice and its influence on replication of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2551-2555

## 摘要

**目的:** 探讨逆转录病毒介导的乙型肝炎病毒(HBV) X、P单、双靶区的反义RNA在乙型肝炎转基因小鼠肝细胞中HBV复制的影响。

**方法:** 构建表达HBV X、P双靶区正、反义RNA的重组载体质粒, 与脂质体混合, 注入小鼠体内, 第8周时取小鼠肝脏, 提取肝组织总RNA, 进行逆转录, 将逆转录后的cDNA用PCR扩增, 琼脂凝胶电泳和DNA测序定性, 荧光聚合酶链反应定量; 提取肝组织基因组DNA, 利用荧光聚合酶链反应定量测定HBV

## ■背景资料

反义RNA技术已被证明是研究、治疗病毒感染性疾病、遗传性疾病、肿瘤等多种疾病的行之有效的手段之一。可针对在疾病发生、发展过程中发挥重要作用的生长因子、受体、关键酶、原癌基因、抑癌基因或凋亡相关基因, 通过反义RNA技术特异性地进行结合, 封闭或调节其功能及产物表达, 从而达到治疗目的。近年来, 体外研究及动物实验显示该方法具有较大的临床应用前景。而且HBV是一种高变异病毒, 故容易产生耐药现象, 如果能增加反义RNA的结合位点有可能对耐药株起到抑制作用。

## ■研究前沿

反义技术作为分子生物学的新型抗基因技术,目前不仅广泛应用于生理学、病理学、药理学的基础研究,而且已成为药物发展的新兴策略。在反义RNA基础上发展的RNAi是目前研究的热点。目前亟待解决的问题一是没有一种满意的乙肝动物模型,另外就是缺乏特异性的肝脏导向药物。

DNA含量。

**结果:** 经过PCR扩增,琼脂凝胶电泳和DNA测序定性,荧光聚合酶链反应定量等方法检测到小鼠肝脏内反义RNA得到高效表达;8 wk后,对HBV DNA ( $\times 10^5$  copies/g)的作用:与对照组相比( $7.24 \pm 1.62$ ),空质粒组( $9.49 \pm 3.34$ )及正义RNA组( $6.52 \pm 1.53$ )之间无明显差异,单( $2.60 \pm 1.13$ ,  $2.83 \pm 1.67$ )、双靶区反义RNA组( $3.24 \pm 0.45$ )与对照组之间有明显差异( $P < 0.05$ ),但单、双靶区反义RNA组间无明显差异( $P > 0.05$ )。

**结论:** 将脂质体包裹逆转录病毒载体(质粒)介导的单、双靶区乙肝病毒反义RNA经iv导入转基因小鼠细胞的方法可行;反义RNA对乙型肝炎病毒转基因小鼠有显著抗HBV复制作用;对转基因小鼠肝脏中HBV DNA的复制有明显的抑制作用,但单、双靶区反义RNA组间无明显差异。

**关键词:** 乙型肝炎病毒;反义RNA;转基因小鼠;HBV DNA

张政, 席宏丽, 公维波, 李文刚, 于敏, 曾争, 徐小元. 逆转录病毒介导双靶区反义RNA在转基因小鼠肝细胞中的表达及对HBV DNA复制的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2551-2555  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2551.asp>

## 0 引言

乙型肝炎(HB)是严重危害我国人民身体健康的传染病,近年来发展起来的基因技术为治疗HB提供了新途径<sup>[1-2]</sup>。反义RNA是1980年代初发现的一种自然调控基因,他是一类能与特异mRNA互补的小分子RNA,通过其对mRNA的调控影响相应基因的表达与复制<sup>[3]</sup>,从而达到基因治疗的目的。体外研究表明,反义RNA在细胞水平上具有明显的抗HBV复制和表达作用<sup>[1-2,4]</sup>。但HBV是高变异性病毒,多靶位反义RNA可能会取得更高的抑制效率,有研究表明,双靶区反义RNA在体外有抗HBV的作用,并且证明双靶区反义RNA较单靶区反义RNA抑制HBV复制的作用更强<sup>[5]</sup>,我们通过构建对HBV X、P区双靶区反义RNA逆转录病毒载体,与脂质体混合,并将其注入HBV转基因小鼠,利用脂质体的组织靶向性,将逆转录病毒载体导入肝细胞,研究反义RNA在转基因小鼠肝细胞中的表达,通过检测小鼠肝细胞中HBV DNA含量来研究反义RNA对转基因小鼠肝细胞内HBV复制的抑制作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 单、双靶区逆转录病毒载体质粒由本室构建<sup>[6]</sup>,分别合成互补于HBV (ayw亚型)X区核苷酸1400-1430 nt的X片段以及互补于HBV P区核苷酸2375-2405 nt的P片段的单靶区,以及X、P区正、反义双靶区载体质粒;转基因鼠购自广州空军医院<sup>[7]</sup>,血清HBsAg(+),HBV DNA(+),48只(体质量18-20 g),雌雄各半;脂质体购自北京晶美公司;TRNzol试剂盒购自Invitrogen公司;AMV, RNA酶抑制剂、Taq酶、Buffer液、DNTPS等购自北京赛百胜公司;PCR仪、PCR荧光定量仪为ABI5700型;SYBR Green荧光染料购于北京天来生物医学科技公司;引物序列由北京赛百胜合成;DNA测序由北京奥科公司完成;HBV DNA定量检测试剂盒购自广州达安基因有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组逆转录病毒载体的构建**<sup>[6]</sup> 据HBV (ayw)基因序列,合成互补于HBV (ayw亚型)X区核苷酸1400-1430 nt的X片段以及互补于HBV P区核苷酸2375-2405 nt的P片段, X片段两端分别含有Spe I 和BamH I 酶切位点。P片段两端分别含有Ava II 和Bcl I 酶切位点。逆转录病毒载体pLXSN用相同的限制性内切酶酶切后,琼脂糖凝胶电泳分离,低熔点胶回收纯化大片段。将X片段或P片段与载体片段按3:1摩尔浓度比混匀,分别正向、反向插入质粒的相应酶切位点。将连接物转化感受态JM109细菌,铺于LB平板,氨苄青霉素筛选,37℃过夜,挑取菌落,扩增后提取质粒,经限制性内切酶分析筛选出正、反向插入的重组质粒。将表达X区和P区反义RNA重组载体质粒分别命名为pLXSN-asX, pLXSN-asP。将表达X区和P区正义RNA重组载体质粒分别命名为pLXSN-seX, pLXSN-seP。将pLXSN-asX和pLXSN-seX用Ava II 和Bcl I 酶切后正向、反向插入P片段构建双靶区重组载体质粒。将X、P双靶区反义RNA和正义RNA重组载体质粒分别命名为pLXSN-asXP和pLXSN-seXP。

**1.2.2 脂质体包裹逆转录病毒载体(质粒)的制备**<sup>[8]</sup> 脂质体(20 mmol/L)与50 g/L的葡萄糖按2:3的比例混匀。将等体积的质粒(1 kg/L)迅速加入上述溶液,充分混匀,室温下反应1 h后应用,即脂质体-质粒混合物。

**1.2.3 转染乙型肝炎转基因鼠**<sup>[8]</sup> 将48只转基因鼠随机分为6组,每组8只(最后存活44只)。第1组为blank组(注射50 g/L的葡萄糖的空白对照),第

2-6组分别为pLXSN(空白载体对照)、pLXSN-asX(反义单靶区X组)、pLXSN-asP(反义单靶区P组)、pLXSN-asXP(反义双靶区XP组)、pLXSN-seXP(正义双靶区XP组)。分别在1, 3, 5 d经尾静脉给每只小鼠注射相应的脂质体-质粒混合物200  $\mu$ L, 空白对照注射50 g/L葡萄糖200  $\mu$ L。于第8周取小鼠肝脏冷藏后备检。

**1.2.4 组织RNA的提取** 取各小鼠部分肝组织称质量后, 按照TRIzol说明书进行准备和操作。

**1.2.5 RNA的逆转录** 根据逆转录病毒载体的目的基因片段碱基顺序利用Primer 5软件设计引物(引物序列见1.2.6)。取10  $\mu$ g RNA, 将RNA、引物(各组均取上游引物)、AMV、RNA酶抑制剂、dNTP、Buffer液加入一个反应体系中, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 94 $^{\circ}$ C 5 min终止反应。

**1.2.6 cDNA的PCR扩增** 由于质粒pLXSN-asX和pLXSN-asP插入片段分别只有30 bp, 故设计引物一端与插入片段互补, 一端与载体互补; 质粒pLXSN-asXP和pLXSN-seXP引物一端与X片段互补, 一端与P片段互补。引物序列: pLXSN-asX组: sense: 5'CTGTACTAGTACGTAAACAAA GGA3', antisense: 5'GCGGGACTATGGTTGCTGAC3'; pLXSN-asP组: sense: 5'CGAGGGAGTTCTTCTTCTGA3', antisense: 5'TCTGTTGTGCCAGTCATAG3'; pLXSN-asXP组: sense: 5'CTAGTACGTAAACAAAGGAC3', antisense: 5'CAGAAGAAGAACTCCCTC3'; pLXSN-seXP组: sense: 5'CTGCGTCTGTACTAGTTGCG3', antisense: 5'GAGGCGAGGGAGTTCTTCTT3'。条件: pLXSN-asX组: 94 $^{\circ}$ C 60 s, 60 $^{\circ}$ C 80 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s共35循环; pLXSN-asP组: 94 $^{\circ}$ C 60 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s共35循环; pLXSN-asXP组: 94 $^{\circ}$ C 60 s, 52 $^{\circ}$ C 75 s, 72 $^{\circ}$ C 75 s共35循环; pLXSN-seXP组: 60 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s共35循环, 然后进行琼脂凝胶电泳及测序检测。

**1.2.7 荧光PCR定量分析** 按照SYBR荧光定量试剂盒说明书严格操作。

**1.2.8 肝组织HBV DNA的检测** 每只小鼠各取部分肝组织称质量后研磨, 提取基因组DNA, 各取0.5  $\mu$ g基因组DNA, 依照HBV核酸扩增荧光定量检测试剂盒使用说明进行操作, 定量检测HBV DNA含量。

**1.2.9 血清HBV DNA的检测** 血清HBV DNA依照HBV核酸扩增荧光定量检测试剂盒使用说明进行检测, 结果以拷贝数/L表示。

**统计学处理** 引物设计软件: Primer 5; 统计

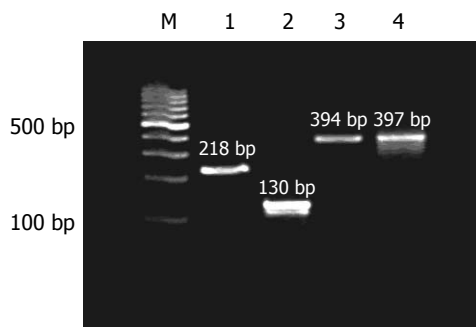


图1 扩增产物的琼脂凝胶电泳分析。1: pLXSN-asX组; 2: pLXSN-asP组; 3: pLXSN-asXP组; 4: pLXSN-seXP组; Blank组和pLXSN组均未能扩增出条带。

表1 正、反义RNA在肝细胞中的表达(拷贝/g)

pLXSN-asX ( $\times 10^8$ )	pLXSN-asP ( $\times 10^8$ )	pLXSN-asXP ( $\times 10^8$ )	pLXSN-seXP ( $\times 10^6$ )
4.53	2.29	4.55	1.18
4.57	1.56	2.10	0.61
5.69	6.65	9.63	2.49
4.64	5.65	5.08	1.23
4.27	0.67	2.96	2.92
3.97	0.89	3.29	5.04
4.73	6.32	---	1.36
4.60	5.37	---	1.19
平均 $4.63 \pm 0.49$	$3.68 \pm 2.56$	$4.60 \pm 2.69$	$2.00 \pm 1.44$

软件: SPSS 11.5, 方法为单因素方差分析。

## 2 结果

扩增产物经琼脂凝胶电泳分析与理论预计值相符(pLXSN-asX组, pLXSN-asP组, pLXSN-asXP组, pLXSN-seXP组分别应扩增出218 bp, 130 bp, 394 bp, 397 bp条带(图1)。经北京奥科公司测序鉴定核苷酸测序结果基本正确; PCR定量分析结果见表1。经过检测pLXSN-asX组平均每克肝组织可检测到 $4.63 \times 10^8$ 拷贝反义RNA; pLXSN-asP组可检测到 $3.68 \times 10^8$ 拷贝反义RNA; pLXSN-asXP组可检测到 $4.60 \times 10^8$ 拷贝反义RNA; pLXSN-seXP组可检测到 $2.0 \times 10^6$ 拷贝正义RNA。说明各组RNA在肝组织中均得到了表达。然后分别检测了肝组织及血清中HBV DNA的含量(浓度), 用来检测反义RNA对小鼠HBV复制的影响(表2, 表3)。

## 3 讨论

反义RNA导入细胞后, 可以与其相应的mRNA结合, 阻断其表达, 从而达到抑制病毒复制的作

## ■ 相关报道

吴赤红 *et al* 曾将表达HBV X区和P区正、反义RNA的重组体分别转染PA317细胞, 获取含逆转录病毒颗粒的细胞上清, 感染2.2.15细胞。结果表明, 表达HBV X区和P区反义RNA的重组载体质粒转染包装细胞后形成稳定表达的克隆, 并能够释放约 $10^8$  CFU/L感染滴度的假病毒颗粒。针对HBV X、P区的单靶区反义RNA对HBsAg, HBeAg均有明显的抑制作用, 且抑制作用相近; 而二者联合表达则有协同作用, 双靶区反义RNA对HBV的抑制作用显著提高, 并对细胞无毒副作用。赵尉 *et al* 检测了反义RNA对转基因小鼠肝组织中HBV标志物及血清中HBV DNA的影响, 认为双靶区反义RNA比单靶区反义RNA抑制HBV DNA的复制作用更强。



## ■应用要点

本文的实验再次验证了反义RNA对HBV的复制有抑制作用,为今后反义药物的开发及进一步研究提供参考.

表 2 反义RNA对转基因鼠肝细胞HBV DNA复制的影响( $\times 10^5$ 拷贝/g)

	blank	pLXSN	pLXSN-asX	pLXSN-asP	pLXSN-asXP	pLXSN-seXP
	10.40	8.44	2.44	2.41	3.29	6.60
	6.33	6.04	1.94	2.97	3.27	5.44
	6.10	11.50	1.70	1.09	2.68	6.67
	5.53	10.70	3.03	3.97	3.11	10.14
	6.73	14.40	1.38	1.40	4.04	6.10
	8.60	5.85	2.90	1.66	3.03	5.55
	7.92	---	2.36	6.24	---	5.94
	6.31	---	5.03	2.87	---	5.68
平均	7.24 $\pm$ 1.62	9.49 $\pm$ 3.34	2.60 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>	2.83 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	3.24 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	6.52 $\pm$ 1.53

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs blank组、pLXSN组和pLXSN-seXP组.

表 3 反义RNA对转基因鼠血清HBV DNA浓度的影响( $\times 10^3$ 拷贝/L)

	blank	pLXSN	pLXSN-asX	pLXSN-asP	pLXSN-asXP	pLXSN-seXP
	10.10	0.92	6.40	1.30	0.96	8.60
	11.00	7.20	1.00	3.10	1.00	9.80
	2.00	15.00	0.93	3.20	1.00	0.91
	5.10	10.00	1.20	3.20	0.87	2.60
	1.97	21.00	0.76	1.00	1.10	3.30
	1.68	31.00	6.50	0.96	2.90	6.80
	6.80	---	1.10	1.15	---	1.40
	8.60	---	5.20	3.50	---	1.10
平均	5.91 $\pm$ 3.80	9.54 $\pm$ 7.52	2.89 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>	2.04 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	1.31 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	4.31 $\pm$ 3.57

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs blank组、pLXSN组和pLXSN-seXP组.

用, 我们可以通过检测血液及肝细胞中HBV的抗原标志物或HBV DNA来判断他的作用, 但是他能否起作用的前提是反义RNA是否被导入细胞内并得到表达. 季伟 *et al*<sup>[9]</sup>曾观察到利用逆转录病毒载体包装细胞系统能够介导HBV反义基因在真核细胞中表达. 本实验利用脂质体包裹逆转录病毒载体靶向导入肝细胞, 通过提取总RNA, 进行逆转录, 再利用PCR扩增, 琼脂凝胶电泳, 核苷酸测序的方法检测目的基因片段, 并利用荧光定量PCR的方法来检测其表达的数量. 结果表明, 反义RNA在转基因小鼠肝组织中得到正确表达, 每克肝组织中可检测到反义RNA约 $2.0 \times 10^6$ ~ $4.6 \times 10^8$ 拷贝. Goodarzi *et al*<sup>[10]</sup>合成了一系列的互补于HBV Pre-S及S基因的反义RNA片段, 把反义HBV RNA经不同途径注射小鼠, 系统地研究了反义HBV RNA在机体内的分布、稳定性及毒性等问题, 结果发现, 无论何种注射途径, 在注射后10-30 min内反义RNA在肝脏的浓度最高, 达1.3%-2%注射总量. 我们在

8 wk后仍能检测到反义RNA的表达, 说明反义RNA在转基因小鼠体内得到了持续表达.

HBV虽是一种DNA病毒, 但其复制存在逆转录过程, 其先形成3.5 kb前基因组RNA, 以此作为DNA复制的模板. 同时作为HBsAg、HBeAg、HBcAg、PreS1、PreS2、DNA多聚酶、HBxAg的翻译模板. 而在转录过程中存在2.4, 2.1, 0.7 kb的RNA均可以成为反义RNA的重要结合靶链. 由于HBV DNA多聚酶缺乏校对作用, 在复制过程中易产生变异株而导致对药物治疗敏感降低或耐药现象, 因此需要研究作用于HBV位点较多的药物或疗法. 我室曾构建了表达互补于HBV (ayw亚型)的X区(1400-1430 nt)的X片段, 互补于HBV P区(2375-2405 nt)片段的正义、反义RNA的单、双靶区重组载体质粒并转染PA317细胞, 并观察到细胞内HBV反义RNA有明显抗HBV复制和表达的作用, 而且双靶区反义RNA抗HBV的作用较单靶区反义RNA更明显<sup>[5]</sup>. 我们在上述实验的基

础上, 将单、双靶区反义RNA iv转基因小鼠体内, 观察对转基因小鼠肝组织内HBV DNA复制的影响。

反义RNA体内抗HBV的研究报道还并不多, Robaczewska *et al*<sup>[11]</sup>在北京鸭乙肝模型上(DHBV), 通过iv的方法, 将靶向于DHBV大包膜蛋白起始编码区的反义RNA (O-ODN-AS2)和包裹有PFI的反义RNA (PEI/O-ODN-AS2)分别转入, 流式仪分析表明, PFI/O-ODN-AS2的表达效率比O-ODN-AS2高出3倍, 且治疗9 d后肝脏组织中的DHBV DNA和RNA水平都明显降低, 而在相同抑制程度下其所需剂量比O-ODN-AS2, PEI/O-ODN-AS2对照组都要少。Ma *et al*<sup>[12]</sup>设计了以HBV PreS2基因的3203-3240 nt核苷酸为靶位点的反义RNA, 以HCC组织特异性反义RNA表达载体(AFP为启动子, 结合GF7-PL和HA20-PL的四元件复合体)包装, 经共培养和尾静脉注射分别转入HepG2.2.15细胞系和裸鼠体内, 结果发现, 该反义RNA可抑制细胞上清中HBsAg, HBeAg的表达分别达33.4%和58.5%。本实验通过检测小鼠肝细胞中HBV DNA含量表明, 与对照组相比, 空质粒组及正义RNA组之间无明显差异, 单、双靶区反义RNA组与对照组有明显差异, 说明反义RNA对转基因小鼠肝脏中HBV DNA的复制有明显的抑制作用, 但单、双靶区反义RNA组间无明显差异, 与预计不一致, 其原因可能有: (1)双靶区反义RNA因结合靶点多, 可能达到完全结合的能力较差。(2)HBV DNA变异程度低, 双靶区反义RNA的抑制作用与单双靶区反义RNA的作用相差不明显。(3)样品例数偏少, 系统误差较大, 或者时间偏短尚未能发挥出

双靶区反义RNA的作用。

#### 4 参考文献

- 1 杨林, 姚集鲁, 邓练贤, 刘淑芳. 反基因及反义寡核苷酸抑制乙型肝炎病毒复制与表达的研究. 中华传染病杂志 2000; 18: 13-16
- 2 张建军, 陈枫, 钟森, 唐坤华, 史小玲, 王明勇, 彭建一. 乙型肝炎病毒C区反义RNA靶向肝细胞抗病毒的研究. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 169-170
- 3 Simons RW. Naturally occurring antisense RNA control-a brief review. *Gene* 1988; 72: 35-44
- 4 马春红, 孙汶生, 刘素侠, 丁培芳, 张利宁, 曹英林, 宋静. 抗HBV最佳反义寡核苷酸片段的体外筛选. 中华微生物学和免疫学杂志 2000; 20: 12-14
- 5 吴赤红, 曾争, 王勤环, 于敏, 公维波. 双靶区反义RNA抑制乙型肝炎病毒. 北京大学学报(医学版) 2001; 33: 462-464
- 6 彭昭源, 陈红, 徐小元. 逆转录病毒载体介导双靶区乙型肝炎病毒反义RNA模型的构建. 临床肝胆病杂志 2006; 22: 83-85
- 7 贾彦征, 刘光泽, 熊一力, 王洪敏, 张宜俊. 高表达乙型肝炎病毒转基因小鼠的制备. 肝脏 2001; 6: 99
- 8 赵蔚, 陈红, 彭昭源, 李文刚, 席宏丽, 徐小元. 双靶区反义RNA对乙型肝炎病毒转基因小鼠抗病毒疗效的研究. 中华医学杂志 2005; 85: 3486-3489
- 9 季伟, 王勤环, 斯崇文, 张国庆, 刘丹. 逆转录病毒载体介导乙型肝炎病毒反义基因的转录表达. 中华实验和临床病毒学杂志 1997; 11: 325-328
- 10 Goodarzi G, Gross SC, Tewari A, Watabe K. Antisense oligodeoxyribonucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol* 1990; 71: 3021-3025
- 11 Robaczewska M, Guerret S, Remy JS, Chemin I, Offensperger WB, Chevallier M, Behr JP, Podhajski AJ, Blum HE, Trepo C, Cova L. Inhibition of hepadnaviral replication by polyethylenimine-based intravenous delivery of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides to the liver. *Gene Ther* 2001; 8: 874-881
- 12 Ma CH, Sun WS, Tian PK, Gao LF, Liu SX, Wang XY, Zhang LN, Cao YL, Han LH, Liang XH. A novel HBV antisense RNA gene delivery system targeting hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 463-467

#### ■名词解释

1 反义RNA: 指其核苷酸系列可以与其靶RNA(主要是mRNA)互补杂交产生双链RNA, 影响靶RNA的正常加工修饰、翻译等过程, 从而调控基因的表达的一类RNA分子。

2 PCR: polymerase chain reaction的英文缩写, 多聚酶链式反应。他是以4种核苷酸为原料, 以DNA的一条链为模板, 在多聚酶的催化下, 通过碱基配对使寡核苷酸引物向3'方向延长合成DNA互补链(CDNA)的反应。通过反复几次循环, DNA片段数量就能成指数状上升, 使目的基因快速大量扩增。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

# 探讨老年胃癌患者胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA联合检测的临床价值

李明, 刘顺英, 李卫东, 江洁, 潘金泉, 叶正龙, 常尉文, 张文清

## ■背景资料

目前关于血液中胃肠道肿瘤标志物联合检测报道较多, 但对于胃液中指标研究较少, 且临床价值意义评价不一。

李明, 潘金泉, 叶正龙, 常尉文, 张文清, 江苏油田总医院消化内科 江苏省扬州市 225261

刘顺英, 李卫东, 江洁, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009

通讯作者: 李明, 225261, 江苏扬州江都市, 江苏油田总医院消化内科. shao\_bo\_ren1@163.com

电话: 0514-6762455

收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-07-19

## Clinical value of combined detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ , carbohydrate antigen 19-9 and carcinoembryonic antigen in gastric fluid of elderly patients with gastric cancer

Ming Li, Shun-Ying Liu, Wei-Dong Li, Jie Jiang, Jin-Quan Pan, Zheng-Long Ye, Wei-Wen Chang, Wen-Qing Zhang

Ming Li, Jin-Quan Pan, Zheng-Long Ye, Wei-Wen Chang, Wen-Qing Zhang, Department of Gastroenterology, Oilfield General Hospital, Yangzhou 225261, Jiangsu Province, China

Shun-Ying Liu, Wei-Dong Li, Jie Jiang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Ming Li, Department of Gastroenterology, Oilfield General Hospital, Yangzhou 225261, Jiangsu Province, China. shao\_bo\_ren1@163.com

Received: 2006-06-06 Accepted: 2006-07-19

## Abstract

**AIM:** To explore the clinical value of combined detection for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) and carcinoembryonic antigen (CEA) in the gastric fluid of elderly patients diagnosed with gastric cancer.

**METHODS:** A total of 103 patients underwent upper gastrointestinal endoscopic examination were classified as follows: gastric cancer ( $n = 42$ ), superficial gastritis ( $n = 30$ ), atrophy gastritis with various degrees of intestinal metaplasia or atypical hyperplasia ( $n = 31$ ). The levels of TNF- $\alpha$ , CA19-9 and CEA in gastric fluid were

examined, respectively, using immunoradiometric assay (IRMA).

**RESULTS:** The levels of TNF- $\alpha$ , CA19-9 and CEA in gastric fluid were significantly elevated in patients with gastric cancer than those in ones with benign gastric diseases ( $8.96 \pm 2.10$  mg/L vs  $4.92 \pm 1.24$ ,  $5.66 \pm 1.25$  mg/L;  $59.47 \pm 10.58$  IU/L vs  $36.89 \pm 11.23$ ,  $38.73 \pm 9.23$  IU/L;  $31.68 \pm 5.58$  mg/L vs  $17.55 \pm 3.82$ ,  $19.42 \pm 5.19$  mg/L, all  $P < 0.001$ ). The sensitivity and specificity of combined detection for TNF- $\alpha$ , CA19-9 and CEA were 97.4% and 89.3%, respectively, which were markedly higher than those of any single index detection.

**CONCLUSION:** Combined detection of TNF- $\alpha$ , CA19-9 and CEA can improve the diagnosis of gastric cancer in the elderly patients.

**Key Words:** Immunoradiometric assay; Gastric cancer; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Carbohydrate antigen 19-9; Carcinoembryonic antigen; Combined detection

Li M, Liu SY, Li WD, Jiang J, Pan JQ, Ye ZL, Chang WW, Zhang WQ. Clinical value of combined detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ , carbohydrate antigen 19-9 and carcinoembryonic antigen in gastric fluid of elderly patients with gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2560-2562

## 摘要

**目的:** 探讨老年患者胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA联合检测对胃癌的诊断价值。

**方法:** 采用放射免疫技术测定42例胃癌和61例良性胃病老年患者胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA浓度。

**结果:** 胃癌组胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA的浓度显著高于良性胃病组( $8.96 \pm 2.10$  mg/L vs  $4.92 \pm 1.24$ ,  $5.66 \pm 1.25$  mg/L;  $59.47 \pm 10.58$  IU/L vs  $36.89 \pm 11.23$ ,  $38.73 \pm 9.23$  IU/L;  $31.68 \pm 5.58$  mg/L vs  $17.55 \pm 3.82$ ,  $19.42 \pm$

5.19 mg/L, 均 $P<0.001$ ); 胃癌组联合检测胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA, 其敏感度和特异度分别97.4%, 89.3%, 均明显高于单项指标的敏感度和特异度。

**结论:** 联合检测胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA能有助于提高胃癌的诊断。

**关键词:** 固相免疫放射分析法; 胃癌; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 糖链抗原19-9; 癌胚抗原; 联合检测

李明, 刘顺英, 李卫东, 江洁, 潘金泉, 叶正龙, 常尉文, 张文清. 探讨老年胃癌患者胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA联合检测的临床价值. 世界华人消化杂志. 2006;14(25):2560-2562  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2560.asp

## 0 引言

现阶段关于胃肠道肿瘤标志物联合检测报道较多, 临床价值意义评价不一. 我们尝试联合检测老年胃癌及良性胃病患者胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9, CEA的水平, 以期获得较高的敏感度、特异度和诊断准确率。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择我院2004-01/12的门诊患者103例, 男49例(47.6%), 女54例(52.4%). 年龄60-87(69.7 $\pm$ 6.4)岁. 其中浅表性胃炎(甲组)30例, 萎缩性胃炎伴不同程度肠化生、不典型增生(乙组)31例, 各期胃癌(丙组)42例. 均经胃镜及病理学检查确诊. GC-911型 $\gamma$ 放射免疫计数器由科大创新股份有限公司中佳分公司提供;  $^{125}$ I-肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )放射免疫分析药盒、 $^{125}$ I-糖类抗原19-9放射免疫分析药盒、 $^{125}$ I-癌胚抗原(CEA)放射免疫分析药盒均由北京北免东雅生物技术研究提供. 按说明书操作, 并进行质量控制。

**1.2 方法** 每例患者均在当天检查前空腹8 h以上. 于胃镜检查时直视下用导管抽取胃液5 mL, 氢氧化钠调整pH为7.0, 以4000 r/min离心10 min后取上清液2 mL -70℃冻存待测. 剔除胃液中有明显血液、胆汁者. TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA测定用IRMA法, 采用GC-911型 $\gamma$ 放射免疫计数器对本进行检测. 胃液参考值采用胃良性患者组(乙组)总体均数95%可信区间的上限作为阳性值标准, 计算出TNF- $\alpha$ , CA19-9, CEA分别为6.12 mg/L, 42.11 IU/L, 21.32 mg/L。

**统计学处理** 使用SPSS 11.5统计软件对数据进行分析, 计量资料用mean $\pm$ SD表示, 两组计量资料的比较使用 $t$ 检验, 多组计量资料的比较使

表 1 老年患者胃液中各项指标的检测水平比较(mean $\pm$ SD)

分组	<i>n</i>	TNF- $\alpha$ (mg/L)	CA19-9 (IU/L)	CEA (mg/L)
甲	30	4.92 $\pm$ 1.24	36.89 $\pm$ 11.23	17.55 $\pm$ 3.82
乙	31	5.66 $\pm$ 1.25	38.73 $\pm$ 9.23	19.42 $\pm$ 5.19
丙	42	8.96 $\pm$ 2.10 <sup>b</sup>	59.47 $\pm$ 10.58 <sup>b</sup>	31.68 $\pm$ 5.58 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.001$  vs 甲组、乙组。

表 2 老年患者胃液中各项指标检测结果的评价指标

检测指标	灵敏度(%)	特异度(%)	阳性预期值(%)	阴性预期值(%)	阳性似然比
TNF- $\alpha$	69.1	75.4	65.9	77.9	2.81
CA19-9	65.7	67.2	58.3	74.6	2.03
CEA	61.9	70.5	59.1	72.9	2.09

表 3 老年患者胃液中各项指标的联合检测

组合方式	灵敏度(%)	特异度(%)	阳性预期值(%)	阴性预期值(%)	阳性似然比
1, 2	69.8	72.5	61.7	72.2	2.23
1, 3	73.7	76.2	77.9	74.3	3.02
2, 3	68.2	71.3	60.2	71.4	2.18
1, 2, 3	97.4	89.3	93.4	85.3	3.96

1: TNF- $\alpha$ ; 2: CA19-9; 3: CEA.

用方差分析,  $P<0.05$ 认为有显著性统计学差异。

## 2 结果

**2.1 胃液中各项指标的检测水平比较及检测结果评价指标** 胃癌组与胃良性病变组相比, 数值有明显的差异( $P$ 均 $<0.001$ ); 胃良性病变组之间无统计学意义( $P>0.05$ , 表1). 胃液各指标中TNF- $\alpha$ 的灵敏度、特异度、阳性预期值、阴性预期值和阳性似然比均高于CA19-9和CEA(表2).

**2.2 胃液中各项指标的联合检测** 胃液中各项指标联合检测, 以TNF- $\alpha$ , CA19-9和CEA 3者组合诊断效能最高(表3).

## 3 讨论

消化道肿瘤早期多无明显症状和体征, 部分患者就诊时已失去治疗机会, 因此早期诊断十分重要. 国内外有用单一肿瘤标志物检测消化道肿瘤的报道, 但诊断阳性率都不高. van Eeden *et al*<sup>[1]</sup>指出与血液中CEA相比, 胃液中CEA检测对于胃癌诊断具有更大的价值. 而联合检测胃

## ■创新盘点

本研究检测老年胃癌患者胃液中TNF- $\alpha$ , CA19-9, CEA的水平, 并探讨了不同组合的敏感度、特异度, 此组合方式在国内外未见相同报道。

## ■同行评价

本文报道了老年胃癌患者胃液中TNF- $\alpha$ 、CA19-9和CEA联合检测的临床价值,具有一定的可读性。

液中的肿瘤标志物是诊断消化道肿瘤新的尝试<sup>[2-3]</sup>。胃液中CA19-9和CEA都是较好的消化道肿瘤标志物<sup>[4]</sup>,而TNF- $\alpha$ 作为致炎因子在胃癌的发生、发展中起着重要的作用,他是内源性的肿瘤促进剂<sup>[5]</sup>。胃液各指标中TNF- $\alpha$ 的灵敏度、特异度、阳性预期值、阴性预期值和阳性似然比均高于CA19-9和CEA。但其单独应用诊断效果仍然偏低,而联合检测可提高其敏感度、特异性,增加胃癌诊断的准确度<sup>[3,6]</sup>。研究证明<sup>[2-3,6-7]</sup>,将数种标志物按一定方式进行联合检测可起到优势互补的作用,可明显提高胃癌诊断的准确度。本研究结果提示,虽然两项指标联合测定能够提高胃癌诊断的灵敏度,但胃液中TNF- $\alpha$ 、CEA、CA19-9三者同时检测的组合方式可获得更高的灵敏度和特异度,能够提高胃癌诊断的准确度,是临床诊断胃癌的一种有效的辅助手段。

## 4 参考文献

- 1 van Eeden PJ, Bezuidenhout DJ, Kock J, Weidemann A, Rossouw MA, McCarthy NA. Gastric juice carcino-embryonic antigen estimation. A useful additional test in the diagnosis of gastric carcinoma? *S Afr Med J* 1987; 71: 241-243
- 2 马道新, 王淑康. CA19-9、CA242、CEA联合检测诊断消化道肿瘤的价值. *山东医药* 2002; 42: 28-29
- 3 成军, 王严庆. 胃癌患者胃液血清中CA72-4、CA19-9和CEA联合检测的临床价值探讨. *重庆医科大学学报* 2003; 28: 17-20
- 4 Takahashi Y, Takeuchi T, Sakamoto J, Touge T, Mai M, Ohkura H, Kodaira S, Okajima K, Nakazato H. The usefulness of CEA and/or CA19-9 in monitoring for recurrence in gastric cancer patients: a prospective clinical study. *Gastric Cancer* 2003; 6: 142-145
- 5 Suganuma M, Kuzuhara T, Yamaguchi K, Fujiki H. Carcinogenic role of tumor necrosis factor-alpha inducing protein of Helicobacter pylori in human stomach. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 1-8
- 6 Lai IR, Lee WJ, Huang MT, Lin HH. Comparison of serum CA72-4, CEA, TPA, CA19-9 and CA125 levels in gastric cancer patients and correlation with recurrence. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1157-1160
- 7 郭成业, 闫春. 联合检测血清CA72-4, CA19-9和CEA对胃癌临床价值的探讨. *中国肿瘤临床* 2000; 27: 776-777

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2006年国际会议

Internal Medicine: Gastroenterology  
22 July 2006-1 August 2006  
Amsterdam  
Continuing Education Inc  
jbarnhart@continuingeducation.net

7th World Congress of the International  
Hepato-Pancreato-Biliary Association  
3-7 September 2006  
Edinburgh  
Edinburgh Convention Bureau  
convention@edinburgh.org  
www.edinburgh.org/conference

World Congress on Controversies in Obesity  
Diabetes and Hypertension  
25-28 October 2006  
Berlin  
comtec international  
codhy@codhy.com  
www.codhy.com

XXX Panamerican Congress of  
Gastroenterology  
11-16 November 2006  
Cancun  
www.panamericano2006.org.mx



# 血管紧张素 II Ⅰ型受体基因A1166C位点基因多态性与肝硬化的关系

## ■背景资料

组织局部肾素-血管紧张素系统的激活导致肝硬化发生。血管紧张素原启动子多态性与肝纤维化发生密切相关,但血管紧张素 II Ⅰ型受体的基因多态性与肝硬化之间关系的资料比较缺乏。

黄玉波, 董庆鸣, 宋淑静, 魏红山, 刘志英, 成军, 毛羽, 北京地坛医院 北京市 100011  
北京市优秀人才培养专项经费资助课题(No. 20041D0301548)  
通讯作者: 魏红山, 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. drliver@163.com  
电话: 010-64211031-2359  
收稿日期: 2006-05-15 接受日期: 2006-06-08

## A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor gene and its role in pathogenesis in liver cirrhosis

Yu-Bo Huang, Qing-Ming Dong, Shu-Jing Song, Hong-Shan Wei, Zhi-Ying Liu, Jun Cheng, Yu Mao

Yu-Bo Huang, Qing-Ming Dong, Shu-Jing Song, Hong-Shan Wei, Zhi-Ying Liu, Jun Cheng, Yu Mao, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China  
Correspondence to: Dr. Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Dongcheng District, Beijing 100011, China. drliver@163.com  
Received: 2006-05-15 Accepted: 2006-06-08

## Abstract

**AIM:** To establish a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method to detect A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) gene.

**METHODS:** A1166C polymorphism was detected and analyzed in 50 anti-HBs positive healthy controls in the serum and 46 patients with liver cirrhosis after hepatitis B virus infection. A set of primers was designed according to AT1R gene. The enzyme digestion site for restriction endonuclease *Dde* I was also designed around A1166C. A or C allele was assured based on the enzymatic result of the polymerase chain reaction products.

**RESULTS:** Sequencing revealed 99% homogeneity between the two homozygous strains and the AT1R gene. The anticipated mutations appeared at position A1166C. As for genotype or allele, there were no significant differences

at position A1166C between the hepatitis group and the liver cirrhosis group ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The established method can be applied to detect the A1166C polymorphism of AT1R gene. The mutation at A1166C site has no correlation with liver fibrosis.

**Key Words:** Polymerase chain reaction; Restriction fragment length polymorphism; Fibrosis; Angiotensin II; Angiotensin II type 1 receptor

Huang YB, Dong QM, Song SJ, Wei HS, Liu ZY, Cheng J, Mao Y. A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor gene and its role in pathogenesis in liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2556-2559

## 摘要

**目的:** 建立多聚酶链式反应-限制性片段长度多态分析(PCR-RFLP)法检测血管紧张素 II Ⅰ型受体基因(AT1R) A1166C位点的多态性。

**方法:** 对50例血清抗HBs阳性的健康对照者及46例HBV感染后肝硬化患者的血管紧张素 II Ⅰ型受体基因A1166C位点基因多态性的多态性进行分析。根据血管紧张素 II Ⅰ型受体基因设计引物, 在A1166C位设计*Dde* I酶切位点, 根据PCR产物酶切结果判断该位点为A或C。

**结果:** 两株纯合子与AT1R序列同源性在99%以上, 并在A1166C位点出现预期变异; 肝炎和肝硬化两组间A1166C位点无论是基因型还是等位基因均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

**结论:** PCR-RFLP的方法可用于AT1R基因A1166C位点基因多态性的检测, 该位点的变异尚未显示其与肝纤维化有关。

**关键词:** 多聚酶链式反应; 限制性片段长度多态性分析; 纤维化; 血管紧张素 II; 血管紧张素 II 受体

黄玉波, 董庆鸣, 宋淑静, 魏红山, 刘志英, 成军, 毛羽. 血管紧张素 II Ⅰ型受体基因A1166C位点基因多态性与肝硬化的关系. *世界华人消化杂志* 2006;14(25):2556-2559

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2556.asp

## 0 引言

血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(rennin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)中调节血管收缩、维持血容量的主要效应分子, 血管紧张素 II 受体(angiotensin II receptor, ATR)介导 Ang II 的生理学效应, 他分为 AT1R 和 AT2R 两种亚型, 主要发挥生物学效应的是 AT1R, 是 RAAS 作用的关键环节。目前, 关于 AT1R 基因多态性的研究较多, 其中 A1166C 位点是一个重要位点。1994 年, Bonnardeaux *et al*<sup>[1]</sup> 首先描述了 A1166C 变异, 部分学者认为 CC 基因型与高血压有关<sup>[2-5]</sup>, 但是其他研究者持不同态度<sup>[6-10]</sup>。目前还认为 A1166C 与动脉粥样硬化<sup>[11]</sup>、左心室肥大<sup>[7,12]</sup>、冠心病<sup>[13]</sup> 有关。近年研究发现 AT1R 及其 mRNA 的高表达与肝纤维化有关<sup>[14-15]</sup>。那么 A1166C 位点的变异与肝纤维化是否有关呢? 目前, 国内外尚未有报道。为此, 我们建立了多聚酶链式反应-限制性片段长度多态分析(PCR-RFLP)检测 A1166C 位点的变异并探讨其在肝纤维化中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集 2004-06/12 北京地坛医院住院的抗 HBs 抗体阳性的对照者血清标本 50 份, 男女各 25 例, 年龄  $36 \pm 4.1$  岁。肝硬化血清标本 46 份, 男女各 23 例, 年龄  $43 \pm 6.3$  岁。病例的诊断标准符合 2000 年西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》。Taq 聚合酶为上海生工生物工程公司产品, 100 bp DNA ladder 和 *Dde* I 内切酶为 Promega 公司产品, PCR 仪为 ABI 公司 9700 型。质粒提取采用 Sigma 公司 GenElute Plasmid Miniprep Kit。根据 A1166C 位点位于 2 个引物之间设计引物, 由北京赛百盛公司合成。引物序列如下: P1: 5'-GATAATGTAAGCTCATCCACCA-3'; P2: 5'-AATGTGGCTTTGCTTTGCTTG-3'。扩增产物为 257 bp。

**1.2 方法** 外周血白细胞基因组的提取: 采用华美生物工程公司 ReadyPCR™ 全基因组 DNA 纯化系统, 严格按照试剂盒说明书操作。PCR 反应体系: PCR 系统含  $10 \times$  缓冲液 3  $\mu$ L, 25 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu$ L, 25  $\mu$ mol/L P1 和 P2 各 0.5  $\mu$ L, Taq 聚合酶 2 U, 血细胞提取物 4  $\mu$ L, 反应总体积为 30  $\mu$ L。循环条件: 94℃ 预热 3 min, 94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 最后, 72℃

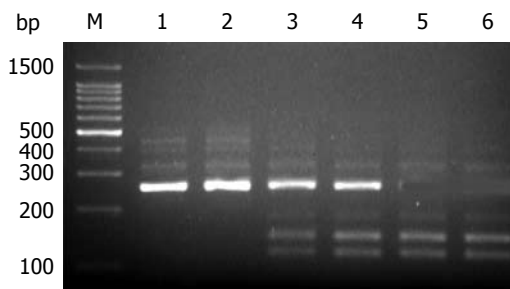


图 1 A1166C PCR 扩增产物 *Dde* I 酶切电泳结果。M: 100 bp DNA ladder; 1, 2: AA 纯合子; 3, 4: AC 杂合子; 5, 6: CC 纯合子。

延伸 7 min。取扩增产物 8  $\mu$ L 经 30 g/L 琼脂糖凝胶(含 1 mg/L EB)电泳, 在 257 bp 处出现荧光带者为阳性。PCR 产物酶切: *Dde* I 酶切位点为 C<sup>T</sup>NAG, 如果 A1166C 位点为 C, 则产生 *Dde* I 酶切位点, 如果为 A, 则酶切失败。取 PCR 产物 8.5  $\mu$ L,  $10 \times$  缓冲液 D 1  $\mu$ L, *Dde* I 0.5  $\mu$ L (5 U), 37℃ 酶切 16 h。取酶切产物 10  $\mu$ L 经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 只在 257 bp 处出现条带者为 AA 纯合子, 在 140 bp 和 117 bp 处出现条带者为 CC 纯合子, 在以上 3 个位置均有条带者 AC 杂合子。PCR 产物的分子克隆与测序: 分别取 AA 纯合子(命名为 DT-A1166)和 CC 纯合子(命名为 DT-1166C)的 PCR 产物, 用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 直接与 T-easy 载体连接, 转化 XL-1-Blue 细菌, PCR 筛选阳性克隆, 提取质粒, 采用通用引物, 经双脱氧链末端终止法进行双向测序(由上海生工生物工程公司完成)。DNA 序列资料采用 Vector NTI 9.0 软件包及 GeneDoc 2.6 分析。

**统计学处理** SPSS 10.0 软件包, 计数资料组间差异采用  $\chi^2$  检验分析,  $P < 0.05$  认为组间有显著差异。

## 2 结果

**2.1 PCR 产物酶切电泳** 分别取 AA 纯合子、AC 杂合子和 CC 纯合子阳性标本 *Dde* I 酶切产物各 2 份经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果与预期相符(图 1)。

**2.2 PCR 产物克隆测序** 将 DT-A1166, DT-1166C 和 AT1R 基因(GenBank 注册号: D13814)相应序列进行比对发现, DT-A1166 确为 AA 纯合子, DT-1166C 确为 CC 纯合子, 序列同源性在 99% 以上(图 2)。

**2.3 肝病和肝硬化 A1166C 位点基因多态性** 肝炎(恢复期)和肝硬化标本 A1166C 位点基因多态性检测结果见表 1, 所有标本均未检出 CC 纯合子。

## ■ 同行评价

血管紧张素 II 作为一种细胞因子在肝纤维化发生学方面起重要的作用。本文作者探讨肝炎和肝硬化患者血管紧张素 II I 型受体基因(AT1R) A1166C 位点的多态性与肝纤维化的关系是肝纤维化发生学的热点课题, 因而具有科学意义。



图 2 PCR产物克隆测序比较结果.

两组间无论是基因型还是等位基因均无显著性差异( $P>0.05$ ).

3 讨论

AT1R基因位于第3号染色体长臂2区1-5带上(3q21-q25). 人类只有单一的AT1R基因, 他的编码区只有1个外显子, 无内含子, 有1个开放读码框, 全长1080 bp. AT1R含有359个氨基酸残基, 属于G蛋白家族成员, 并与牛、大鼠的氨基酸顺序高度一致. AT1R是RAAS的重要组成部分, 除了对心血管系统的调节作用, 在心、肾间质纤维化及肝纤维化中的作用也越来越受到重视. 有学者发现AT1R与鼠胰腺的纤维化有关<sup>[16]</sup>. AT1R的拮抗剂也可以减轻心脏的纤维化<sup>[17]</sup>. 目前已有动物实验研究表明, 大鼠的肝星形细胞(HSC)存在AT1R, 并经测序得到证实, 而且用AT1R拮抗剂治疗肝大鼠纤维化取得了明显的疗效<sup>[18]</sup>.

肝纤维化形成过程中, HSC的激活和增生, 尤其是HSC表型的激活是肝纤维化形成过程的关键. 近来研究表明, RAAS参与了HSC的激活过程. Wei *et al*<sup>[19]</sup>证明了肝纤维化形成时醛固酮合成酶基因-CYP11B2 mRNA在HSC中表达增强, 醛固酮拮抗剂安体舒通对早期肝纤维化具有抑制作用, 同时发现了肝脏激活的HSC表达AT-1受体. 提示Ang II及其受体AT1R在HSC的激活和转化过程中可能具有重要的作用. Lim *et al*<sup>[20]</sup>用AT-1受体拮抗剂Losartan治疗肥厚性心肌病大鼠, 取得明显疗效, I型胶原及转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mRNA表达均减少了50%以上. Yoshiji *et al*<sup>[21]</sup>新近发现AT-1受体拮抗剂Candesartan可减轻大鼠肝纤维化, 降低肝纤维化血清标志物和TGF- $\beta$  mRNA等表达水平.

现有结果显示AT1R可能与肝纤维化有关, 但AT1R的A1166C位点多态性是否与肝纤维化有关, 国内外尚无类似研究资料. 我们建立

表 1 肝炎和肝硬化A1166C位点基因多态性比较结果 (n/%)

基因型	肝炎 (恢复期)	肝硬化
AA	45 (90.0)	44 (95.7)
AC	5 (10.0)	2 (4.3)
A等位基因	50 (90.9)	46 (95.8)
C等位基因	5 (9.1)	2 (4.2)

了PCR-RFLP检测AT1R基因A1166C位点的变异, 经过测序证实该方法准确可靠, 可以用于该位点多态性的检测. 但是, 目前尚不明确是否A1166 $\rightarrow$ C的变异会影响RAAS的活性. A1166C位于AT1R的3'非翻译区, 不可能直接影响mRNA的稳定性, 可能是与一种影响AT1R转录、翻译或影响mRNA的稳定性的蛋白因子基因存在共分离的结果<sup>[1]</sup>. 本文对50例肝炎和46例肝硬化外周血基因组中AT1R基因A1166C位点基因多态性检测尚未显示其与肝纤维化有关, 究竟该位点的多态性是否会影响RAAS的活性, 还需扩大样本量进行更进一步的深入研究.

4 参考文献

1 Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63-69

2 van Ittersum FJ, de Man AM, Thijssen S, de Knijff P, Slagboom E, Smulders Y, Tarnow L, Donker AJ, Bilo HJ, Stehouwer CD. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1000-1007

3 Wang WY, Zee RY, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet* 1997; 51: 31-34

4 Szombathy T, Szalai C, Katalin B, Palicz T, Romics L, Csaszar A. Association of angiotensin II type 1 receptor polymorphism with resistant essential hypertension. *Clin Chim Acta* 1998; 269: 91-100

5 Kainulainen K, Perola M, Terwilliger J, Kaprio J,

- Koskenvuo M, Syvanen AC, Vartiainen E, Peltonen L, Kontula K. Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 844-849
- 6 Castellano M, Muiesan ML, Beschi M, Rizzoni D, Cinelli A, Salvetti M, Pasini G, Porteri E, Bettoni G, Zulli R, Agabiti-Rosei E. Angiotensin II type 1 receptor A/C1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension* 1996; 28: 1076-1080
- 7 Takami S, Katsuya T, Rakugi H, Sato N, Nakata Y, Kamitani A, Miki T, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 316-321
- 8 Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC, Sharma AM, Ritz E. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. *J Hypertens* 1997; 15: 1385-1388
- 9 Lesage S, Velho G, Vionnet N, Chatelain N, Deme-nais F, Passa P, Soubrier F, Froguel P. Genetic studies of the renin-angiotensin system in arterial hypertension associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Hypertens* 1997; 15: 601-606
- 10 Kikuya M, Sugimoto K, Katsuya T, Suzuki M, Sato T, Funahashi J, Katoh R, Kazama I, Michimata M, Araki T, Hozawa A, Tsuji I, Ogihara T, Yanagisawa T, Imai Y, Matsubara M. A/C1166 gene polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor (AT1) and ambulatory blood pressure: the Ohasama Study. *Hypertens Res* 2003; 26: 141-145
- 11 Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Larosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, Cambien F. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94: 698-703
- 12 Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, Danser AH. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998; 32: 825-830
- 13 Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Escudero X, Lablanche JM, Amouyel P, Bertrand ME. The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 486-490
- 14 Wang WW, Yang XS, Li X, Wang J, Tian Y, Yang CH, Lai HW. Changes in the expression of angiotensin II type 1 receptor in the development of liver fibrosis. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 118-122
- 15 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 徐芹芳, 陈颖伟. 肾素-血管紧张素系统与肝纤维化发生. *中华消化杂志* 2001; 21: 145-147
- 16 Wang XP, Zhang R, Wu K, Wu L, Dong Y. Angiotensin II mediates acinar cell apoptosis during the development of rat pancreatic fibrosis by AT1R. *Pancreas* 2004; 29: 264-270
- 17 Kumagai K, Nakashima H, Urata H, Gondo N, Arakawa K, Saku K. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2197-2204
- 18 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 潘勤, 徐芹芳. 血管紧张素 II 受体阻断剂抗肝纤维化的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 302-304
- 19 Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl4. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 583-587
- 20 Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, Roberts R, Marian AJ. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 103: 789-791
- 21 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-750

电编 张敏 编辑 潘伯荣

# 血清总胆汁酸在婴幼儿巨细胞病毒肝炎中的动态变化及临床意义

刘薇, 蒋玉红, 王亚秋, 李伟

刘薇, 蒋玉红, 王亚秋, 李伟, 青岛市妇女儿童医疗保健中心  
检验科 山东省青岛市 266011

通讯作者: 蒋玉红, 266011, 山东省青岛市武定路27号, 青岛市  
妇女儿童医疗保健中心检验科. jyh0532@suho.com

电话: 0532-82857535 传真: 0532-82824382

收稿日期: 2006-07-29 接受日期: 2006-08-10

## Dynamic changes and clinical significance of serum total bile acid in infantile cytomegalovirus hepatitis

Wei Liu, Yu-Hong Jiang, Ya-Qiu Wang, Wei Li

Wei Liu, Yu-Hong Jiang, Ya-Qiu Wang, Wei Li, Clinical  
Laboratory, Qingdao Women and Children's Medical and  
Health Care Center, Qingdao 266011, Shandong Province,  
China

Correspondence to: Yu-Hong Jiang, Clinical Laboratory,  
Qingdao Women and Children's Medical and Health Care  
Center, 27 Wuding Road, Qingdao 266011, Shandong Pro-  
vince, China. jyh0532@suho.com

Received: 2006-07-29 Accepted: 2006-08-10

### Abstract

**AIM:** To investigate the dynamic changes of serum total bile acid (TBA) in infantile cytomegalovirus hepatitis.

**METHODS:** The levels of serum TBA in 21 infants suffered cytomegalovirus hepatitis were detected dynamically (at the first visit to a doctor, before treatment in hospital, 2 wk after treatment, and at the time leaving hospital). Meanwhile, the results were comparatively analyzed with alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels.

**RESULTS:** Of the 21 cases, the positive rate of TBA was significantly higher than that of ALT before treatment in hospital (100% vs 80.9%,  $P < 0.01$ ). The infants with TBA  $> 80 \mu\text{mol/L}$  had higher risk of unfavorable prognosis than those with TBA  $\leq 80 \mu\text{mol/L}$  (75% vs 23.1%,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** TBA is a sensitive index in the diagnosis of infantile cytomegalovirus hepati-

tis, and dynamic inspection can help to guide the therapy, judge the severity and evaluate the prognosis of this disease.

**Key Words:** Infant; Cytomegalovirus hepatitis; Serum total bile acid; Dynamic change

Liu W, Jiang YH, Wang YQ, Li W. Dynamic changes and clinical significance of serum total bile acid in infantile cytomegalovirus hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2563-2565

### 摘要

**目的:** 探讨血清总胆汁酸(TBA)在巨细胞病毒(CMV)肝炎患儿中的动态变化和临床诊疗价值。

**方法:** 对21例CMV肝炎患儿血清TBA按照初次就诊时、入院后治疗前、治疗2 wk后、出院时进行动态检测, 并与ALT和AST作比较。

**结果:** 21例CMV肝炎患儿入院治疗前TBA阳性率高于ALT阳性率(100% vs 80.9%,  $P < 0.01$ ); 入院治疗前TBA  $> 80 \mu\text{mol/L}$ 组预后不良发生率明显大于TBA  $\leq 80 \mu\text{mol/L}$ 组(75% vs 23.1%,  $P < 0.01$ )。

**结论:** TBA是诊断婴幼儿CMV肝炎的敏感指标, 其动态检测对指导临床治疗、反映病变程度和预后判断有一定临床参考价值。

**关键词:** 婴儿; 巨细胞病毒肝炎; 血清总胆汁酸; 动态变化

刘薇, 蒋玉红, 王亚秋, 李伟. 血清总胆汁酸在婴幼儿巨细胞病毒肝炎中的动态变化及临床意义. *世界华人消化杂志* 2006;14(25):2563-2565

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2563.asp>

### 0 引言

近年来, 对血清总胆汁酸(TBA)测定与肝病关系的认识有很大的进展, 为探讨TBA在婴幼儿巨细胞病毒(CMV)肝炎中的动态变化及临床诊疗价值, 我们对2003-09/2004-09我院诊治的21例

### ■背景资料

婴幼儿巨细胞病毒性肝炎近年来在我国发病率有所上升, 该病病情可轻可重, 但大部分预后良好, 少数重症患者可有肝硬化腹水, 如果及其他系统则病程延长。



## ■应用要点

本研究结果显示血清总胆汁酸可以灵敏快速的反映CMV肝炎患儿在治疗中的病情变化,所以他是反映婴幼儿CMV肝炎病变程度及疗效的良好指标,有一定的临床价值。

表 1 CMV肝炎患儿初次就诊与乙肝对照组TBA, ALT, AST测定结果 (mean ± SD)

分组	n	TBA (μmol/L)	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)
CMV肝炎组	21	61.6 ± 34.3 <sup>b</sup>	1892.0 ± 1213.6 <sup>b</sup>	2137.1 ± 1440.3 <sup>b</sup>
乙型肝炎对照组	20	15.1 ± 4.9	1062.2 ± 191.8	1085.2 ± 198.4

<sup>b</sup>P<0.01 vs 乙型肝炎对照组。

表 2 CMV肝炎组TBA, ALT, AST动态测定结果及异常检出率

时间	n	TBA (μmol/L)		ALT (nkat/L)		AST (nkat/L)	
		mean ± SD	异常率(%)	mean ± SD	异常率(%)	mean ± SD	异常率(%)
治疗前	21	61.6 ± 34.3	100	1892.0 ± 1213.6	80.9	2137.1 ± 1440.3	76.2
治疗2 wk后	20	39.7 ± 19.7 <sup>a</sup>	95.2	1618.7 ± 936.8 <sup>a</sup>	85.7	1588.6 ± 836.8 <sup>a</sup>	80.9
出院时	20	12.7 ± 7.7 <sup>ac</sup>	14.3	1098.6 ± 153.4 <sup>ac</sup>	23.8	1035.2 ± 136.7 <sup>ac</sup>	14.3

<sup>a</sup>P<0.05 vs 治疗前; <sup>c</sup>P<0.05 vs 治疗2 wk后。

CMV肝炎患儿进行TBA及相关指标检测并随访,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003-09/2004-09本院CMV肝炎住院患儿21例,男12例,女9例,年龄30 d-15 mo。根据CMV感染诊断方案<sup>[1]</sup>,21例患儿均确诊为CMV肝炎。所有患儿血CMV-IgM(+),尿CMV-DNA-PCR(+),伴有黄疸、病理性肝脏体征和血清氨基酸转氨酶增高。对照组:我院儿童保健科查体检测出的乙型肝炎婴幼儿20例,男11例,女9例,年龄6 mo-40 mo,血HBsAg(+),血HBV-DNA-PCR(+).

**1.2 方法** CMV肝炎组患儿按照初次就诊时、入院后治疗前、治疗2 wk后、出院时采集4次静脉血,乙型肝炎对照组采血1次,所有标本采集后及时分离血清,当日进行血清TBA及常规肝功能检测,标本无溶血,无乳糜。TBA采用循环速率法,应用美国DADE Dimension AR全自动生化分析仪测定,试剂盒为美国德灵公司提供,质控血清为英国Randox定值质控品。

**统计学处理** EpiData 3.0建立数据库,SPSS 11.5软件包进行统计学处理。计数资料用频数或百分数表示;计量资料用mean ± SD表示,使用独立样本t检验、重复测量方差分析、 $\chi^2$ 检验进行统计分析。

## 2 结果

**2.1 CMV肝炎组初次就诊及乙肝对照组TBA, ALT和AST的测定** CMV肝炎患儿初次就诊时

TBA平均值大约是正常上限的6倍,ALT和AST平均值大约是正常上限的2倍,TBA检测的灵敏度高于ALT和AST。乙型肝炎对照组TBA平均值稍高于正常上限(表1)。

**2.2 CMV肝炎组TBA, ALT, AST动态测定结果及异常检出率** 21例CMV肝炎患儿治疗前TBA阳性率是100%,ALT的阳性率是80.9%,TBA阳性率高于ALT的阳性率。CMV肝炎患儿治疗2 wk后TBA平均值约降至正常上限3倍,而ALT平均值降至正常上限1.5倍左右,TBA下降比ALT明显(表2)。

**2.3 预后** 21例患儿中有20例经抗炎及清胆利肝中药治疗2-8 wk后有不同程度好转,1例放弃治疗。根据入院治疗前TBA检测结果,将21例分为两组,A组13例,TBA ≤ 80 μmol/L,B组8例,TBA > 80 μmol/L。随访2-3 a,A组复发3例,B组复发6例(肝硬化1例),两组预后不良发生率分别为23.1%及75.0%,行Fisher精确检验, $P = 0.032 < 0.05$ ,A,B两组预后不良发生率差异具有显著性。

## 3 讨论

婴幼儿肝炎综合征作为婴幼儿期常见的黄疸性疾病之一,近年发病率有所上升<sup>[2-3]</sup>,其病理变化包括淤胆、肝细胞肿胀、结缔组织增生、汇管区炎症等<sup>[4]</sup>。CMV是婴幼儿肝炎综合征的主要病原体,也是导致小儿先天畸形的重要原因之一<sup>[5-6]</sup>。有研究显示,CMV感染人体细胞后使花生四烯酸释放,通过环氧合酶(COX)催化产生反应性氧物质(ROS)<sup>[7]</sup>,ROS激活细胞质内非

活性状态的核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), 后者引起与免疫和炎症反应有关的多种细胞基因、病毒基因的表达, 从而引起细胞炎症反应, 损害肝及胆管细胞. CMV感染导致胆管上皮增生, 造成胆道不完全机械性梗阻, 可出现肝功能异常, 也可表现为淤胆型肝炎. 10%先天性CMV感染的婴儿会出现严重的临床表现, 常见的有肝脾肿大、黄疸、小头畸形、体质量低下、紫癜、先天畸形等<sup>[8-9]</sup>. 由于CMV具有亲肝特性, 故肝脏是最容易受累的脏器之一<sup>[10]</sup>. 在各项常规肝功能检测中, TBA测定不仅能早期反映肝细胞损害, 而且能同时反映肝脏的分泌状态、肝脏合成与代谢<sup>[11-12]</sup>. 胆汁酸在肝细胞内合成, 随胆汁排入小肠, 约95%的胆汁酸在回肠末端被重吸收, 经门静脉至肝脏, 肝细胞将其90%-95%摄取, 再将其分泌至胆汁中形成“肠-肝循环”<sup>[13]</sup>. 在肝功能损害时, ALT虽可灵敏地反映肝细胞损伤情况, 但肝细胞性黄疸及胆汁淤积时不如胆汁酸升高显著, 并且转氨酶升高幅度与肝病严重程度不一定平行. 本文资料显示, CMV感染患儿初次就诊时ALT平均值比正常上限仅升高约2倍(正常上限为60 U/L), 而TBA平均值比正常上限升高约6倍(正常上限为12  $\mu$ mol/L), 甚至有些患儿在ALT无明显变化时TBA就已经上升, 提示作为患儿肝细胞损伤的诊断指标, ALT在灵敏度方面不如TBA. 早期发现症状性婴幼儿CMV肝炎并积极治疗, 可减少后遗症的发生. 本文21例患儿在治疗前TBA阳性率高于ALT阳性率, TBA阳性率与ALT阳性率分别为100%和80.9%, 统计学分析, 有显著性差异( $P<0.01$ ), 故TBA是反映婴幼儿CMV肝炎肝功损害的灵敏指标<sup>[14]</sup>. 婴儿CMV肝炎病情可轻可重, 如累及其他系统则病程延长, 对本病一般采取对症、支持治疗, 保肝、退黄疸<sup>[15]</sup>. CMV肝炎患儿治疗2 wk后TBA平均值降至正常上限3倍, 而ALT平均值降至正常上限1.5倍左右, TBA下降比ALT明显, 使临床医师可以及时了解治疗的效果, 为进一步调整治疗方案提供了依据. 据临床观察, 在治疗过程中TBA下降越快, 临床症状改善明显, 治疗预后越好; 下降越慢预后越差, 血清TBA值与肝病严重程度及临床症状具有一定相关性. 同时我们对21例患儿进行动态随访2-3 a, 发现入院治疗前TBA $>80$   $\mu$ mol/L组预后不良发生率明显大于

TBA $\leq 80$   $\mu$ mol/L组, 故认为TBA对判断婴幼儿CMV肝炎预后具有一定价值.

总之, 血清TBA测定对肝脏实质性损伤、胆管阻塞及胆汁淤积等能进行综合评价, 是反映婴幼儿CMV肝炎肝功损害的灵敏指标, 所以血清TBA测定作为婴幼儿CMV肝炎的筛选及动态监测的指标, 具有一定的临床价值. 另外血清TBA在反映婴幼儿CMV肝炎病情及疗效方面优于其他肝功能指标, 是反映病变程度及疗效的良好指标, 值得在临床推广应用.

#### 4 参考文献

- 1 中华医学会儿科学分会感染消化组. 巨细胞病毒感染诊断方案. 中华儿科杂志 1999; 37: 441
- 2 赵平. 血清总胆汁酸测定对诊断婴幼儿肝炎综合征的意义. 现代中西医结合杂志 2004; 13: 2468
- 3 胡怡, 曾祝伦, 陈元, 刘岚. 婴幼儿肝炎综合征患儿血清总胆汁酸测定的临床价值. 四川医学 2004; 25: 881-882
- 4 刘薇, 孙佰秀, 王梅, 蒋玉红. 婴幼儿肝炎综合征血清总胆汁酸的变化及临床意义. 中国小儿急救医学 2006; 13: 277-278
- 5 张妍, 刘华林, 王斌, 钱冬萌, 闫志勇, 丁守怡, 宋旭霞, 宋广辉. 利用SELDI-TOF-MS技术研究巨细胞病毒感染致婴幼儿肝炎综合征的血清蛋白标志物. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2549-2553
- 6 闫淑媛, 陈平洋. 人巨细胞病毒感染的实验室诊断研究进展. 国外医学儿科学分册 2005; 32: 284-287
- 7 Shibutani T, Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Moss J, Epstein SE. Pertussis toxin-sensitive G proteins as mediators of the signal transduction pathways activated by cytomegalovirus infection of smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 2054-2061
- 8 Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfeld P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 443-448
- 9 Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 680-715
- 10 汤鸣, 严越秀, 肖力, 乔萍. 新生儿高胆红素血症巨细胞病毒及胆汁酸检测的意义. 热带医学杂志 2005; 5: 83-85
- 11 宋文琪, 张美和, 王艳, 周敏, 曾俊红. 血清总胆汁酸测定在婴幼儿肝炎综合征中的应用. 中华检验医学杂志 2001; 24: 227-229
- 12 李朝晖, 曹友德, 李浩. 血清总胆汁酸测定在诊断新生儿黄疸中的临床价值. 医学临床研究 2006; 23: 209-210
- 13 张珍妮, 董蕾, 刘欣, 李毅. 胆汁酸肠肝循环对消化间期移行性复合运动的作用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2610-2613
- 14 陈涛. 血清总胆汁酸测定对婴幼儿肝炎综合征诊疗价值的探讨. 国外医学临床生物化学与检验学分册 2005; 26: 567-568
- 15 许毓汤, 吴月治, 赵国荣. 婴儿巨细胞病毒性肝炎34例分析. 中国优生与遗传杂志 2004; 12: 113-114

#### ■名词解释

1 婴儿肝炎综合征: 简称婴肝, 是儿科常见病, 他是指一组于婴儿期(包括新生儿期)起病, 伴有黄疸、病理性肝脏体征和血清氨基酸转氨酶增高的临床症状候群.

2 瘀胆性肝炎: 指各种原因(包括各种肝炎病毒、药物、内分泌、自身免疫性疾病等)引起的肝内胆红素结合与排泄障碍, 而导致黄疸持久不退或进行性加深, 他是一种病因诸多、发病机理复杂的综合征, 而不是单独的疾病.

电编 张敏 编辑 张焕兰

# 生物反馈训练可以提高超低位直肠癌内括约肌切除术后 的排便功能

丛进春, 张宏, 陈春生, 刘恩卿

## ■背景资料

ISR的手术要点是：经腹完成全直肠系膜切除术，直肠游离至肛提肌平面后，经肛门于括约肌间沟处切开肛管皮肤，分离内括约肌直至将直肠及内括约肌全部切除，再行结肠肛管吻合，亦称内括约肌全切除(TISR)。若切除部分内括约肌，称为内括约肌次全切除(SISR)。TISR适用于肿瘤侵及或超出齿状线者，SISR适用于齿状线上2 cm以内的肿瘤。若肿瘤侵及肛门外括约肌，则可同时切除外括约肌深、浅部，保留皮下部(ISR plus PESR)。肿瘤远端切除长度至少应达1 cm，外周4 mm以上。

丛进春, 张宏, 陈春生, 刘恩卿, 中国医科大学附属盛京医院肛肠外科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 丛进春, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院肛肠外科. congjinchun@yahoo.com.cn

电话: 024-83955073

收稿日期: 2006-06-25 接受日期: 2006-07-31

## Biofeedback therapy can improve the anal sphincter function in patients with intersphincteric resection for low rectal cancer

Jin-Chun Cong, Hong Zhang, Chun-Sheng Chen, En-Qing Liu

Jin-Chun Cong, Hong Zhang, Chun-Sheng Chen, En-Qing Liu, Department of Anorectal Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jin-Chun Cong, Department of Anorectal Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, 110004, Liaoning Province, China. congjinchun@yahoo.com.cn

Received: 2006-06-25 Accepted: 2006-07-31

## Abstract

**AIM:** To assess the efficacy of biofeedback therapy in the patients received intersphincteric resection for very low rectal cancer.

**METHODS:** From 1999 to 2006, a total of 16 patients underwent intersphincteric resection, and all of them received biofeedback treatments. Therapeutic responses were evaluated with Vaizey, Wexner scoring systems and vectorial manometry.

**RESULTS:** After biofeedback treatments, the Vaizey and Wexner scores were markedly decreased as compared with those before treatments ( $6.4$  vs  $8.6$ ,  $P < 0.001$ ;  $5.4$  vs  $7.2$ ,  $P < 0.001$ ); the maximal contraction pressure (mmHg) and contraction vector volume [ $\text{cm} \times (\text{mmHg})^2$ ] were significantly increased ( $205.6 \pm 44.5$  vs  $143.6 \pm 46.5$ ,  $P < 0.001$ ;  $50\,664.6 \pm 8040.1$  vs  $13\,337.0 \pm 7491.1$ ,  $P < 0.001$ ); the asymmetric index as the

resting or contracting of sphincter was dramatically down-regulated ( $46.8 \pm 7.5$  vs  $58.3 \pm 7.4$ ,  $P < 0.001$ ;  $29.9 \pm 6.7$  vs  $38.3 \pm 7.2$ ,  $P < 0.001$ ); at last, the positive rate of rectoanal reflex was also increased from 6.3% to 31.3%.

**CONCLUSION:** The maximal pressure and vector volume are deficient in patients after intersphincteric resection, while biofeedback therapy can partly improve the anal sphincter function.

**Key Words:** Low rectal cancer; Biofeedback; Intersphincteric resection

Cong JC, Zhang H, Chen CS, Liu EQ. Biofeedback therapy can improve the anal sphincter function in patients with intersphincteric resection for low rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(25):2566-2570

## 摘要

**目的:** 研究生物反馈技术是否可以提高超低位直肠癌内括约肌切除术后排便功能。

**方法:** 对16例内括约肌切除术后患者进行生物反馈治疗, 分别应用Vaizey和Wexner评分及直肠肛管向量测压技术来评价生物反馈的效果。

**结果:** 生物反馈治疗后Vaizey和Wexner评分显著降低( $6.4$  vs  $8.6$ ,  $P < 0.001$ ;  $5.4$  vs  $7.2$ ,  $P < 0.001$ ), 最大收缩压(mmHg)及收缩向量容积 [ $\text{cm} \times (\text{mmHg})^2$ ] 均显著性提高( $205.6 \pm 44.5$  vs  $143.6 \pm 46.5$ ,  $P < 0.001$ ;  $50\,664.6 \pm 8040.1$  vs  $13\,337.0 \pm 7491.1$ ,  $P < 0.001$ ), 静息及收缩时的不均衡指数均显著降低( $46.8 \pm 7.5$  vs  $58.3 \pm 7.4$ ,  $P < 0.001$ ;  $29.9 \pm 6.7$  vs  $38.3 \pm 7.2$ ,  $P < 0.001$ ), 直肠肛管反射的阳性率也由训练前的6.3%提高至31.3%。

**结论:** 内括约肌切除术后肛管最大压力及向量容积下降, 生物反馈技术可以改善部分的排便功能, 可以作为提高超低位直肠癌内括约肌切除术后肛门括约肌功能的方法。

**关键词:** 超低位直肠癌; 内括约肌切除术; 生物反馈

丛进春, 张宏, 陈春生, 刘恩卿. 生物反馈训练可以提高超低位直肠癌内括约肌切除术后排便功能. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2566-2570

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2566.asp>

## 0 引言

随着吻合技术的发展,越来越多的低位直肠癌患者可以避免永久的腹壁造口,但是仍然有20%的患者因为肿瘤位置过低而不得不行腹会阴联合切除(abdominoperineal resection, APR),严重影响了生活质量. 内括约肌切除术<sup>[1-4]</sup>(intersphincteric resection, ISR)就是针对肿瘤位于距肛缘5 cm以下的保肛术式,但是他存在2个医生和患者都关心的问题:术后局部复发和术后肛门功能. 术后肛门功能主要涉及术后短期或长期可能面临的便失禁问题,而生物反馈训练治疗便失禁的成功率可以达到50%-92%<sup>[5-7]</sup>,但是对ISR患者的作用尚未可知. 本研究即对ISR术后的患者进行生物反馈治疗,应用向量测压检测技术对治疗前后的肛门括约肌功能进行检测,旨在对生物反馈训练对ISR术后的排便控制能力影响进行综合评价.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 随访1999-03/2006-01 16例超低位直肠癌施行ISR手术患者,其中男5例,女11例,平均年龄56(41-74)岁;肿瘤距肛缘2.0-4.5(平均3.3) cm,距离采用侧卧位硬质乙状结肠镜测量;肿瘤直径2.1-4.0(平均2.9) cm,;其中Dukes A期3例, Dukes B期13例,病理类型为高分化腺癌者6例,中分化腺癌者10例. 选择40-72岁无肛门直肠疾患、无排便功能障碍的正常患者30例(男10例,女20例)作为对照组.

### 1.2 方法

**1.2.1 术后1 mo行生物反馈训练** (1)加强肛周肌肉力量的生物反馈训练:患者取左侧卧位,将肛探式压力电极插入肛管,观察计算机显示器上正常压力波形的同时指导患者调整用力方式,教会患者使用肛门括约肌,随意地提高肛门括约肌收缩幅,出现正常图形后及时给予鼓励. 每次训练30 min,每日2次. 3 wk后,当患者能正确进行肛周肌肉收缩后,可使用便携式生物反馈训练仪在家中训练. 每次20 min,每日2次. (2)改善直肠感觉性与肛门外括约肌协调性的生物反馈训练:将带气囊的测压导管插入直肠,从显

示器上观察到扩张气囊达到感觉阈值的压力波形后减少注气量. 嘱患者观察显示器上的压力波形,同时反复注气,让患者体会气囊膨胀的感觉,直到关闭显示器后随机注气时患者仍可清楚地体会到气囊被扩张. 感觉阈值达正常水平后,继续反复进行扩张气囊的训练,使患者不需看显示器上的信号,仅凭直肠被扩张的感觉来收缩肛门,医生于一旁指导并加以纠正,以养成只要直肠被扩张,肛门外括约肌就会反射性收缩的习惯. 每次训练30 min,每日1次. 当直肠扩张的容量很低时,肛门外括约肌即能反射性收缩,且维持恒定便可结束训练. (3)与电刺激结合的生物反馈训练:采用生物反馈训练仪及诱发电位检测仪对患者进行电刺激,调整电流强度正好达到括约肌收缩的强度,间歇性刺激肛门直肠及盆底肌的神经系统,促进肌肉收缩. 每次15 min,每日1次.

**1.2.2 向量测压检测** 仪器设备:瑞典CTD-Synectics公司生产的高分辨率多通道胃肠功能监测系统(PC Polygram, HR)及压力换能器;瑞典CTD-Synectics公司生产的向量测压软件分析系统;低顺应性水灌注系统:氮气瓶提供压力维持在40 kPa,压力传导介质为纯净蒸馏水,液体滴数为0.5 mL/min;测压导管:选择8通道聚乙烯测压导管,直径0.5 cm,各通道侧孔直径1.0 mm,开口位于距导管顶端5 cm的同一横断面上,相邻侧孔间距为45°. 检测方法:左侧卧位,安静下检测. 测压导管连接在8个换能器上,压力定标范围0-50 mmHg,导管插入肛门6-8 cm,观察肛管纵轴8个方位上每一横断面的压力值,启用恒速拖拽系统以0.17 cm/s匀速向外牵拉,分别观察肛管在松弛(R)和收缩肛门(S)状态时的压力变化,信号经传感器输入计算机进行分析和储存. 检测指标包括最大压力值、向量容积、不均横指数、直肠肛管反射.

**1.2.3 失禁评分** 分别采用Vaizey和Wexner评分来比较生物反馈前后肛门功能变化, Vaizey评分<sup>[8]</sup>是一项24分的标准, Wexner评分<sup>[9]</sup>是一项20分的标准,两者都是0分表示正常.

**统计学处理** 数据结果均以均值±标准差(mean±SD)表示,数据之间比较用 $t$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有显著性意义.

## 2 结果

所有随访患者均接受生物反馈训练3-4 wk,本组研究在生物反馈训练前后没有失访者. 对

### ■ 相关报道

ISR的技术及术后的两大问题的讨论自1992年开始在Dis Colon Rectum杂志上报道甚多,在技术上逐渐倾向于腹腔镜技术,术后的问题局部复发率为0%-13%,排便功能满意度在57%-82%,目前国内报道的功能最好的是Saito *et al*,国内报道多数着重于技术方面的描述.

### ■创新盘点

ISR术后的肛门括约肌功能问题是困扰患者及医生的一大难题,虽然多数的报道结果比较理想,但是大多数是从患者的主观角度出发,缺乏客观根据,有的报道中采用传统的直肠肛管测压技术,但是不仅肛管压力是评价括约肌的重要指标,肛管高压区的长度同样重要,只有把二者结合起来才能更精确和全面。所以本文应用的向量测压更能全面的反映“新直肠肛管”的总体功能。可以看出ISR术后的肛门括约肌功能并不理想,主要涉及便秘失禁的问题,而生物反馈在治疗便秘失禁方面有一定的作用,但是最近对生物反馈的作用争论颇多,有人认为生物反馈完全是患者受暗示的结果,并不能解决实际问题。本文便从主观客观两方面综合评价生物反馈对ISR术后的肛门功能的作用。

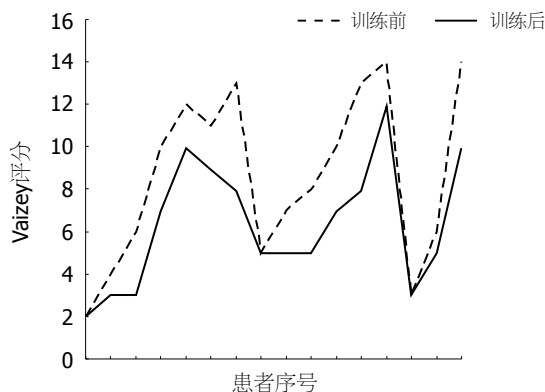


图1 生物反馈治疗前后的Vaizey评分。

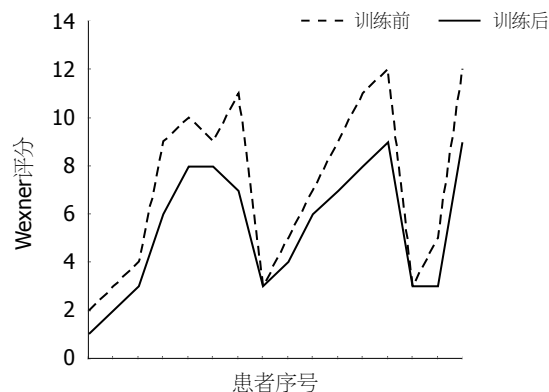


图2 生物反馈治疗前后的Wexner评分。

表1 生物反馈训练前后直肠肛管向量测压与肌电检测结果 (mean ± SD)

	最大静息压 (mmHg)	最大收缩压 (mmHg)	静息向量容积 (cm × mmHg <sup>2</sup> )	收缩向量容积 (cm × mmHg <sup>2</sup> )
训练前	65.6 ± 13.3	143.6 ± 46.5	509.2 ± 95.0	13 337.0 ± 7491.1
训练后	66.6 ± 13.0	205.6 ± 44.5	516.5 ± 96.0	50 664.6 ± 8040.1
正常对照	206.4 ± 23.4	325.2 ± 33.6	50 688.9 ± 6124.7	99 203.0 ± 9478.9

此16名患者分别采用Vaizey和Wexner评分,治疗前的平均Vaizey评分为8.6 (2-14)分,治疗后平均为6.4 (2-12)分,有显著性差异( $P < 0.001$ ,图1)。治疗前的Wexner评分为7.2分(2-12分),治疗后平均为5.4分(1-9分),有显著性差异( $P < 0.001$ ,图2)。所有患者治疗前后均行直肠肛管向量测压,结果显示,患者经生物反馈训练后,最大收缩压及收缩向量容积均显著性提高( $P < 0.001$ ),而最大静息压( $P = 0.002$ )及静息向量容积( $P = 0.001$ ),虽然在治疗后出现统计学上差异,但是从数据上看似乎差别不大(表1)。生物反馈训练后的不平衡指数变化见表2,静息及收缩时均有显著性差异( $P < 0.001$ )。此外直肠肛管反射的阳性率由训练前的6.3% (1/16),提高至31.3% (5/16)。

### 3 讨论

1992年Braun *et al*<sup>[1]</sup>首先报道行内括约肌切除术治疗肿瘤位置距肛门5 cm以内的超低位直肠癌,其手术的局部复发率为0%-13%,排便功能满意度在57%-82%<sup>[1-4,10]</sup>之间。但是详细分析各个研究所采用的评价标准不难看出,多数研究只采用患者的主观评价,这是一个不准确的标准,因为患者不可能选择回到术前状态,患者的主观也很容易被干扰,因为患者总是希望看到选择手术后有利的一面,而且即使是这种达到评

表2 生物反馈治疗前后不平衡指数的变化 (mean ± SD)

	静息不平衡指数	收缩不平衡指数
训练前	58.3 ± 7.4	38.3 ± 7.2
训练后	46.8 ± 7.5	29.9 ± 6.7
正常对照组	31.3 ± 5.1	27.6 ± 4.3

分优良的患者,其排便功能仍然达不到术前及正常人的水平,这就需要一个能够锻炼“新直肠肛管”的总体功能的方法。生物反馈训练在临床上就被广泛的用来治疗便秘失禁。一项系统性文献分析发现<sup>[11]</sup>,在英国采用的针对便秘失禁的生物反馈治疗结果显示48.6%的患者可以达到治愈,71.7%的患者自述症状得到改善。但是有些随机对照研究发现<sup>[12]</sup>,生物反馈的作用并不确切,而且目前的生物反馈治疗也没有一个统一的标准,在方法学方面存在缺陷<sup>[6,13]</sup>,因此需要从客观上对他的作用作出评价。

本组研究结果显示,无论在生物反馈治疗前还是治疗后,ISR术后的肛门功能的向量测压结果远比正常人低。运用生物反馈治疗后,在主观上81.3% (13/16)患者自觉症状有不同程度的改善,18.8% (3/16)的患者自觉没有明显变化。从向量测压结果来看,肛管最大压力值和向量容积较训练前均明显提高,最大限度地恢复了肛门



直肠功能. 向量测压的结果以收缩时变化明显, 而最大静息压和静息向量容积在数值上感觉变化不大, 由于本组研究例数少, 所以得出的显著性差异有待商榷. 本组患者治疗后的各项指标均明显提高, 没有出现在文献中报道的在治疗便秘失禁时无效或部分无效的结果, 这可能和ISR手术适应症的选择有关, 因为术前必须选择那种括约肌功能良好的患者, 而且ISR手术只切除内括约肌, 外括约肌保留完好, 这跟引起便秘失禁的原因不一样, 因为在针对便秘失禁的各种研究中, 分娩等因素引起的外括约肌损伤占多数. 另一方面, 这种术式似乎也可以解释静息时向量测压结果变化不大的原因, 因为生理研究发现, 收缩压主要由外括约肌提供, 而静息压则55%由内括约肌、15%由痔丛和30%由外括约肌提供<sup>[14]</sup>, ISR手术的结果只剩下外括约肌, 导致术后静息压大幅下降在所难免, 而生物反馈的作用主要针对盆底肌肉, 所以不太可能明显改善静息压力. 即使是对收缩时功能的改善, 生物反馈治疗后的收缩向量测压仍远低于正常人的标准. 本组研究的另一项指标, 不均衡指数是经过计算机处理后向量测压所特有的指标. 在正常人肛管压力分布也是不对称的, 存在着纵向压力梯度及横向不对称性. Taylor *et al*<sup>[15]</sup>发现, 在近端肛管, 前方压力低于其他方向的压力; 在远端肛管, 后方压力低于其他方向的压力. 所以, 不均衡指数在正常人也绝不可能是零, 据此可以判断肛管四周的压力分布的对称程度, 从而评估有无局部肌力减弱或肌肉缺损. 对于ISR手术, 从术后的不均衡指数就可以看出手术中对外括约肌的损伤程度. 本组研究显示, 所有的患者术后不均衡指数均有不同程度的增加, 考虑都有不同程度的外括约肌损伤, 因为内括约肌已经完全切除, 不存在由于内括约肌的不对称性引起的不均衡指数增加, 而术者总会下意识的多切除肿瘤所处的位置, 这就不可避免损伤部分外括约肌. 至于生物反馈对不均衡指数的作用, 可以看出治疗后的不均衡指数明显下降, 因为已经没有内括约肌参与, 可以看出静息与收缩时的不均衡指数均显著下降, 而没有出现在直肠肛管向量测压中静息压变化不明显的情况. 至于直肠肛管反射, ISR术后93.8%的患者出现阴性, 这与ISR的术式有关. 在直肠癌低位前切除术的研究中发现, 肛门内括约肌的损伤会引起直肠肛门抑制反射<sup>[16]</sup>, 而ISR手术完全切除内括约肌及直肠肛管处的黏膜感觉器官, 这就不难解释为

什么会如此多的患者出现直肠肛管反射阴性. 但是并不是所有患者都出现反射阴性, 而且在生物反馈治疗后直肠肛管反射的阳性率由训练前的6.3%提高至31.3%, 这说明仍有其他盆底因素参与直肠肛管反射. 在研究中还发现, 在生物反馈训练前有37.5% (6/16)的患者对气体和液体分辨不清, 训练后这些患者的症状没有明显改善, 而这6例患者中有4例在随访1 a后才逐渐产生满意的分辨能力, 这说明, 生物反馈对这种神经感觉的改善作用不大.

总之, 生物反馈治疗可以改善ISR术后的肛门功能, 无论是患者主观上还是客观检测指标均较治疗前有所改善, 但是生物反馈治疗对静息状态下括约肌功能的改变不大, 尤其是对直肠肛管的末端感觉功能的提高无明显作用. 对于生物反馈的作用还需临床的长期大样本随访和经验积累.

#### 4 参考文献

- 1 Braun J, Treutner KH, Winkeltau G, Heidenreich U, Lerch MM, Schumpelick V. Results of intersphincteric resection of the rectum with direct coloanal anastomosis for rectal carcinoma. *Am J Surg* 1992; 163: 407-412
- 2 Schiessel R, Karner-Hanusch J, Herbst F, Teleky B, Wunderlich M. Intersphincteric resection for low rectal tumours. *Br J Surg* 1994; 81: 1376-1378
- 3 Rullier E, Zerbib F, Laurent C, Bonnel C, Caudry M, Saric J, Parneix M. Intersphincteric resection with excision of internal anal sphincter for conservative treatment of very low rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1168-1175
- 4 Saito N, Ono M, Sugito M, Ito M, Morihiro M, Kosugi C, Sato K, Kotaka M, Nomura S, Arai M, Kobatake T. Early results of intersphincteric resection for patients with very low rectal cancer: an active approach to avoid a permanent colostomy. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 459-466
- 5 Ryn AK, Morren GL, Hallbook O, Sjodahl R. Long-term results of electromyographic biofeedback training for fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1262-1266
- 6 Norton C, Kamm MA. Outcome of biofeedback for faecal incontinence. *Br J Surg* 1999; 86: 1159-1163
- 7 Ko CY, Tong J, Lehman RE, Shelton AA, Schrock TR, Welton ML. Biofeedback is effective therapy for fecal incontinence and constipation. *Arch Surg* 1997; 132: 829-833
- 8 Vaizey CJ, Carapeti E, Cahill JA, Kamm MA. Prospective comparison of faecal incontinence grading systems. *Gut* 1999; 44: 77-80
- 9 Bretagnol F, Rullier E, Laurent C, Zerbib F, Gontier R, Saric J. Comparison of functional results and quality of life between intersphincteric resection and conventional coloanal anastomosis for low rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 832-838
- 10 Teramoto T, Watanabe M, Kitajima M. Per anum intersphincteric rectal dissection with direct

#### ■应用要点

ISR术后的肛门括约肌功能问题可以通过生物反馈治疗来得到改善, 在临床上可以作为常规的治疗手段.

## ■同行评价

本文通过肛门内压力、电刺激物理康复方法即生物反馈训练提高肛门括约肌功能进行研究,具有一定的临床实用价值和理论探索意义。

- colorectal anastomosis for lower rectal cancer: the ultimate sphincter-preserving operation. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: S43-47
- 11 Norton C, Kamm MA. Anal sphincter biofeedback and pelvic floor exercises for faecal incontinence in adults-a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1147-2254
- 12 Solomon MJ, Pager CK, Rex J, Roberts R, Manning J. Randomized, controlled trial of biofeedback with anal manometry, transanal ultrasound, or pelvic floor retraining with digital guidance alone in the treatment of mild to moderate fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 703-710
- 13 Patankar SK, Ferrara A, Levy JR, Larach SW, Williamson PR, Perozo SE. Biofeedback in colorectal practice: a multicenter, statewide, three-year experience. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 827-831
- 14 Sangwan YP, Solla JA. Internal anal sphincter: advances and insights. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1297-1311
- 15 Taylor BM, Beart RW Jr, Phillips SF. Longitudinal and radial variations of pressure in the human anal sphincter. *Gastroenterology* 1984; 86: 693-697
- 16 Ho YH, Tan M, Leong A, Eu KW, Nyam D, Seow-Choen F. Anal pressures impaired by stapler insertion during colorectal anastomosis: a randomized, controlled trial. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 89-95

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 消息 •

## 第三届亚洲大洋洲光生物学大会

**本刊讯** 由亚洲大洋洲光生物学学会发起,中国生物物理学会光生物学专业委员会负责承办的第三届亚洲大洋洲光生物学大会(<http://www.aosp2006.org.cn/>)定于2006-11-17/20在北京举行。会议将讨论和交流包括光化学、光物理、光技术、光感应、时间/节律生物学、光合作用、生物与化学发光、光医学、环境光生物学和紫外辐射效应在内的光生物学领域的所有重要进展,会议还将为与会的光生物学、光医学各个领域的物理学家、化学家、生物学家和临床医生提供相互交流的极好机会。会议可以办理国家 I 类继续教育学分10学分。

## 1 会议安排

会议时间: 2006-11-17报到, 18-20会议; 会议地点: 北京西郊宾馆(三星级), 有关大会报告及15个分会邀请报告的内容请见会议网页<http://www.aosp2006.org.cn/>; 会议工作语言: 英语; 截止日期: (1)论文摘要: 2006-09-15; (2)会前注册: 2006-09-15。

## 2 会议联系人

投稿摘要: 魏舜仪, 100101, 北京朝阳区大屯路15号中国生物物理学会(电话: 010-64889894; 传真: 010-64889892; E-mail: [wsy@moon.ibp.ac.cn](mailto:wsy@moon.ibp.ac.cn))。注册: 王悦, 100101, 北京朝阳区大屯路15号中国生物物理学会(电话: 010-64889894; 传真: 010-64889892; E-mail: [wangyue@sun5.ibp.ac.cn](mailto:wangyue@sun5.ibp.ac.cn))。

## 胆道解剖变异影像与临床手术对比4例

马龙滨, 赵志华, 李宾, 何津, 王新元

马龙滨, 李宾, 何津, 王新元, 华北煤炭医学院附属人民医院肝胆外科 河北省唐山市 063001

赵志华, 华北煤炭医学院附属人民医院超诊科 河北省唐山市 063001

通讯作者: 马龙滨, 063001, 华北煤炭医学院附属人民医院肝胆外科, mayifu1@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-04-26 接受日期: 2006-05-24

### 摘要

本文通过4例胆道解剖变异影像与临床手术对比分析, 提出预防由于胆道解剖变异引起胆道损伤的方法。

**关键词:** 胆道解剖变异; 胆道损伤

马龙滨, 赵志华, 李宾, 何津, 王新元. 胆道解剖变异影像与临床手术对比4例. 世界华人消化杂志 2006;14(25):2571-2572  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2571.asp>

### 0 引言

胆道解剖变异术前诊断困难, 术中判断和治疗决策难度大, 极易引起胆道损伤. 胆道手术者必须认识到胆道的解剖变异较为常见而且复杂, 思想上的重视和严格规范是正确处理胆管变异避免胆管损伤的关键环节<sup>[1]</sup>. 我们通过4例报告, 以引起同道的足够重视.

### 1 病例报告和讨论

例1 硬化性萎缩性胆石性胆囊炎致胆总管结石引起梗阻性黄疸. 女, 67岁, 反复间断右上腹痛3 d, 腹痛加重, 高热, 黄疸1 d, 查体: 巩膜黄染, 右上腹肌卫, 压痛. WBC:  $15 \times 10^9/L$ , N: 0.85. 术前B超CT: 胆囊结石, 胆总管结石, 急诊全麻下手术. 术中探查曾误以为粗大扩张的胆总管结石为“胆囊结石”, 但仔细从文式孔探查未触及胆总管, 实时术中B超引导探查证实为: 硬化性萎缩性胆石性胆囊炎, 扭曲扩张胆总管结石(图1). 变应术式为: 逆行切下胆囊, 还原肝外胆管走行, 行胆总管切开取石术, “T”管引流术.

硬化萎缩性胆囊是因长期慢性炎症, 胆囊壁被硬化的纤维组织取代, 黏膜破坏, 不含胆汁, 胆囊萎缩使肝外胆管受牵拉扭曲, 易致肝外胆



图1 胆囊萎缩牵拉使胆总管受牵拉扭曲扩张. A: 术前CT极易误诊为胆囊结石; B: 术中见胆囊萎缩于胆囊床.

管结石. 本例胆囊仅有0.6 cm大小内含泥沙样结石, 胆囊萎缩于胆囊床上向右上牵拉肝外胆管, 使胆总管走行发生变化, 该囊腔与肝总管, 胆总管融合, 形成三管汇合部的一部分. 术中极易误为扭曲扩张的胆总管结石为胆囊结石而行胆囊切除术, 从而造成胆管损伤. 若解剖所见的胆囊管至十二指肠上缘或后方仍不见肝总管, 则胆总管误认为胆囊管的可能性极大, 不能夹闭或切断<sup>[2]</sup>.

例2 胆囊结石, 胆囊管结石并行肝总管结石引起的梗阻性黄疸. 男, 75岁. 右上腹痛, 高热, 黄疸3 d, 右上腹肌卫, 压痛. WBC:  $18 \times 10^9/L$ , N: 0.90. 术前B超CT: 胆囊结石, 胆总管结石, 在全麻下行急诊手术, 术中探查: 胆囊7 cm×6 cm大小, 壁光滑, 内含结石. 自文式孔探查可触及“胆总管结石”, 逆行切下胆囊, 发现胆囊管止于“胆总管”前壁, 从肝十二指肠韧带右侧穿刺证实为胆总管, 切开取出胆固醇样结石, 向下探查F<sub>10</sub>尿管顺利入十二指肠, 向上探查该管进入胆囊, 未通至左右肝管. 从文式孔探查, 原切开“胆总管”左侧切仍可触及移动结石, 切开取出胆色素样结石, 向下探查F<sub>10</sub>尿管顺利入十二指肠, 向上探查至左右肝管. 该管为肝总管结石. 至此, 方明白, 先前切开之“胆总管”为长胆囊管, 胆囊管行至肝总管前壁后斜行于肝总管右侧, 且两管并行伴结石(图2).

如未向上探查至左右肝管而将长胆囊管结石误为胆总管结石行T管引流势必造成肝总管结石遗漏, 梗阻性黄疸未解决而再次手术. 胆道

### ■背景资料

由于胆道解剖先天性或病理性异常常导致手术引起胆道损伤, 给临床造成不可挽回的局面. 术多重视影像检查, 术中高度重视, 术中实时B超引导对预防胆道损伤有不可低估的作用.

### ■同行评价

胆道解剖变异是导致术中胆管损伤的常见原因,术中时刻警惕胆道变异的存在对预防胆管损伤有重要意义。本文报道了4例胆道变异情况,对临床避免胆管损伤有一定指导意义。

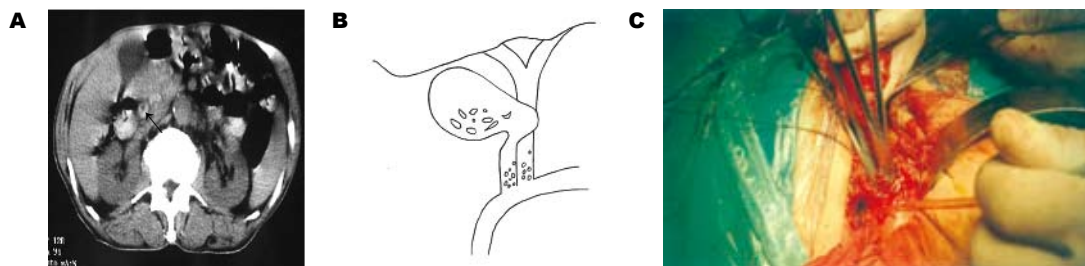


图2 胆囊管肝总管并行伴结石。A: 术前CT片可见双结石影; B: 术中所见; C: 钳子示胆囊管肝总管并行。

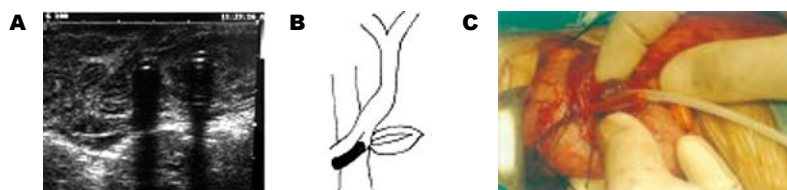


图3 主乳头部结石嵌顿, 副乳头通畅。A: 术中B超示壶腹部双管; B: 术中所见主乳头部结石嵌顿; C: 双管示主乳头, 副乳头。

切开取石, 不应只重视下段胆道通畅, 更应关注上段胆道通畅问题。术前仔细分析CT片可发现双结石影对指导手术有重要意义。

例3 主乳头部结石嵌顿, 副乳头通畅致一过性梗阻性黄疸。男, 65岁。患者1 mo来间断右上腹痛, 时有发热, 全身黄染, 曾在本地医院行抗炎, 保肝治疗, 上述症状消失, 但体质量减轻约5 kg。查体无阳性发现。B超: 胆囊结石, 胆总管扩张1.5 cm, 疑壶腹部占位。MRI: 胆总管扩张, 胆总管下段杯口征。生化系列, 肿瘤系列正常。术前诊断: 胆囊结石, 低位梗阻性黄疸, 壶腹部占位? 在全麻下行剖腹探查, 术中证实: 胆囊结石, 胆总管扩张约1.5 cm, 乳头部2 cm×2 cm光滑不活动肿物(图3)。行胆囊切除术, 胆总管探查术, F<sub>10</sub>尿管顺利入十二指肠, 但乳头部肿物仍可触及, 作Kocher切口, 于乳头部切开十二指肠见乳头部饱满, 呈绒毛球状, 可触及质硬肿物, 再次从胆总管置入F<sub>10</sub>尿管从壶腹部副乳头入十二指肠, 术中B超证实主乳头部肿物为结石嵌顿。经十二指肠切开乳头取出结石, 行T管引流术, 缝合十二指肠切开处, 关腹, 术后恢复良好。胆囊结石继发胆总管结石, 结石向下移动至乳头部嵌顿可引起梗阻性黄疸。如有副乳头通畅黄疸可消退, 此时极易误诊为乳头部肿瘤产生波动性黄疸。本例主乳头结石嵌顿, 副乳头通畅致一过性梗阻性黄疸临床十分罕见, 应高度重视。胆总管向下探查应想到从壶腹部副乳头入十二指肠的可能性, 尤其术前考虑壶腹部占位, 更应重视。术中B超引导探查即可避免副损伤,

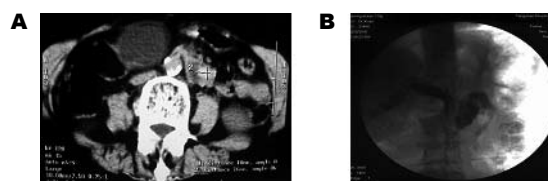


图4 胆总管结石开口于空肠。A: 术前CT示胆总管结石位于脊柱左侧; B: 术后经T管造影胆总管开口于空肠。

假道的形成, 又可直接观察, 应大力提倡。

例4 胆总管结石开口于空肠并梗阻性黄疸。女, 70岁。右上腹痛, 高热, 黄疸1 d, 右上腹肌卫, 压痛。WBC:  $28 \times 10^9/L$ , N: 0.97。血淀粉酶正常。术前B超: 胆总管扩张, 胆总管下段结石, 在全麻下行急诊手术, 术中探查胆囊10 cm×6 cm大小, 壁光滑, 张力高。自文式孔探查未触及胆总管结石, 胆总管扩张直径2 cm, 打开之, 探查胆总管于胰头上斜行左下方走于胰腺后方, 取出结石, F<sub>10</sub>尿管顺利入空肠, 回吸得肠液。置T管引流, 术闭(图4)。该例患者术前B超仅能明确胆总管下段结石, 而术前与CT互补对胆管走行术有了明确判断, 这对术中预防胆管损伤及手术操作方向具有重要指导意义。胆总管开口空肠实属罕见。此型易致ERCP检查或奥狄氏括约肌切开成型术寻找十二指肠乳头困难, 操作失败。

## 2 参考文献

- 1 黄志强. 黄志强胆道外科. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社, 1999: 462-467
- 2 王炳煌. 腹腔镜胆囊切除胆管损伤. 中华肝胆外科杂志 2005; 11: 155-157

电编 张敏 编辑 潘伯荣



# 世界华人消化杂志投稿须知

## 1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD<sub>50</sub>, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。



《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*<sub>max</sub>, *C*<sub>max</sub>, *V*<sub>d</sub>, *T*<sub>1/2</sub> *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD 改为*M<sub>r</sub>* 30 000或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A<sub>r</sub>*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10<sup>12</sup>/L, WBC数用×10<sup>9</sup>/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M<sub>r</sub>*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1

N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B<sub>12</sub>用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10<sup>-3</sup> g与5×10<sup>-7</sup> g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10<sup>-6</sup>; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ<sup>2</sup>; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*ν*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则<sup>0</sup>*P*<0.05, <sup>1</sup>*P*<0.01; 第三套为<sup>2</sup>*P*<0.05, <sup>3</sup>*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1 000-1 500 kg,  $3.5 \pm 0.5$  mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean  $\pm$  SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$  g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 $3.6 \pm 0.4$  kg,过多的位数并无意义。又如 $8.4 \pm 0.27$  cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12; 1985年4月,写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 $\leq 100$ ,百分数到个位;  $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$ ,百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如:张旭晨,梅立新,承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如:张旭晨,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。1994年北京中医药大学硕士,讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

### 3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为:先名,后姓;首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号。格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China  
基金资助项目 格式如: Supported by National

World Journal of Gastroenterology  
自2005-01-01起为周刊发行,每月7、14、21、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号: 82-261。WJG出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征。如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准。如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 $P$ ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨,高瑞丰,李炳庆,马连生,梅立新,吴玉珍,刘凤芹,廖振林.胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言;1 材料和方法,1.1 材料,1.2 方法;2 结果;3 讨论;4 参考文献。序号一律左顶格写,后空1格写标题;2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相

关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短,但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述,以前发表过的方法引用参考文献即可,有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明,应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述,也不应是大量文献的回顾。

图表 图表的数量要精选。表应有表序和表题,并有足够具有自明性的信息,使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头,表内非公知通用缩写应在表注中说明,表格一律使用三线表(不用竖线),在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注,以使其容易被读者理解,所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图,统一用一个注解分别叙述。如:图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$  ( $P>0.05$  不注)。如同一表中另有一套 $P$ 值,则 $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第3套为 $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ 。 $P$ 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$ ,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……;

PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准,引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达,请附引用文献网上摘要打印件,包括PMID编号(摘要的左下方)。按顺序编号装订,并考入磁盘内。在引用参考文献页码末尾注明PMID编号;无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者,请附首页复印件)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

#### 4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅。

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的。

投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员。审稿过程大约需要1 mo。

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理。录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改。当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

4.5 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献。

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>。邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。

世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893  
Email: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行。1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号。

## 致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 主治医师  
中山大学附属第一医院消化内科

白文元 教授  
河北医科大学第二医院消化内科

曹洁 副教授  
第二军医大学微生物学教研室

曹志成 科学主任(医学)  
伊利沙伯医院

陈海龙 教授  
大连医科大学附属第一医院 院办

陈红松 副研究员  
人民医院肝病研究所

陈卫昌 教授  
苏州大学附属第一医院消化内科

董蕾 教授  
西安交通大学第二附属医院消化内科

房静远 教授  
上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

高润平 教授  
吉林大学第一医院肝病科

戈之铮 教授  
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

龚国忠 教授  
中南大学湘雅二医院肝病研究中心

黄晓东 副主任医师  
武汉市中心医院消化内科

黄志勇 副教授  
华中科技大学同济医院普外科

李靖 副教授  
重庆市第三军医大学附属新桥医院肝胆外科

李胜 研究员  
山东省肿瘤防治研究院

李旭 副教授  
广东省广州市南方医院急诊科

李延青 教授  
山东大学齐鲁医院消化科

刘彬彬 副研究员  
复旦大学附属中山医院

禄韶英 主治医师  
西安交通大学医学院第一附属医院普外科11病区

吕宾 教授  
浙江中医学院附属医院消化科

秦环龙 教授  
上海交通大学附属第六人民医院外科

施瑞华 教授  
南京医科大学第一附属医院消化科

谭学瑞 教授  
汕大医学院第一附属医院

王春友 教授  
华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心

王鲁 副教授  
复旦大学附属中山医院肝外科、复旦大学肝癌研究所

王晓艳 副教授  
中南大学湘雅三医院消化内科

王学美 研究员  
北京大学第一医院中西医结合研究室

王志刚 副主任医师  
上海市第六人民医院普外科

阎晓初 教授  
第三军医大学西南医院病理学研究所

杨林 副研究员  
中山大学附属第三医院感染病科

杨希山 教授  
广东省中医药局

姚登福 教授  
南通大学附属医院分子医学中心

伊力亚尔·夏合丁 教授  
新疆医科大学第一附属医院胸外科

阴赅宏 研究员  
首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科

张锦生 教授  
复旦大学上海医学院病理学系

周学文 教授  
辽宁中医学院附属医院消化内科

邹小明 教授  
哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科