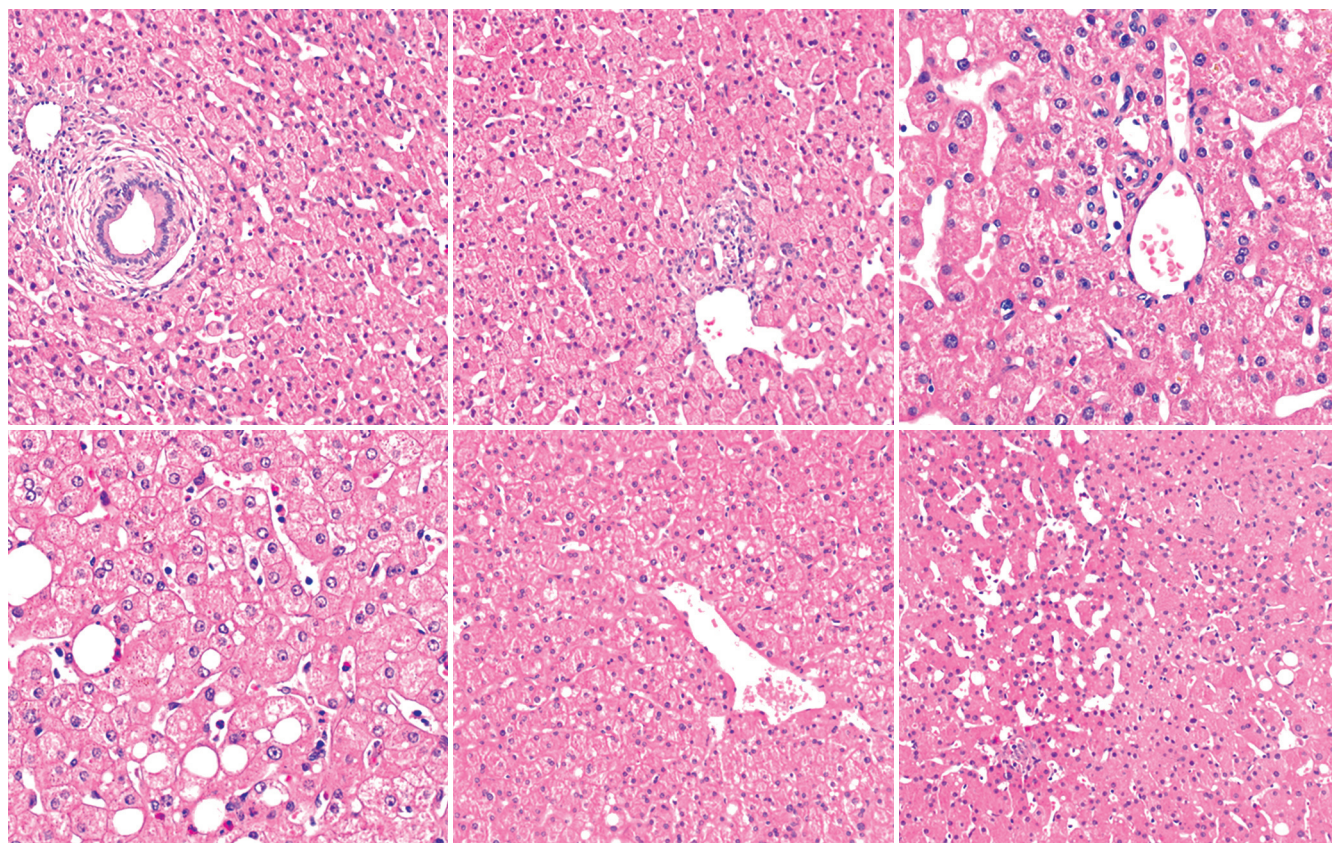


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 11 月 28 日 第 14 卷 第 33 期 (Volume 14 Number 33)



33 / 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
匡安仁教授	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
刘杞教授	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	阴赅宏研究员	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	展玉涛副主任医师	北京
彭曦副研究员	重庆	王晓艳副教授	长沙	张柏和教授	上海
彭心宇教授	石河子	王新月教授	北京	张方信主任医师	兰州
彭志海教授	上海	王学美研究员	北京	张吉翔教授	南昌
秦波教授	重庆	王正康教授	北京	张锦生教授	上海
秦成勇教授	济南	王志刚副主任医师	上海	张军教授	西安
秦环龙教授	上海	王忠裕教授	大连	张青云研究员	北京
钱建民教授	上海	卫洪波教授	广州	张群华教授	上海
秦仁义教授	武汉	魏经国教授	西安	张水军教授	郑州
卿三华教授	广州	魏来教授	北京	张绪清副教授	重庆
邱双健副教授	上海	闻勤生教授	西安	张学教授	北京
邱伟华副主任医师	上海	吴德全教授	哈尔滨	张宗明教授	北京
任超世研究员	天津	吴建国教授	武汉	赵桂珍教授	沈阳
任建安教授	南京	吴君主任医师	贵阳	赵景民教授	北京
任建林教授	厦门	吴萍主任医师	徐州	赵连三教授	成都
邵成浩讲师	上海	吴志勇教授	上海	赵平副教授	上海
邵先玉教授	泰安	席启主任医师	大同	郑民华教授	上海
邵永孚教授	北京	夏建川研究员	广州	郑鹏远教授	郑州
沈洪教授	南京	向德兵讲师	重庆	智发朝教授	广州
沈琳副教授	北京	肖恩华教授	长沙	周伯平教授	深圳
沈薇教授	重庆	谢晓华副教授	广州	周丁华主任医师	北京
施诚仁教授	上海	徐爱民副教授	上海	周国雄主任医师	南通
施瑞华教授	南京	徐迎新研究员	北京	周士胜教授	大连
石统东副教授	重庆	许春舫主任医师	苏州	周霞秋教授	上海
宋世兵主任医师	北京	徐存拴教授	新乡	周晓东研究员	广州
宋振顺教授	西安	徐大华副主任医师	北京	庄林主任医师	昆明
孙诚谊教授	贵阳	徐德忠教授	西安	朱传武副主任医师	苏州
孙殿兴主任医师	石家庄	徐列明教授	上海	朱春兰主任医师	哈尔滨
孙家邦教授	北京	徐小元教授	北京	朱立元教授	深圳
孙秀发教授	武汉	许玲副教授	上海	朱人敏教授	南京
孙学英教授	哈尔滨	许文燮教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
邵升副教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江	左国营副主任药师	昆明
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 11 月 28 日 第 14 卷 第 33 期 (总第185期)

述 评

3161 重视我国胰腺癌的研究现状及发展趋势 郭晓钟

基 础 研 究

3163 艾灸足三里、梁门穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的干预作用

易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平

3169 亚砷酸联合重组腺病毒Ad-IκBαM对肝细胞癌的治疗作用

刘丹, 刘冰熔, 胡丽红, 杜雅莉, 裴风华, 吕志武, 关景明

3175 髓源性树突状细胞过继转移诱导1型糖尿病小鼠免疫耐受及其机制

张程亮, 向明, 邹晓蕾, 彭佳蓓

3180 缺氧对大鼠肝细胞转化生长因子 β_1 表达的影响

李侠, 詹皓, 齐颖, 王琮, 赵安东, 王喆, 笕冀平, 施新猷

3184 短发夹状RNA对人肝癌细胞环氧合酶-2的抑制作用

王华枫, 徐可树, 钱伟, 汪步海

3190 cagA基因缺失的中国幽门螺杆菌突变菌株的构建及鉴定

黄志刚, 段广才, 范清堂, 黄学勇

临 床 研 究

3195 原发性肝癌患者血清leptin, VEGF和AFP表达的意义

侯振江, 王秀文, 张丽华, 周秀艳, 戴殿禄, 闫金辉

3201 HSP70, HSP90在结肠癌中表达及其和生物学行为的相关性

陈怡, 冉志华, 陈翔, 朱长清, 萧树东

3206 癌基因C-erbB-2在结直肠癌中的表达及其与浸润转移的相关性

李巍, 田素礼, 李季

文 献 综 述

3212 中药复方辅助治疗肝外阻塞性黄疸的研究概况 张喜平, 仇凤梅, 倪杰

3215 RNA干扰Survivin基因治疗大肠癌作用机制的研究进展 张志宏, 韩盛奎

3219 抗细胞凋亡基因及其与大肠癌关系的研究进展 米丽娜, 关景明, 吕丽艳

研 究 快 报

3224 血管紧张素 II 拮抗剂在大鼠应激性溃疡中的作用

窦勇鹰, 谢立群, 李俊美, 华建平, 海鸥

3228 B和C基因型HBV核心蛋白促细胞凋亡的比较

温志立, 谭德明, 成军, 杨永峰, 刘国珍, 刘洪波

临 床 经 验

3233 Semaphorin6D在胃癌中的表达及其意义

赵向阳, 陈凇, 许倩, 李玉红

3237 MMP-7与Fas蛋白在胃癌组织中的表达及意义

胡端敏, 王少峰, 冯一中

3241 HBeAg阴性和阳性慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA水平与肝组织炎症的关系

李仕周, 蒋永芳

附 录	3245 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	3250 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>3174 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知</p> <p>3179 第五届中国百种杰出学术期刊评选揭晓</p> <p>3183 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》</p> <p>3211 2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表</p> <p>3232 世界华人消化杂志关于作者署名的声明、国际会议</p> <p>3236 2007中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知</p> <p>3244 中国学术期刊综合引证报告(2006)</p>
封面故事	<p>Fritz Dünschede, Kirsten Erbes, Achim Kircher, Stefanie Westermann, Joachim Seifert, Arno Schad, Kempfski Oliver, Alexandra K Kiemer, Junginger Theodor.</p> <p>Reduction of ischemia reperfusion injury after liver resection and hepatic inflow occlusion by α-lipoic acid in humans.</p> <p><i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(42): 6812-6817</p> <p>http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/6812.asp</p>
国际会议	<p>New York Society for Gastrointestinal Endoscopy</p> <p>13-16 December 2006</p> <p>New York</p> <p>www.nysge.org</p> <p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer</p> <p>20-23 June 2007</p> <p>Barcelona</p> <p>Imedex</p> <p>meetings@imedex.com</p>

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2006-11-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>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 王晓瑜 电子编辑 张敏 李琪 本期责任编辑 张焕兰</p>		<p>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: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</p> <p>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)</p> <p>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</p>	<p>《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。</p> <p>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。</p> <p>2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有</p>
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

World Chinese Journal of Digestology

November 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 33

EDITORIAL	<p>3161 Recognition of present status and progressing tendency of pancreatic cancer in China <i>Guo XZ</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>3163 Effect of moxibustion at <i>Zusanli</i> and <i>Liangmen</i> point on gastric mucosal cell apoptosis in rats with stress ulcer <i>Yi SX, Peng Y, Chang XR, Peng N, Yan J, Lin YP</i></p> <p>3169 Therapeutic effect of arsenious acid combined with recombinant adenovirus Ad-IkBaM on hepatocellular carcinoma <i>Liu D, Liu BR, Hu LH, Du YJ, Pei FH, Lv ZW, Guan JM</i></p> <p>3175 Immune tolerance and its mechanism induced by adoptive transfer of bone marrow-derived dendritic cells in mice with insulin-dependent diabetes mellitus <i>Zhang CL, Xiang M, Zou XL, Peng JB</i></p> <p>3180 Effects of anoxia on expression of transforming growth factor-β_1 in rat liver <i>Li X, Zhan H, Qi Y, Wang Q, Zhao AD, Wang Z, Da JP, Shi XY</i></p> <p>3184 Silencing cyclooxygenase-2 gene by construction of eukaryotic expression vector expressing short hairpin RNA in human hepatocellular carcinoma cells <i>Wang HF, Xu KS, Qian W, Wang BH</i></p> <p>3190 Construction and identification of Chinese mutant <i>Helicobacter pylori</i> strain with absent expression of cagA gene <i>Huang ZG, Duan GC, Fan QT, Huang XY</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3195 Clinical significance of serum leptin, vascular endothelial growth factor and alpha-fetoprotein expression in hepatocellular carcinoma <i>Hou ZJ, Wang XW, Zhang LH, Zhou XY, Dai DL, Yan JH</i></p> <p>3201 Expression of heat shock protein 70 and 90 and their relationships with biological behaviors of colon cancer <i>Chen Y, Ran ZH, Chen X, Zhu CQ, Xiao SD</i></p> <p>3206 Expression of ontogene C-erbB-2 and its correlations with invasion and metastasis in colorectal carcinoma <i>Li W, Tian SL, Li J</i></p>
REVIEW	<p>3212 Progress in adjunctive therapy of the complex prescription in extrahepatic obstructive jaundice <i>Zhang XP, Qiu FM, Ni J</i></p> <p>3215 Mechanism in RNA interference of Survivin gene in treatment of colorectal carcinoma <i>Zhang ZH, Han SX</i></p> <p>3219 Antiapoptosis genes and their correlations with the large intestinal carcinoma <i>Mi LN, Guan JM, Lv LY</i></p>

RAPID COMMUNICATION	<p>3224 Role of angiotensin II antagonist in the formation of stress ulcer in rats <i>Dou YY, Xie LQ, Li JM, Hua JP, Hai O</i></p> <p>3228 Comparison of effect on hepatocellular apoptosis between core proteins of hepatitis B virus genotype B and C <i>Wen ZL, Tan DM, Cheng J, Yang YF, Liu GZ, Liu HB</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3233 Expression of Semaphorin6D and its significance in gastric carcinoma <i>Zhao XY, Chen L, Xu Q, Li YH</i></p> <p>3237 Expression of matrix metalloproteinase-7 and Fas and their significances in gastric carcinoma <i>Hu DM, Wang SF, Feng YZ</i></p> <p>3241 Relationship between liver pathologic histology and levels of serum hepatitis B virus DNA in patients with HBeAg-positive and -negative chronic hepatitis B <i>Li SZ, Jiang YF</i></p>
APPENDIX	3245 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	3250 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Dünschede F, Erbes K, Kircher A, Westermann S, Seifert J, Schad A, Oliver K, Kiemer AK, Theodor J.</i></p> <p>Reduction of ischemia reperfusion injury after liver resection and hepatic inflow occlusion by α-lipoic acid in humans.</p> <p><i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(42): 6812-6817</p> <p>http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/6812.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>New York Society for Gastrointestinal Endoscopy</p> <p>13-16 December 2006</p> <p>New York</p> <p>www.nysge.org</p> <p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer</p> <p>20-23 June 2007</p> <p>Barcelona</p> <p>Imedex</p> <p>meetings@imedex.com</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 November 28, 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: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

重视我国胰腺癌的研究现状及发展趋势

郭晓钟

郭晓钟, 沈阳军区总医院消化内科 辽宁省沈阳市 110024
郭晓钟, 教授, 博士生导师, 现任沈阳军区总医院消化内科主任, 国家自然科学基金第八届学组成员, 中华医学会消化病分会委员, 全军消化疾病专业委员会副主任委员, 辽宁省消化病学会副主任委员、沈阳军区消化病学会主任委员。

通讯作者: 郭晓钟, 110024, 辽宁省沈阳市沈河区文化路83号, 沈阳军区总医院消化内科. guoxiaozhong1962@163.com

电话: 024-23056020 传真: 024-23051113

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-19

摘要

胰腺癌是一类恶性程度高、预后差的肿瘤。临床表现缺乏特征性, 故诊断及治疗都极为困难。与胰腺癌相关的基础、临床研究已经成为我国胰腺癌研究方面的重大课题。本文将胰腺癌的发病机制及诊断等方面的研究的现状作一综述。

关键词: 胰腺癌; 发病机制; 诊断

郭晓钟. 重视我国胰腺癌研究现状及发展趋势. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3161-3162

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3161.asp>

0 引言

胰腺癌具有起病隐匿, 恶性程度高, 预后差、生存率低等特点, 临床表现缺乏特征性, 故诊断及治疗都极为困难。此癌平均生存期2-3 mo, 1 a生存率为8%, 5 a生存率仅为1%-3%。流行病学研究显示胰腺癌发病率及死亡率分别从1960年代的第22位和第15位上升至1990年代的第5位和第6位; 死因中男性为6-8位, 女性为9-10位^[1]。发病率以40-59岁年龄组最高, 为57.4%, 死亡率则以60岁以上年龄组最高, 为69.62%, 这与国外发病率及死亡率以60岁以上居多有所不同^[2]。死亡率的地区差别亦十分显著, 其中上海市最高, 为7.21/10万, 东北及华北地区报告死亡率为其他地区的4倍, 城市报告死亡率为农村的2.42-4.68倍^[3]。因此, 与胰腺癌相关的基础、临床研究已经成为我国胰腺癌研究方面的重大课题。

1 病因和发病机制

胰腺癌的发病率及死亡率上升的原因尚不清楚, 可能是多种因素综合作用的结果, 包括吸烟、

饮酒及芳香胺类物质摄入过多; 有胰腺癌家族史; 年龄在60岁以上突发糖尿病者; 慢性胰腺炎, 特别是慢性家族性胰腺炎和钙化性胰腺炎患者; 胰腺导管内乳头状黏液瘤患者; 遗传疾病, 尤其是家族性腺瘤性息肉患者; 远端胃大部切除20 a以上者等, 相关明确病因尚待深入研究。

胰腺癌发病的确切机制亦不清楚。近年研究表明, 肿瘤相关的促癌基因、抑癌基因的激活、失活和突变等均与胰腺癌的发生、发展和转移等密切相关, 这些基因包括K-ras, p53, DPC4, KA II 及端粒酶等^[4]。研究表明, 胰腺癌组织中, DPC4外显子纯合性缺失率为28.26%, KA II mRNA无转移者在2.4 kb处存在明显的杂交信号, 转移者杂交信号较弱。端粒酶活性及端粒酶基因在胰腺癌的检出率较高, 但二者变化淋巴转移、组织学分级及临床分级等无关、提示端粒酶激活可能和K-ras突变一样是胰腺癌发生的早期事件, 而p53失活为晚期事件。

2 临床诊断

胰腺癌的诊断主要依靠肿瘤标志物、组织学或细胞学和影像学检查等。我国自行研制具有一定临床应用价值的肿瘤标志物有YPC3和SC6, 其他如CA19-9, CA242, CA50, CA125等, 总阳性率为25%-90%, 多种抗体联合检测可将诊断的敏感性和特异性提高至90.2%及93.5%。采用PCR-SSCP方法检测粪便标本中p53基因第5-8外显子突变, 对胰腺癌诊断有一定意义^[5]。经内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)术后收集胰液中脱落细胞和体表超声引导下胰腺穿刺活检细胞检查诊断的敏感性、特异性和准确性分别是88.4%, 100%和88.4%。近年来采用内镜超声检查(endoscopic ultrasonography, EUS)引导下细针穿刺活检(fine needle aspiration, FNA), 明显改善组织细胞学检查敏感性和特异性。常用的影像学检查符合率72%-94%, 以EUS及胰管内超声(intraductal ultrasonography, IDUS)高^[6-7]。此外我国学者亦尝试应用彩色多普勒超声及电子束CT

■背景资料

胰腺癌恶性程度高, 发病隐匿, 早期常无症状, 诊断后多属晚期, 手术切除率低, 化疗效果差, 是目前愈后较差的肿瘤之一。因此, 与胰腺癌相关的基础、临床研究具有重要意义。

对胰腺癌患者血管侵犯程度及肿瘤的可切除性作出判断^[8]。近年来,一些新的扫描技术的应用提高了对小胰癌的检出率,包括普通CT双期增强扫描、多层螺旋CT双期增强扫描、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)屏气T1加权成像及其脂肪抑制、T2加权成像及其脂肪抑制、Gd-DTPA动态增强、磁共振血管成像(magnetic resonance angiography, MRA)等^[9-10]。

胰腺癌的早期诊断是临床医生非常关注的重要课题^[11]。早期诊断的主要目的是发现早期胰腺癌或小胰癌,但临床常用的CA19-9等肿瘤标志物对胰腺癌的诊断已属晚期,基因检测尚处于基础研究阶段,影像学技术如EUS、IDUS、经口胰管镜检查(PPS)及磁共振胰胆管成像(MRCP)等的综合应用亦不十分肯定,为此我国学者提出了早期诊断策略,即对上腹不适和上腹痛等症状的高危人群,除进行有关的实验室检查外,首选B超和CT,随后进行MRCP检查,同时收集胰液或经皮穿刺针吸进行细胞学、组织学和有关肿瘤标志物的检测,并结合IDUS、胰管镜等多种影像学检查进行综合分析,但早期诊断仍是十分困难的问题,故应当重视与胰腺癌发生密切相关的癌前病变的研究^[12-15]。

3 展望

从我国现有的研究情况看,所取得的这些成绩不仅为全面启动胰腺癌的研究奠定了坚实的基础,而且有的研究已是异军突起,显示出良好的发展前景。但仍有许多问题尚待解决,包括:缺乏对吸烟和嗜酒等与胰腺癌发生关系相关知识的宣传和普及;缺乏对高发人群普查筛选的有关研究资料,多数临床医师忽视对与胰腺癌有关的早期症状的认识和鉴别;缺乏对早期胰腺癌的警惕性,包括对胰腺癌早期症状的认识不足及缺乏早期诊断敏感及特异的标志物;中晚期患者的总体治疗效果较差,生存率提高不明显;胰腺癌的相关基础研究仍较薄弱,与国外差距较大;缺乏对胰腺癌诊断及治疗效果与费用的评价标准;我国有关胰腺癌诊治的临床研究存在着样本数量少、设计不合理、临床实际应用价值低等缺陷。目前国内外的分子克隆、基因芯片、人类基因组计划及现代分子生物学等的迅猛发展为胰腺癌的系统及深入研究奠定了良好的方法学基础。相信我国学者对上述问题将会引起足够的认识,积极研究制定相应对策,

以尽快提高我国胰腺癌的总体诊治水平^[16-20]。

4 参考文献

- 1 郭绍举,刘禹翔,李健,谢伟,黄明河. 胰腺癌的治疗进展. 中国临床医学 2004; 11: 9-10
- 2 张延龄,倪泉兴. 应重视胰腺癌的早期诊断和综合治疗. 中华医学杂志 2000; 80: 245-246
- 3 Lowenfels AB, Maisonneuve P. Risk factors for pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2005; 95: 649-656
- 4 郭晓钟,刘志凡,安戎,赵学良,李方华,王凯庚. 胰腺癌相关Sc6抗原对胰腺癌术前诊断的初步临床研究. 中华医学杂志 1993; 73: 26-28
- 5 孟凡亭,李占元. 胰腺癌组织中bcl-2、NDPK/nm23和p16蛋白表达的意义. 中华普通外科杂志 2000; 15: 463-465
- 6 杨德同. 胰腺癌血清肿瘤标志物检测的临床意义和研究近况. 医师进修杂志 2005; 28: 7-9
- 7 Liu XL, Dai CC, Miao Y, Du JH, Zhang ZS, Chen SZ. Detection of k-ras gene point mutation in fine needle aspiration and pancreatic juice by sequence special primer method and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 917-919
- 8 陈兴玲,朱萱,张焜和. K-ras基因、胰腺癌缺失基因4变异诊断胰腺癌的价值. 中华消化杂志 2004; 24: 53-54
- 9 孙立波,田力,张德恒,郑泽霖,何尔斯基. 白细胞介素12基因转染抑制人胰腺癌细胞血管生成及肿瘤的生长. 中华普通外科杂志 2000; 15: 750-751
- 10 Chen QK, Yuan SZ, Zeng ZY, Huang ZQ. Tumoricidal activation of murine resident peritoneal macrophages on pancreatic carcinoma by interleukin-2 and monoclonal antibodies. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 287-289
- 11 Goggins M. Molecular markers of early pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4524-4531
- 12 张圣道,王建承. 胰腺癌诊治现状与展望. 中国普外基础与临床杂志 2000; 7: 349-350
- 13 金忱,倪泉兴,张群华,赵殿辉,傅德良,姚琪远,虞先俊,张妞,沈天真,张延龄. 电子束CT及三维成像对胰头癌可切除性的评价. 中华普通外科杂志 2000; 15: 714-716
- 14 杨秀疆,陈士葆. 内镜超声检查对胰腺癌的诊断价值. 中国新药与临床杂志 2004; 23: 54-56
- 15 吴文铭,赵玉沛. 胰腺癌物理治疗的进展及评价. 消化外科 2005; 4: 73-76
- 16 Guo X, Friess H, Graber HU, Kashiwagi M, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW. KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res* 1996; 56: 4876-4880
- 17 Guo XZ, Friess H, Shao XD, Liu MP, Xia YT, Xu JH, Buchler MW. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 866-871
- 18 Guo XZ, Xu JH, Liu MP, Kleeff J, Ho CK, Ren LN, Li HY, Koninger J, Cui ZM, Wang D, Wu CY, Zhao JJ, Friess H. KAI1 inhibits anchorage-dependent and -independent pancreatic cancer cell growth. *Oncol Rep* 2005; 14: 59-63
- 19 Guo XZ, Friess H, Maurer C, Berberat P, Tang WH, Zimmermann A, Naef M, Graber HU, Korc M, Buchler MW. KAI1 is unchanged in metastatic and nonmetastatic esophageal and gastric cancers. *Cancer Res* 1998; 58: 753-758
- 20 侯阿娜,韩圣. 胰腺癌的诊断和治疗指针. 日本医学介绍 2004; 25: 82-85

艾灸足三里、梁门穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的干预作用

易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平

易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平, 湖南中医药大学
针灸推拿学院 湖南省长沙市 410007
易受乡, 1970年湖南医学院医疗系本科毕业, 主要从事针灸治
病机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30572310

国家973计划中医理论基础研究专项, No. 2005CB523306-9

通讯作者: 易受乡, 410007, 湖南长沙市韶山中路113号, 湖南中
医药大学针灸推拿学院. yishouxiang@yahoo.com.cn

电话: 0731-5381161

收稿日期: 2006-06-30 接受日期: 2006-09-01

Effect of moxibustion at Zusanli and Liangmen point on gastric mucosal cell apoptosis in rats with stress ulcer

Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Xiao-Rong Chang, Na Peng,
Jie Yan, Ya-Ping Lin

Shou-Xiang Yi, Yan Peng, Xiao-Rong Chang, Na Peng,
Jie Yan, Ya-Ping Lin, College of Acupuncture and Mas-
sage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine,
Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of
China, No. 30572310, and the Major State Basic Research
Development Program of China (973 Program), No.
2005CB523306-9

Correspondence to: Shou-Xiang Yi, College of Acupunc-
ture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese
Medicine, Changsha 410007, Hunan Province,
China. yishouxiang@yahoo.com.cn

Received: 2006-06-30 Accepted: 2006-09-01

Abstract

AIM: To explore the effects of moxibustion at Zusanli and Liangmen point on gastric mucosal cell apoptosis in rats with stress-induced ulcer, and analyze the relationship between those effects and the plasma content of dopamine (DA), mucosal expression of endothelin (ET).

METHODS: Sixty healthy Sprague Dawley rats were randomly assigned into 4 groups, named group A, B, C and D, respectively. The animal model of stress ulcer was established by water immersion and restraint stress. The rats in group A, B, and D served as the restraint, model, and non-acupoint controls, while those in group C received moxibustion at Zusanli and Liangmen

point. Immunohistochemical method was used to detect the apoptosis index (AI, $\times 10^{-6}/\mu\text{m}^2$) in all the groups, and biological signal analyzer was applied to measure gastric mucosal blood flow (GMBF). The plasma content of DA was examined by high efficiency liquid chromatography and the mucosal expression of ET was detected by radioimmunoassay.

RESULTS: Moxibustion at Zusanli and Liangmen point significantly decreased the gastric injury, plasma content of DA and mucosal expression of ET as well as the apoptosis of gastric mucosal cells, while markedly increased GMBF. In comparison with those in group A, the UI (26.80 ± 9.81 vs 12.00 ± 5.94 , $P < 0.01$), plasma DA content (9.97 ± 3.69 $\mu\text{g/L}$ vs 4.54 ± 2.61 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$), mucosal ET expression (361.469 ± 98.080 ng/L vs 149.205 ± 94.1425 ng/L, $P < 0.01$) and AI (9.65 ± 4.19 vs 4.36 ± 2.60 , $P < 0.01$) were significantly increased, but GMBF (139.489 ± 33.133 mL/min vs 377.090 ± 85.840 mL/min, $P < 0.01$) was decreased in group B. However, the values of UI and AI were obviously lower in group C than those in group B and D (UI: 14.10 ± 5.42 vs 26.80 ± 9.81 , 26.20 ± 7.23 , $P < 0.01$; AI: 3.00 ± 1.58 vs 9.65 ± 4.19 , 8.20 ± 5.17 , $P < 0.01$), but GMBF was higher in group C (316.552 ± 85.469 mL/min vs 139.489 ± 33.133 , 141.512 ± 58.450 mL/min, $P < 0.01$). the ulcer index (UI), the content of ET in gastric mucosa and DA in plasma decreased, GMBF increased, AI of gastric mucosa cells decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Furthermore, the plasma DA and mucosal ET levels were significantly lower in group C than those in group B (DA: 4.41 ± 2.48 $\mu\text{g/L}$ vs 9.97 ± 3.69 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$; 148.271 ± 69.113 ng/L vs 361.469 ± 98.080 ng/L, $P < 0.01$), but they had no marked difference with those in group D.

CONCLUSION: Moxibustion at Zusanli and Liangmen point can resist the stress-induced injury, and the mechanism may be associated with the decrease of plasma DA level and gastric mucosal ET expression, improvement of GMBF and inhibition of gastric cell apoptosis.

■背景资料

正常胃黏膜细胞存在程序性死亡,即细胞凋亡,藉以清除衰老的细胞,维持胃黏膜生理平稳和完整性。人体各组织细胞数目的维持是由细胞增殖与凋亡之间平衡来实现的。而应激性损伤所致的胃黏膜病变常常伴随着大量细胞凋亡的发生。寻求一种无毒副作用的方法,抑制细胞凋亡,对抗应激性损伤,是保护胃黏膜可行途径。针灸介入可以影响细胞凋亡。已有研究表明,针刺可抑制缺血引起的神经系统细胞和心肌细胞凋亡的发生。

■相关报道

近年来关于针灸对胃黏膜损伤保护作用机制的研究已有不少报道,不少作者从神经机制的调节、胃肠激素的影响、胃黏膜血流量的改善、ET及NO等体液因子作用、对抗氧自由基、胃壁屏障的加强等方面揭示了针灸对胃黏膜损伤保护作用的可能机制。新近有作者发现针灸足三里等穴还可通过诱导热休克蛋白表达,促进肠三叶因子的释放等环节,对抗胃黏膜损伤,促进损伤后的胃黏膜修复,实现对胃黏膜的保护作用。更有作者从EGF受体及其受体后信息转导通路,探讨了针灸对胃黏膜保护的细胞及分子生物机制。

Key Words: Moxibustion; *Zusanli*; *Liangmen*; Stress ulcer; Gastric mucosal blood flow; Endothelin; Dopamine; Cell apoptosis

Yi SX, Peng Y, Chang XR, Peng N, Yan J, Lin YP. Effect of moxibustion at *Zusanli* and *Liangmen* point on gastric mucosal cell apoptosis in rats with stress ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3163-3168

摘要

目的:探讨艾灸足三里、梁门穴对应激性溃疡胃黏膜细胞凋亡的影响,分析其与血浆多巴胺(DA)、胃黏膜内皮素(ET)的关系,揭示艾灸足三里、梁门穴对抗应激性损伤,进而保护胃黏膜的机制。

方法:SD大鼠60只随机分为4组,即束缚对照组、模型组、艾灸足三里和梁门穴组、艾灸非穴点对照组,每组15只。束缚水浸应激法造模,免疫组化方法测定细胞凋亡指数($\times 10^{-6}$ 个/ μm^2)。采用生物信号分析仪检测胃黏膜血流量(GMBF),高效液相色谱法测定血浆DA含量,放射免疫法测定胃黏膜ET含量。

结果:预先艾灸足三里、梁门穴可显著降低随后的应激性胃黏膜损伤指数,降低胃黏膜ET和血浆DA含量,增加胃黏膜血流量,降低胃黏膜细胞凋亡指数。造模后,B组UI值(26.80 ± 9.81 vs 12.00 ± 5.94 , $P < 0.01$)、血浆DA(9.97 ± 3.69 $\mu\text{g/L}$ vs 4.54 ± 2.61 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$)、胃黏膜ET(361.469 ± 98.080 ng/L vs 149.205 ± 94.1425 ng/L , $P < 0.01$)以及凋亡指数(9.65 ± 4.19 vs 4.36 ± 2.60 , $P < 0.01$)显著高于A组,而GMBF低于A组(139.489 ± 33.133 mL/min vs 377.090 ± 85.840 mL/min , $P < 0.01$);C组UI值、凋亡指数显著低于B组和D组(UI: 14.10 ± 5.42 vs 26.80 ± 9.81 , 26.20 ± 7.23 , $P < 0.01$);凋亡指数: 3.00 ± 1.58 vs 9.65 ± 4.19 , 8.20 ± 5.17 , $P < 0.01$),而GMBF高于B组和D组(316.552 ± 85.469 mL/min vs 139.489 ± 33.133 , 141.512 ± 58.450 mL/min , $P < 0.01$);C组血浆DA含量及胃黏膜ET显著低于B组(DA: 4.41 ± 2.48 $\mu\text{g/L}$ vs 9.97 ± 3.69 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$; 148.271 ± 69.113 ng/L vs 361.469 ± 98.080 ng/L , $P < 0.01$),但与D组比较无显著性差异($P > 0.05$)。

结论:艾灸足三里、梁门穴预处理可减轻束缚水浸应激所造成大鼠胃黏膜的损伤程度,这一作用可能是通过降低血浆DA和胃黏膜ET含量,增加胃黏膜血流量,抑制细胞凋亡实现的。

关键词: 艾灸; 足三里穴; 梁门穴; 应激性溃疡; 胃黏膜血流量; 内皮素; 多巴胺; 细胞凋亡

易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平. 艾灸足三里、梁门穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的干预作用. *世界华人消化杂志* 2006;14(33):3163-3168

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3163.asp>

0 引言

应激性溃疡(SU)的发生主要是机体的神经内分泌失调,使胃黏膜保护机制减弱,同时损伤因素相对增强而导致的。其中胃黏膜缺血是SU的主要病理生理改变^[1]。应激状态下,外周交感-肾上腺髓质系统强烈兴奋,儿茶酚胺释放增多,同时糖皮质激素分泌增加,他可增强儿茶酚胺对血管的反应^[2],从而引起胃肠黏膜血管痉挛,导致胃黏膜缺血、缺氧。另一方面,应激状态下胃黏膜更新能力异常,应激性损伤所致的胃黏膜病变常伴随着大量细胞凋亡的发生。胃黏膜细胞凋亡的增强可能是消化性溃疡的重要发病机制之一^[3]。本课题组在以往的研究中已证明,针刺足阳明经穴对胃黏膜细胞损伤有一定保护作用^[4-5]。关于艾灸足阳明经穴对胃黏膜损伤的影响研究较少。本实验选取足三里和梁门两穴,观察艾灸预处理是否可减轻应激所造成的胃黏膜细胞凋亡,并分析其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠60只,雌雄各半,体质量200-250 g,由湖南农业大学动物科技学院提供。施灸材料为苏州东方艾绒厂生产的“神灸300灸”艾炷(型号:东方一型),直径0.5 m-0.5 cm,高0.8 m-0.8 cm。DA标准品(由美国Sigma公司提供);ET检测试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免所);细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德公司);棕黄色DAB显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);TBS缓冲液(武汉博士德公司);多聚赖氨酸(Poly-L-lysine,北京中杉金桥生物技术有限公司);其余试剂均系国产分析纯。生物信号分析仪、超声多普勒探头(美国Biopac公司);TGL16M台式高速冷冻离心机(长沙科威实业有限公司)、LC-6A高效液相色谱仪(日本,岛津公司)、Motic B1显微镜(浙江)、FJ-2008型 γ 免疫计数仪(西安262厂)、MILLIPORE超纯水系统(法国),Elix/RiO3纯水系统(法国),石蜡切片机(美国820型AO切片机)。

1.2 方法

1.2.1 标本提取及处理方法 完全随机分为4组: A束缚对照组, B模型组, C艾灸足三里、梁门穴组,

D艾灸非穴对照点组, 每组15只. 采用束缚冷应激方法制作急性SU模型^[6], 大鼠禁食不禁水24 h后, 束缚于鼠板上, 置于温度为20℃水中, 水面达胸骨剑突水平, 10 h后取出松绑. 取大鼠单侧足三里、梁门两穴. 穴位定位参考: 林文注主编第1版《实验针灸学》常用动物穴位定位法. 对照点: 梁门穴外测旁开1 cm的非穴位处和膝关节内侧与足三里平行的非穴点. 所有大鼠捆绑于鼠板, A、B组不灸, C、D组以艾炷黏于穴位或对照点施灸, 每天每穴(点)连续灸四壮(约0.5 h), 连灸8 d, 左右交替. 第8天灸后B、C、D组束缚水浸造模(造模前禁食24 h). 造模后24 h动物麻醉(ip 100 g/L乌拉坦, 1 mL/100 g)取材并测定各项指标. 实验结束后动物麻醉后取材. 每组随机抽取5只大鼠, 取胃前, 先将幽门部用线结扎, 然后用注射器抽取40 g/L多聚甲醛3 mL, 自食道注入胃内, 拔出针头结扎贲门. 在两结扎线的两端切断食道及十二指肠, 摘下全胃, 10 min后沿胃大弯剖开, 用冰生理盐水冲洗, 取胃组织一小块(约5 mm×10 mm), 然后放入40 g/L多聚甲醛中4℃固定24 h, 石蜡包埋备用. 其余大鼠麻醉后, 从腹中线打开腹腔, 暴露胃, 采用美国Biopac公司生产的激光多普勒血流仪, 选用迷你型接触式探头, 血流计将采集的信号由MP150型模数转换器转换成血流灌注量单位(blood perfusion unit, BPU), 其值输入计算机, 通过Acqknowledgev3.5软件进行曲线描记. 测量时在大鼠胃大弯处剪一个2 cm小口, 将激光探头先后置于胃窦、胃底及胃大、小弯4点检测, 当显示器测量曲线稳定后开始取值, 每只大鼠每点各测三次, 每次测15 s, 每点取稳定的曲线10 s算其平均值, 最后以4点GMBF的平均值作为结果进行统计学分析. 测定GMBF后, 颈动脉采血3 mL, 加入EDTA和抑肽酶各40 μL, 静置待分层后, 离心(3500 r/min, 4℃, 15 min), 取上清, -20℃保存. 胃黏膜处理: 大鼠剖腹取胃, 沿胃大弯剖开, 用冰生理盐水冲洗胃内残留物, 计数胃黏膜损伤指数后分析天平称质量, 按1.5 mL/400 mg加入生理盐水, 用玻璃匀浆器研磨40-50次, 制成胃黏膜组织匀浆, 离心(3500 r/min, 4℃, 15 min), 取上清液, -20℃低温保存, 待测.

1.2.2 观察指标 (1)胃黏膜损伤指数(UI)和胃黏膜血流量(GMBF): 按GUTH法计算UI^[7], 采用美国BIOPAC公司生物信号分析仪, 分别测定胃窦、胃底、胃大弯和胃小弯4个部位的GMBF, 取平均值; (2)血浆DA测定: 采用高效液相色谱

法, 色谱柱为Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-100 mmol/L醋酸钠(用醋酸调pH至4.5) = 5 : 95, 用前经0.45 μm的过滤膜, 超声脱气, 流速为1.0 mL/min, 柱温为35℃, AUFS 50 mV, 进样量为20 μL, 工作电压为70 mV. 样品处理: 取血清200 μL, 加少许磺基水杨酸混匀, 14 000 r/min, 离心5 min, 取上清20 μL进样. 计算公式如下: 样品浓度 = 样品峰面积×标准浓度/标准峰面积, 单位为ng/mL; (3)胃黏膜ET测定: 按试剂盒说明书进行放射免疫法测定; (4)细胞凋亡检测: 按博士德公司细胞凋亡试剂盒说明书处理. 阳性判定标准为细胞核中出现棕黄色细颗粒状. 阳性细胞计数采用MIAS医学图像分析系统进行测定, 每张切片随机选取5个高倍视野(10×40), 计算细胞凋亡的数密度(阳性细胞数/统计场面积, 单位个/μm², 由MIAS系统自动设定), 取平均值, 设定为凋亡指数(AI).

统计学处理 检测数据用mean±SD表示, 所有资料均符合正态分布; 多组计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐者用LSD和SNK法, 方差不齐者用Tamhane's T₂或Dunnett's T₃法, 使用SPSS 11.5软件进行处理.

2 结果

2.1 艾灸足三里、梁门穴对胃黏膜UI, GMBF, ET及血浆DA含量的影响 A组大鼠虽未水浸造模, 但经束缚处理后, 胃黏膜亦有轻度损伤, 水浸造模后, B组UI值显著高于A组($P<0.01$), 说明造模后胃黏膜损伤指数明显升高; C组UI值显著低于B组和D组($P<0.01$), 说明艾灸足三里、梁门穴可降低胃黏膜损伤指数, 保护胃黏膜, 且艾灸穴位作用较非穴位明显. B组GMBF显著低于A组($P<0.01$), C组GMBF显著高于B组和D组($P<0.01$), 提示束缚水浸应激造模后胃黏膜血流量下降, 而艾灸足三里、梁门穴可改善SU大鼠胃黏膜血流量. B组血浆DA含量显著高于A组($P<0.01$), C组血浆DA含量显著低于B组($P<0.01$), C组血浆DA含量与D组比较无显著性差异($P>0.05$), 但C组血浆DA含量更接近于A组, 结果提示, 束缚水浸应激后大鼠血浆DA含量增高, 艾灸可降低SU大鼠血浆DA含量. B组胃黏膜ET含量显著高于A组($P<0.01$), C组和D组胃黏膜ET含量显著低于B组($P<0.01$), 且C组胃黏膜ET含量更接近于A组, 提示束缚水浸应激造模后, 胃黏膜ET含量增高, 艾灸可降低胃黏膜ET含量, 且艾灸穴位作用优于非穴位(表1).

■创新盘点

本研究观察了艾灸预处理对应激性胃黏膜损伤的保护作用, 并分析了这一作用与细胞凋亡的关系. 前期工作表明针刺可抑制和减轻乙醇所诱发的胃黏膜细胞凋亡, 但本研究从分析艾灸对血浆DA、胃黏膜ET等对黏膜细胞凋亡的影响, 充分探讨了艾灸对应激性溃疡胃黏膜的干预机制.

■应用要点

艾灸治未病是中医防病保健的理论精髓, 研究显示艾灸体表穴位可降低应激性溃疡胃黏膜损伤, 抑制细胞凋亡, 保护胃黏膜, 值得在临床上推广应用。

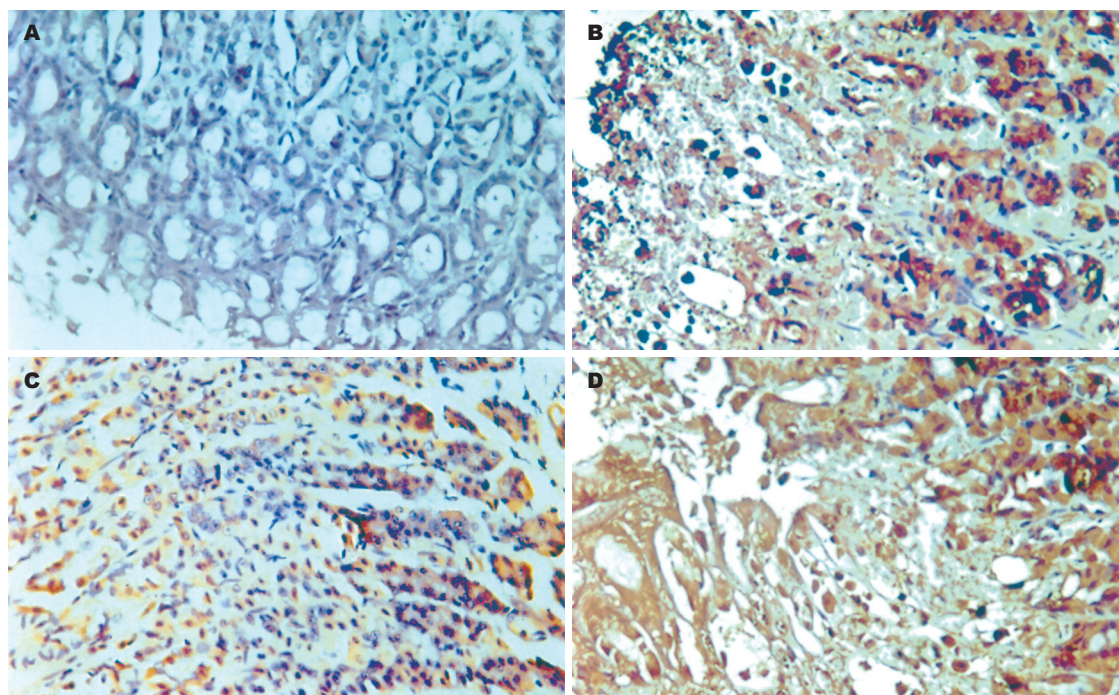


图1 各组胃黏膜细胞凋亡情况. A: A组; B: B组; C: C组; D: D组.

表1 艾灸足三里、梁门穴对UI, GMBF, DA, ET的影响(mean ± SD)

分组	n	UI	GMBF (mL/min)	DA (μg/L)	ET (ng/L)
A	10	12.00 ± 5.94	377.09 ± 85.84	4.54 ± 2.61	149.21 ± 94.14
B	10	26.80 ± 9.81 ^b	139.49 ± 33.13 ^b	9.97 ± 3.69 ^b	361.47 ± 98.08 ^b
C	10	14.10 ± 5.42 ^{df}	316.55 ± 85.47 ^{df}	4.41 ± 2.48 ^d	148.27 ± 69.14 ^d
D	10	26.20 ± 7.23 ^b	141.51 ± 58.45 ^b	5.12 ± 2.53 ^d	197.00 ± 68.10 ^d

^bP<0.01 vs A组; ^dP<0.01 vs B组; ^{df}P<0.01 vs D组.

2.2 艾灸足三里、梁门穴对胃黏膜细胞凋亡指数的影响 B组胃黏膜AI显著高于束缚对照组(P<0.05), C组胃黏膜AI显著低于B组和D组(P<0.05), D组胃黏膜AI与B组比较无显著性差异, 结果提示, 束缚水浸应激造模后胃黏膜细胞凋亡明显增加, 艾灸足三里、梁门穴可抑制SU大鼠胃黏膜细胞凋亡(表2, 图1).

表2 艾灸足三里、梁门穴对胃黏膜细胞凋亡指数(AI)的影响(mean ± SD, 10⁻⁶个/μm²)

分组	n	AI
A	5	4.36 ± 2.60
B	5	9.65 ± 4.19 ^a
C	5	3.00 ± 1.58 ^c
D	5	8.20 ± 5.17

^aP<0.05 vs A组; ^cP<0.05 vs B, D组.

3 讨论

SU是机体对各种应激性打击的一种非特异性生物防御反应, 是中枢神经、内分泌和免疫等多个器官系统相互作用, 导致胃黏膜保护机制削弱, 损伤因素作用相对增强的结果^[8]. 其中, 黏膜缺血在SU的发病机制中占主导地位^[9]. 应激状态下, 外周交感-肾上腺髓质系统强烈兴奋, 儿茶酚胺释放增多, 引起胃肠黏膜血管痉挛, 导致胃黏膜缺血、缺氧. DA是一类内源性儿茶酚胺类物质. 研究表明, 应激可使脑组织内DA含量升

高^[10]. 而应激状态下, 会出现下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴兴奋性升高, 可使血液中的儿茶酚胺含量也上升. 王琳 *et al*^[11]发现, 强制冷水游泳应激大鼠血清E, DA, HVA, 5-HT及5-HIAA含量较正常组升高, 其中DA含量升高尤为显著. 有人^[12]在对慢性束缚应激大鼠的研究中观察到, 与正常组比较, 模型组血浆中E, DA, 5-HT, 5-HIAA显著升高. 本实验观察到模型组血浆DA含量较束

缚对照组显著升高, 表明束缚水浸应激使大鼠血浆DA含量发生明显变化。朱舜丽 *et al*^[13]在对“束缚-冷冻”应激性溃疡大鼠的研究中发现, 与非穴组比较, 应激组胃窦黏膜DA和NE含量呈下降趋势, 而胃体黏膜DA和NE含量呈上升趋势。而电针足三里穴后, 胃窦黏膜DA含量较应激组升高, 而胃体黏膜DA含量较应激组下降, 接近正常水平, 表明电针足三里穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜DA含量起双向调节作用。本实验观察到, 经艾灸足三里、梁门穴预处理的大鼠血浆DA含量较模型组显著降低, 接近束缚对照组水平, 提示艾灸足三里、梁门穴可调节应激性溃疡大鼠血浆DA含量, 从而对抗应激, 减轻胃黏膜损伤。

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡过程, 是程序性细胞死亡的主要形式^[14-15]。正常胃黏膜细胞存在程序性死亡, 研究表明细胞凋亡是主要的胃肠道上皮死亡方式^[16], 以清除衰老的细胞, 维持胃黏膜生理平稳和完整性。人体各组织细胞数目的维持是由细胞增殖与凋亡之间平衡来实现的, 任何原因所致细胞凋亡加快或减慢, 均可使机体内环境稳定发生变化, 机体结构和功能受损, 产生各种疾病。正常胃黏膜上皮细胞的增殖与凋亡保持平衡^[17], 而应激性损伤所致的胃黏膜病变常常伴随着大量细胞凋亡的发生。唐志鹏 *et al*^[18]研究发现, 在正常胃黏膜表面上皮细胞存在少量凋亡细胞, 乙酸致大鼠胃溃疡第3天, 在溃疡表面可以见到密集的坏死细胞和凋亡细胞, 溃疡边缘黏膜细胞AI明显增多。彭仲生 *et al*^[19]发现*H pylori*感染能增加GU患者的胃黏膜上皮细胞凋亡, 而对细胞增殖无影响。患者细胞AI/PCNA-LI比值为1.541, 较正常人明显增高, 说明*H pylori*感染引起胃黏膜上皮细胞凋亡的数目大于其增殖的数目, 因而增殖的细胞不能弥补丢失的凋亡细胞, 最后形成溃疡。徐俊 *et al*^[20]在对应激性溃疡大鼠的研究中发现, 与空白对照组比较, 实验组胃黏膜上皮细胞凋亡明显增加, 溃疡指数明显增加, 且与应激时间呈正相关, 表明应激促使大鼠胃上皮细胞凋亡, 凋亡参与了胃黏膜的损害过程。而溃疡的愈合也伴随着细胞凋亡的减少。熊国良 *et al*^[21]对胃溃疡大鼠的研究发现, 模型组细胞AI明显高于正常组, 治疗组在溃疡愈合后的AI明显下降。已有资料报道, 针刺可抑制缺血引起的神经系统细胞和心肌细胞凋亡的发生^[22-23]。针灸对胃肠道黏膜细胞凋亡的影响研究较少。有研究表明, 针灸可抑制溃疡

性结肠炎结肠上皮细胞的凋亡^[24]。本课题组在观察针刺对胃黏膜细胞凋亡的影响时发现, 电针足三里可激发Bcl-2基因蛋白表达, 从而抑制和减轻乙醇所诱发的胃黏膜细胞凋亡, 且效果优于非穴组^[25]。本实验观察到, 模型组细胞AI显著增高, 提示束缚水浸应激可诱导大鼠胃黏膜细胞凋亡, 从而引起胃黏膜损伤; 艾灸足三里、梁门穴组大鼠胃黏膜AI显著低于模型组, 提示艾灸足三里、梁门穴可抑制束缚水浸应激所诱导的胃黏膜细胞凋亡, 从而减轻胃黏膜损伤。

ET是一种具有强大的收缩血管作用的内源性生物活性多肽, 与SU的发病关系密切, 参与了急性胃黏膜组织损伤的病理生理过程^[26], 通过其强烈的收缩血管作用导致胃黏膜循环障碍、胃黏膜血流量下降而介导胃黏膜损伤^[27]。Spyridon *et al*^[28]认为, ET-1造成的局部微循环障碍触发了胃黏膜细胞病理性凋亡的发生及增殖能力的降低, 进而引起胃黏膜结构的改变, 最终导致溃疡形成。Pollock *et al*^[29]认为, 应激因素作用下, ET-1增多特异性结合于ET_A受体并激活细胞内酪氨酸激酶级联反应, 最终导致TNF- α 基因转录的增加, TNF- α 大量产生进一步诱导细胞凋亡的发生。

本实验观察到, 模型组血浆DA和胃黏膜ET显著高于束缚对照组, GMBF显著低于束缚对照组, AI显著高于束缚对照组, 结果提示束缚水浸应激造模后, 血浆DA和胃黏膜ET含量升高, 而胃黏膜血流量下降, 诱发细胞凋亡; 艾灸足三里、梁门穴组血浆DA和胃黏膜ET含量显著低于模型组, 胃黏膜血流量显著高于模型组, AI显著低于模型组, 结果提示, 艾灸足三里、梁门穴可调节血浆DA和胃黏膜ET含量, 改善胃黏膜缺血, 抑制细胞凋亡, 减轻胃黏膜损伤, 从而保护胃黏膜。

“治未病”是中医防病保健的理论精髓之一, 即在无病或疾病发生之前预先应用针灸方法激发经络之气, 扶助正气, 提高机体抵御各种致病因子的能力, 从而达到防止疾病的发生、减轻随后疾病的损害和保健延年的目的。他是一种更加注重机体自身潜能激发与利用的方法^[30]。因而古代医家大都推崇艾灸治未病的保健灸法。现代研究也表明, 艾灸具有镇痛, 改善血液循环, 调整代谢紊乱, 调节免疫功能, 调整脏腑功能等作用^[31]。本实验采用艾灸预处理, 观察其对胃黏膜的保护作用。结果显示艾灸预处理可对抗束缚水浸应激引起的胃黏膜损伤, 该作

■名词解释

针灸“治未病”: 在无病或疾病发生之前预先应用针灸方法激发经络之气, 扶助正气, 提高机体抵御各种致病因子的能力, 从而达到防止疾病的发生、减轻随后疾病的损害和保健延年的目的。

■同行评价

本文研究了艾灸足三里、梁门穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的干预作用,具有一定的科学性。

用的可能机制是通过调节血浆DA、降低胃黏膜ET释放,增加GMBF,抑制细胞凋亡的发生,从而保护胃黏膜。且艾灸足三里、梁门穴效果优于艾灸非穴对照点,表明针灸足三里、梁门穴对胃黏膜的保护作用亦具有穴位的相对特异性。

4 参考文献

- 1 Matsumoto J, Takeuchi K, Ueshima K, Okabe S. Role of capsaicin-sensitive afferent neurons in mucosal blood flow response of rat stomach induced by mild irritants. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1336-1344
- 2 金惠铭. 病理生理学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 107-120
- 3 姜泊. 细胞凋亡基础与临床. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1999: 171-175
- 4 易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平. 针刺对胃黏膜损伤家兔表皮生长因子、生长抑素及生长抑素受体基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1721-1723
- 5 常小荣, 严洁, 林亚平, 易受乡, 邓沅江. 电针足三里对兔胃黏膜损伤细胞保护作用的观察. *中国中医药信息杂志* 2002; 9: 26-27
- 6 聂时南, 李兆申, 许国铭, 湛先保, 屠振兴, 龚燕芳. 肠三叶因子在胃黏膜应激适应性细胞保护中的作用. *中华消化杂志* 2003; 23: 19-22
- 7 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
- 8 湛先保. 应激性溃疡发生机制研究进展. *国外医学·消化系疾病分册* 1998; 18: 131-133
- 9 Svanes K, Gislason H, Guttu K, Herford JK, Fevang J, Gronbech JE. Role of blood flow in adaptive protection of the cat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1991; 100: 1249-1258
- 10 张峰, 曹仲伟, 张学杰, 李法曾. 柴胡对大鼠慢性应激抑郁模型脑单胺类神经递质及其代谢物含量的影响. *山东中医药大学学报* 2005; 29: 224-226
- 11 王琳, 王天芳, 康纯洁, 刘晓兰, 刘燕, 张翠珍, 郑君芳. 消痰怡神口服液对应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴影响的实验研究. *中国中西医结合杂志* 2002; 20: 116-119
- 12 赵歆, 陈家旭, 杨建新, 李伟, 刘晓兰, 康纯洁, 刘燕. 疏肝中药复方对慢性束缚应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节. *实验动物科学与管理* 2003; 20: 6-12
- 13 朱舜丽, 许冠荪, 陈全珠, 王振玖, 焦洁. 电针足三里穴对应激性胃溃疡大鼠一氧化氮和儿茶酚胺的影响. *中国中西医结合脾胃杂志* 1996; 4: 39-41
- 14 Que FG, Gores GJ. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 1996; 110: 1238-1243
- 15 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462
- 16 Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1836-1847
- 17 马锋振, 马洪升. 幽门螺杆菌相关胃黏膜疾病炎症、凋亡与乳酸杆菌的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 312-317
- 18 唐志鹏, 许鑫梅, 叶柳忠, 匡忠生, 谢宇晖. 健中愈疡片对乙酸致胃溃疡大鼠胃粘膜细胞动力学的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2001; 9: 201-203
- 19 彭仲生, 梁湛聪, 刘慕嫦, 欧阳能太. 幽门螺杆菌相关胃溃疡的细胞增殖与凋亡研究. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 218-219
- 20 徐俊, 宋于刚, 武金宝, 赖卓胜, 王亚东. 应激性溃疡大鼠血浆EGF水平和胃上皮细胞凋亡的变化. *苏州大学学报* 2004; 24: 160-164
- 21 熊国良, 李家邦. 健胃愈疡颗粒剂对胃溃疡大鼠胃黏膜上皮细胞原位凋亡的影响. *湖南中医学院学报* 1999; 19: 23-24
- 22 Luo ZD, Luo ZK, Xu NG, Lai XS, Yin LH. Influence of electroacupuncture on apoptosis and nerve growth factor of focal cerebral ischemia of rats. *Chin J Clin Rehabil* 2004; 8: 1382-1383
- 23 田岳凤, 吴富东, 乔海法, 韩秀珍, 单秋华. 针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响. *中国针灸* 2003; 23: 685-687
- 24 吴焕淦, 黄臻, 刘慧荣, 张卫, 施茵, 朱毅, 崔云华, 刘世敏. 针灸对大鼠溃疡性结肠炎结肠上皮细胞凋亡影响的实验研究. *中国针灸* 2005; 25: 119-122
- 25 周国平, 严洁, 李江山, 邓常清, 刘健华. 电针“足三里”对胃粘膜损伤大鼠Bcl-2、Fas蛋白表达的影响. *针刺研究* 2004; 29: 31-34
- 26 Kawano S, Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: D1-6
- 27 李兆申, 湛先保, 许国铭. 胃黏膜损伤与保护-基础与临床. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 4
- 28 Spyridon L, Akira N, Hiromasa K, Katsutoshi G, Takao M, Yoshiki O, Hideo S, Hisayuki F. The development of the endothelin-1-induced gastric ulcer: time sequence analysis of morphologic changes. *Int J Exp Pathol* 1994; 75: 345-355
- 29 Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J* 1995; 9: 1196-1204
- 30 李晓泓. 针灸“治未病”与“针灸良性预应激假说”. *北京中医药大学学报* 2003; 26: 82-85
- 31 谢莉莉, 刘光谱. 艾灸的治疗作用和机理研究进展. *针灸临床杂志* 2000; 16: 55-57

电编 张敏 编辑 王晓瑜

亚砷酸联合重组腺病毒Ad-I κ B α M对肝细胞癌的治疗作用

刘丹, 刘冰熔, 胡丽红, 杜雅菊, 裴凤华, 吕志武, 关景明

刘丹, 刘冰熔, 胡丽红, 杜雅菊, 裴凤华, 吕志武, 关景明, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086
刘丹, 2005年毕业于哈尔滨医科大学硕士, 住院医师, 主要从事消化道肿瘤的基础及临床研究。

黑龙江省科学技术计划项目, No. GC02C148-01

通讯作者: 刘冰熔, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科。

liubingrong@medmail.com.cn

电话: 0451-86605980 传真: 0451-86605980

收稿日期: 2006-09-19 接受日期: 2006-10-11

Therapeutic effect of arsenious acid combined with recombinant adenovirus Ad-I κ B α M on hepatocellular carcinoma

Dan Liu, Bing-Rong Liu, Li-Hong Hu, Ya-Ju Du, Feng-Hua Pei, Zhi-Wu Lv, Jing-Ming Guan

Dan Liu, Bing-Rong Liu, Li-Hong Hu, Ya-Ju Du, Feng-Hua Pei, Zhi-Wu Lv, Jing-Ming Guan, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang Province, China

Supported by the Science and Technology Project of Heilongjiang Province, No. GC02C148-01

Correspondence to: Dr. Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Street, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. liubingrong@medmail.com.cn

Received: 2006-09-19 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To observe the inhibitory effect of recombinant adenovirus Ad-I κ B α M on the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) as well as the enhancing effect of arsenious acid on the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

METHODS: Hepatocellular carcinoma cell lines BEL-7402 and SMMC-7721 were treated with different concentrations of arsenious acid, respectively. The recombinant adenoviruses were prepared to transfect BEL-7402 and SMMC-7721 cells received or not received arsenious acid treatment. MTT assay and TUNEL method were used to observe the growth and apoptosis of the cells, respectively. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and Western blot were performed to detect the activation of NF- κ B and its inhibi-

tion after Ad-I κ B α M transfection, respectively.

RESULTS: MTT indicated that the proliferations of BEL-7402 and SMMC-7721 cells were significantly suppressed after treatment of arsenious acid with different concentrations ($P < 0.05$). Western blot and EMSA showed that arsenious acid markedly inhibited the growth of liver cancer cells, and promoted the activation of NF- κ B. After transfection with Ad-I κ B α M, the activation of NF- κ B induced by arsenious acid was dramatically inhibited. The apoptosis rates were 66.47% and 36.67% in SMMC-7721 cells transfected with Ad-I κ B α M and Ad-I κ B α , respectively, and they were 74.5% and 32.37% in Bel-7402 cells transfected with Ad-I κ B α M and Ad-I κ B α , respectively.

CONCLUSION: Arsenious acid has obvious effect in the treatment of hepatocarcinoma, but it promotes the activation of NF- κ B at the same time. Recombinant adenovirus Ad-I κ B α M can inhibit NF- κ B activation while increase the effect of Arsenious acid effectively.

Key Words: Nuclear factor kappaB; Hepatocellular carcinoma; Arsenious acid; Gene therapy; Recombinant adenovirus

Liu D, Liu BR, Hu LH, Du YJ, Pei FH, Lv ZW, Guan JM. Therapeutic effect of arsenious acid combined with recombinant adenovirus Ad-I κ B α M on hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3169-3174

摘要

目的: 观察感染Ad-I κ B α M对NF- κ B激活的抑制及对亚砷酸诱导肝癌细胞凋亡的增强效应, 探讨亚砷酸对肝癌细胞的治疗作用。

方法: 选择人肝癌细胞系BEL-7402和SMMC-7721, 以不同浓度亚砷酸处理。制备重组腺病毒Ad-I κ B α M, 用来转染经和未经亚砷酸处理的肝癌细胞。MTT和TUNEL方法观察各组细胞生长及凋亡情况; 应用EMSA及Western blot研究肝癌细胞核内NF- κ B的激活情况和感染Ad-I κ B α M对NF- κ B激活的抑制效果。

■背景资料

肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 大多数患者发现时已是晚期或一般状态差, 失去了手术机会, 被称为“癌中之王”。选择一种适合晚期肝癌患者的治疗方法, 提高化疗药物的效果是临床医生亟待解决的问题。

■研究前沿

基因治疗是近年来随着分子生物学的发展而发展起来的一种极具前途的肿瘤治疗方法。NF- κ B是一种重要的核转录因子,近年来受到广泛关注,其具有重要的生物学功能,在多种肿瘤细胞的抗凋亡机制中起着十分重要的作用。

结果: MTT结果表明各浓度亚砷酸对肝癌细胞的作用较正常肝细胞显著($P<0.01$); Western blot和EMSA结果提示亚砷酸可明显抑制肝癌细胞生长,使细胞内NF- κ B系统活化;感染重组腺病毒Ad-I κ B α M的肝癌细胞后,亚砷酸引起的NF- κ B的激活受到明显抑制。亚砷酸联合Ad-I κ B α M或Ad-I κ B α 作用于肝癌细胞SMMC-7721的凋亡指数分别为66.47%和36.67%;亚砷酸联合Ad-I κ B α M或Ad-I κ B α 作用于肝癌细胞Bel-7402的凋亡指数分别为74.5%和32.37%。

结论: 亚砷酸对肝癌细胞有明显的杀灭作用,同时激活了肝癌细胞内的NF- κ B;应用重组腺病毒Ad-I κ B α M可以有效抑制NF- κ B的激活,并可明显增强亚砷酸对肝癌细胞的作用。

关键词: 核转录因子 κ B; 肝癌; 亚砷酸; 基因治疗; 重组腺病毒

刘丹, 刘冰熔, 胡丽红, 杜雅菊, 裴凤华, 吕志武, 关景明. 亚砷酸联合重组腺病毒Ad-I κ B α M对肝细胞癌的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3169-3174

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3169.asp>

0 引言

亚砷酸最初用于急性早幼粒细胞白血病(ALP)的治疗,取得了极高的临床缓解率,得到全世界的普遍认可。近年来,国内外学者尝试将砷剂用于肝癌的治疗,同样取得了一定的效果^[1-4]。核转录因子NF- κ B^[5-7]是调节细胞基因转录的关键因子,参与多种凋亡相关基因转录,在肿瘤的发生和发展过程中发挥重要作用。本研究观察了亚砷酸对肝癌细胞的作用以及肝癌细胞核内转录因子NF- κ B的激活情况;联合应用NF- κ B的超抑制物Ad-I κ B α M,观察其对NF- κ B的激活的抑制作用及对亚砷酸疗效的增强效果,探索药物联合基因治疗肝癌的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞系BEL-7402和SMMC-7721,正常肝细胞系HL-7702,均购自中科院上海细胞所细胞库;人胚肾细胞293细胞由重庆医科大学肝病研究所惠赠;第32和36位丝氨酸位点诱变为丙氨酸的中国人I κ B α M重组腺病毒和未突变的对照腺病毒重组体Ad-I κ B α 为刘冰熔博士构建^[8-9];亚砷酸注射液(哈尔滨伊达药业有限公司),使用时用RPMI 1640配制成所需浓度;RPMI 1640培养液、HDMEM培养液及胎牛血

清(Gibco公司产品);MTT试剂(上海华舜生物公司);TUNEL反应试剂盒(Roche公司);核蛋白提取蛋白酶抑制剂及EMSA试剂盒(Promega),ECL试剂盒(Pharmacia); γ -³²P-ATP(Perkin Elmer)。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒Ad-I κ B α M和Ad-I κ B α 的扩增 将1 mL病毒原液加无血清培养基4-5 mL加入含有 5×10^6 个293细胞的25 cm培养瓶中,于37℃,50 mL/L CO₂孵育4-6 h,弃掉培养液;加入新鲜含20 mL/L胎牛血清的DMEM培养基3 mL,于37℃,50 mL/L CO₂培养,感染不同时间后在荧光显微镜下观察GFP表达情况;待有大量细胞表达GFP且有部分细胞漂浮时(约5-10 d),将293细胞用细胞刮子刮下,加DMEM 2 mL,800 r/min离心5 min弃上清,用1 mL冷PBS重悬,收集细胞于EP管中-20℃保存;将收集的293细胞以反复冻融法(将细胞和上清液收集到塑料离心管中,密封后放置液氮中10 s,在室温下缓慢解冻并震荡,反复5次,离心,取上清)提取病毒液。

1.2.2 重组腺病毒Ad-I κ B α M和Ad-I κ B α 的病毒滴度测定 将293细胞以 4×10^5 /孔培养于6孔板中;取待测的病毒液0.2 mL加入装有1.8 mL PBS的EP管中,混匀后一次做10倍比稀释至第6管;取每一稀释度病毒液400 μ L稀释液加至293细胞培养板(6孔板)中,37℃,于50 mL/L CO₂孵箱中吸附4-6 h;换新鲜培养基,继续培养18-36 h于荧光显微镜下计数GFP阳性细胞数;选择70%-80%细胞被感染的孔内细胞,按下列公式计算病毒滴度。病毒滴度(PFU/mL) = GFP阳性细胞数 \times 病毒上清稀释倍数/0.4 mL。

1.2.3 病毒感染效率测定 将肝癌细胞系SMMC-7721, BEL-7402以 10^5 /孔接种六孔培养板中,待24 h后感染病毒;Ad-I κ B α M以25, 50, 100, 200 MOI(病毒感染单位)感染2种肝癌细胞;按以下公式计算加入病毒体积,吸附1 h后追加培养基,48 h后倒置荧光显微镜观察计数所有发绿光细胞,同时计数该视野所有细胞数。 $V(\text{加入病毒体积}) = \text{MOI} \times \text{接种细胞数} / (\text{pfu/mL})$ 。

1.2.4 不同浓度亚砷酸对肝癌细胞的抑制率 血球计数板计数后将细胞密度调整为 $4-5 \times 10^7$ /L。96孔板每孔加细胞悬液100 μ L,培养液100 μ L,调零孔加200 μ L培养基。细胞贴壁后按预定计划分别加入不同浓度的化疗药。于24, 48, 72 h,各取一块96孔板,除调零孔外,每孔小心吸弃培养基110 μ L后,加入新鲜配制的浓度为5 g/L的MTT 10 μ L。继续培养3 h后取出培养皿,每孔

加DMSO 100 μ L, 轻轻晃摇5 min后放入培养箱30 min后取出, 用酶联仪于570 nm测定吸光度值(A). 结果用多因素方差分析进行统计学分析; 抑制率(%) = (1-加药孔平均A值/对照孔平均A值) \times 100%.

1.2.5 实验分组及处理 以常规培养的BEL-7402, SMMC-7721以及HL-7702三种细胞为空白对照, 治疗组以两种肝癌细胞感染腺病毒Ad-I κ B α M, 24 h后加入2 μ mol/L亚砷酸, 继续培养24 h后收取细胞进行进一步实验; 治疗对照组为两种肝癌细胞感染Ad-I κ B α , 24 h后加入2 μ mol/L的亚砷酸, 继续培养24 h.

1.2.6 Western blot法 按照Sasaki *et al*^[10]方法提取各组细胞的核蛋白, Bradford方法测定蛋白浓度. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳: PAGE胶电泳, 每孔加入蛋白30 μ g与6 \times 加样缓冲液混匀, 加热煮沸5 min; 立即放于冰上, 待完全冷却后, 加样. 电泳时用200 V恒定电压, 泳动1 h左右. 转膜: 剪切与凝胶大小一致的12张Whatman 3 mm滤纸和1张PVDF膜, 作好标记后, 将其浸泡于甲醇中3 s, 待完全湿透后, 浸于转移缓冲液中30 min; 然后, 按“三明治”法将其安放于电转移器中, 加入适量转移缓冲液, 30 V, 转移3 h. 封闭: 将PVDF膜放入含50 g/L脱脂奶粉的TBS-T液中, 室温下震荡封闭1 h. 杂交: 用TBS-T液漂洗膜3次, 5 min/次, 加入1:500稀释的一抗, 室温下杂交2 h; TBS-T液洗膜3次, 5 min/次, 加入1:500稀释的HRP标记的二抗, 室温下杂交1 h, 再用TBS-T液洗膜3次. 化学发光自显影: 将杂交后的膜放于一个干净的器皿中. 将ECL的A, B液以1:1比例混合并加到膜面上, 暗处反应1 min, 用保鲜膜包好, 放入暗盒中, 在暗室中压片、发光自显影2-5 min、洗片.

1.2.7 凝胶迁移率分析法(EMSA)检测细胞核内NF- κ B的活性 按照Promega公司Gel Shift Assay Systems试剂盒说明书进行. γ -³²P标记NF- κ B寡核苷酸探针, 配制60 g/L聚丙烯酰胺凝胶, 胞核提取物和NF- κ B寡核苷酸探针结合反应37 $^{\circ}$ C水浴中反应45 min, 1 \times TBE中, 4 $^{\circ}$ C 250 V电泳, 直到溴酚兰距凝胶底部约1/2; 600 mL/L冰醋酸溶液浸泡15 min取出凝胶并吸干残余水分, 用保鲜膜覆盖; 将凝胶放入装有X光片的暗盒中, 保鲜膜面向X光片, 于-30 $^{\circ}$ C放射自显影24-48 h.

1.2.8 原位末端脱氧核苷酸转移酶标记法(TUNEL)检测凋亡 将细胞进行冷丙酮固定30 min, 于紫外灯下照射10 min, 荧光显微镜下

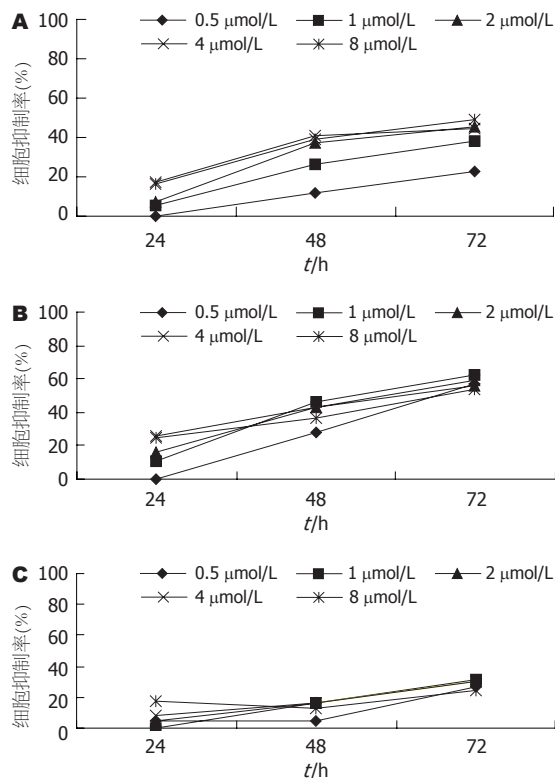


图1 不同浓度的亚砷酸对细胞生长的抑制作用. A: SMMC-7721; B: Bel-7402; C: HL-7702.

观察, 至GFP完全淬灭. 30 g/L过氧化氢室温作用10 min, PBS冲洗3次, 5 min/次; 1 mL/L Triton X-100冰上作用2 min, PBS冲洗3次, 5 min/次; 每片加入TUNEL反应混合液, 避光37 $^{\circ}$ C作用1 h; PBS冲洗3次, 5 min/次后, 荧光显微镜下观察计数并照相.

2 结果

2.1 腺病毒滴度及感染效率测定 Ad-I κ B α 和Ad-I κ B α M经293细胞扩增滴度分别为 8.3×10^{12} pfu/L和 8.5×10^{12} pfu/L. 25, 50, 100, 200 MOI对SMMC-7721的感染效率分别为: 11%, 46%, 95%和90%; 25, 50, 100, 200 MOI对Bel-7402的感染效率分别为: 6%, 30%, 74%和95%. 选择100 MOI为Ad-I κ B α M对SMMC-7721的感染剂量; 200 MOI为Ad-I κ B α M对BEL-7402的感染剂量.

2.2 MTT检测抑制率 不同浓度的亚砷酸(0.5, 1, 2, 4, 8 μ mol/L)处理细胞Bel-7402, SMMC-7721, HL-7702, 于24, 48, 72 h观察亚砷酸对肝癌细胞生长的抑制情况. 亚砷酸可以抑制肝癌细胞及正常肝细胞增殖, 随着作用时间的延长, 抑制作用逐渐增强, 呈时间依赖性; 各浓度亚砷酸对肝癌细胞的作用较正常肝细胞显著($P < 0.01$), 表明

■ 相关报道

国内外均有关于NF- κ B相关报道, 探讨其在炎症、免疫、细胞增殖等多种生理、病理过程的基因调控, 并把NF- κ B抑制剂应用于基础及临床研究中.

■同行评价

本文研究方法和
技术具有一定创
新性,实验对照的
设计合理可靠,统
计学处理方法
的使用恰当,文章
的科学性、创新
性和可读性较好。

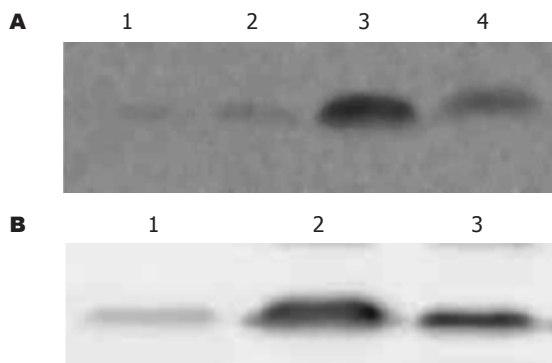


图2 Western blot法检测细胞核内NF- κ B表达情况. A: BEL-7402细胞; 1: HL-7702; 2: BEL-7402; 3: 亚砷酸+Ad-I κ B α ; 4: 亚砷酸+Ad-I κ B α M; B: SMMC-7721细胞; 1: SMMC-7721; 2: 亚砷酸+Ad-I κ B α ; 3: 亚砷酸+Ad-I κ B α M.

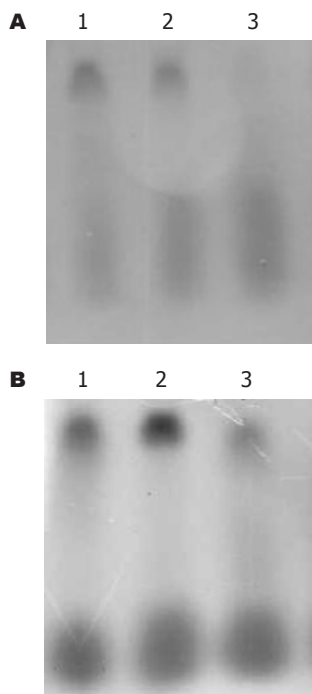


图3 两种细胞
细胞核内NF- κ B
表达(EMSA). A:
SMMC-7721细胞;
B: BEL-7402细胞;
1: 细胞+亚砷酸; 2:
感染Ad-I κ B α 的细
胞+亚砷酸; 3: 感染
Ad-I κ B α M的细胞
+亚砷酸.

亚砷酸的作用有选择性,对肝癌细胞的作用强于正常细胞.选择对肝癌细胞抑制率没有明显差别的最小亚砷酸浓度为以下实验的浓度,即2 μ mol/L(图1).

2.3. Western blot免疫印记杂交结果 正常肝细胞HL-7702细胞核内几乎没有NF- κ B表达;肿瘤细胞系BEL-7402, SMMC-7721仅有NF- κ B的低水平表达.感染重组腺病毒Ad-I κ B α 的细胞经化疗药物作用后其NF- κ B的表达量显著增加;而感染Ad-I κ B α M后再给予表阿霉素、丝裂霉素处理后可见NF- κ B表达量较Ad-I κ B α 组明显减低(图2).

2.4 EMSA的检测结果 肝癌细胞SMMC-7721和

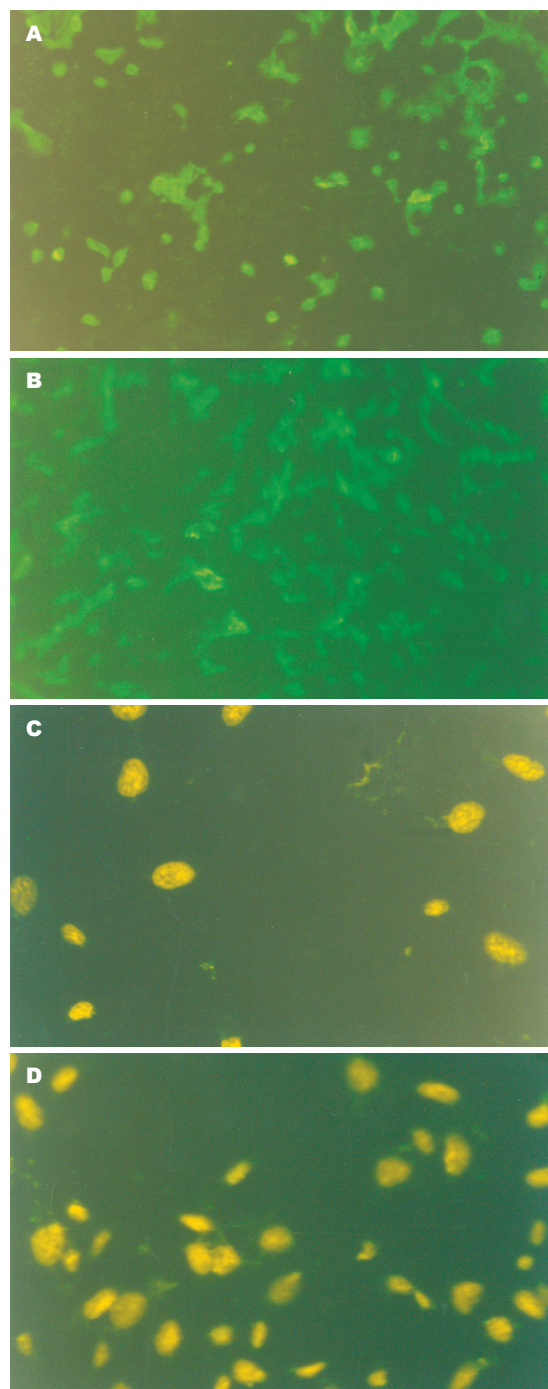


图4 TUNEL法检测细胞凋亡的结果. A, B: SMMC-7721细胞; C, D: BEL-7402细胞; A, C: 亚砷酸+Ad-I κ B α ; B, D: 亚砷酸+Ad-I κ B α M.

BEL-7402在三氧化二砷的作用下NF- κ B的表达,感染了重组腺病毒Ad-I κ B α 的两种细胞,其NF- κ B的表达无明显变化.但感染了重组腺病毒Ad-I κ B α M的两种细胞NF- κ B的表达被明显抑制(图3).

2.5 TUNEL法检测凋亡 以有荧光者为阳性,选择细胞分布均匀,背景清晰的区域,在高倍镜下计数同一视野细胞总数,计算荧光细胞所占百

分比为凋亡率(AI). 亚砷酸联合Ad-I κ B α M或Ad-I κ B α 作用于肝癌细胞SMMC-7721的凋亡指数分别为66.47%和36.67%; 亚砷酸联合Ad-I κ B α M或Ad-I κ B α 作用于肝癌细胞Bel-7402的凋亡指数分别为74.5%和32.37%(图4).

3 讨论

低剂量的砷剂作为药物使用在传统中医中药已有近千年的历史, Science著文称“这是继全反式维甲酸(ATRA)之后又一令人震惊的发现”^[11]. 几十年来, 亚砷酸在APL的治疗中取得了突破性进展, 初发的APL患者仅仅依靠单一用药即可取得70%-90%的完全缓解率, 同时只引起轻度的骨髓抑制. 表明低剂量砷剂对肿瘤细胞的治疗作用远远超过了他对正常细胞的毒性作用, 使其有望成为一种优于其他细胞毒药物的抗肿瘤制剂. 研究发现, 亚砷酸通过不同的机制影响细胞的信号传导途径, 最终产生一系列细胞学效应, 包括诱导细胞的凋亡、生长抑制、促发或抑制分化和抑制血管形成等. 核转录因子NF- κ B(nuclear factor- κ B), 是由Sen和Baltimore^[12]于1986年首先在B细胞中发现的一种结合于免疫球蛋白 κ 轻链增强子上的核蛋白. 随后他们发现NF- κ B不仅存在于B细胞而且也存在于多种细胞中. 进一步的研究表明, NF- κ B是一种重要的核转录因子. 他存在于多种细胞, 并参与炎症、免疫、细胞增殖等多种生理、病理过程的基因调控. 1996年Hsu *et al*^[13]发现, 当TNF作用于肿瘤细胞时, 肿瘤细胞通过激活NF- κ B而发挥抗凋亡途径. 随后, 越来越多的研究表明肿瘤细胞的抗凋亡能力与NF- κ B激活直接相关^[14-17]. NF- κ B抗凋亡机制的发现, 使人们对肿瘤细胞抗凋亡作用机制的研究有了突破性进展. 因而如何有效地抑制肿瘤细胞的NF- κ B活性进而将其应用于抗肿瘤治疗是一个具有重要现实意义的课题^[18-21]. 我们从中国人外周血单核细胞中成功克隆了中国人I κ B α 基因, 进而应用定点诱变方法成功构建了NF- κ B超抑制物I κ B α M, 并在此基础上应用最新的腺病毒构建系统构建了重组腺病毒Ad-I κ B α M. 本研究在已有的研究基础上, 以两株肝癌细胞为对象, 应用三氧化二砷对其进行治疗研究, 进一步证实了亚砷酸能够明显抑制肿瘤细胞生长的同时对正常肝细胞影响很小($P<0.01$), 他通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥作用, 同时应用Western blot及EMSA发现应用亚砷酸

后出现肝癌细胞内NF- κ B系统活化. 提示肝癌细胞可能通过NF- κ B系统活化使亚砷酸诱导的肿瘤细胞凋亡机制受阻, 从而影响了亚砷酸治疗实体肿瘤的效果. 为了提高亚砷酸对肝癌的治疗效果, 我们进一步联合应用NF- κ B超抑制物重组腺病毒Ad-I κ B α M, 观察到肝癌细胞内NF- κ B激活被明显抑制, 观察到联合应用凋亡细胞明显增多. 本研究结果提示, 化学治疗联合基因治疗可提高化疗抗肿瘤的疗效. 这一治疗模式有望成为极有发展前途的治疗方式.

4 参考文献

- 1 Chow SK, Chan JY, Fung KP. Suppression of cell proliferation and regulation of estrogen receptor alpha signaling pathway by arsenic trioxide on human breast cancer MCF-7 cells. *J Endocrinol* 2004; 182: 325-337
- 2 邓友平, 林晨, 梁萧, 陈洁平, 付明, 肖培根, 吴旻. 三氧化二砷诱导人宫颈癌Hela细胞凋亡及Bcl-2保护作用的机制研究. *中国科学(C辑)* 1999; 29: 426-434
- 3 郁宝铭, 崔巍, 陆爱国, 李东华, 郑民华. 三氧化二砷对结肠癌细胞抑制作用的实验研究. *肿瘤* 1999; 19: 289-290
- 4 陈其奎, 袁世珍, 黄志清. 三氧化二砷诱导胰腺癌细胞周期阻滞与凋亡作用. *中华医学杂志* 1998; 78: 578-579
- 5 Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 2003; 9: 575-581
- 6 Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 2003; 115: 565-576
- 7 Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, Eby M, Xiao W, Dixit VM. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 2004; 427: 167-171
- 8 刘冰熔, 黄爱龙, 沈鼎明. 中国人I κ B α 基因的克隆和序列分析. *免疫学杂志* 2002; 18: 81-84
- 9 刘冰熔, 黄爱龙, 肖彧君, 沈鼎明. NF- κ B超抑制物I κ B α M重组腺病毒的构建. *免疫学杂志* 2004; 20: 65-67
- 10 Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, Yao T, Tsuneyoshi M, Noshiro H, Nakamura K, Yamanaka T, Uchiyama A, Tanaka M, Katano M. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4136-4142
- 11 Mervis J. Ancient remedy performs new tricks. *Science* 1996; 273: 578
- 12 Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716
- 13 Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84: 299-308
- 14 Davis N, Ghosh S, Simmons DL, Tempst P, Liou HC, Baltimore D, Bose HR Jr. Rel-associated pp40:

- an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* 1991; 253: 1268-1271
- 15 Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-784
- 16 Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 2002; 1: 493-503
- 17 胡丽红, 刘冰熔, 刘丹, 关景明, 吕志武, 杜雅菊. 重组腺病毒Ad-IkBaM在5-氟尿嘧啶诱导胃癌细胞凋亡中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2270-2274
- 18 Dong QG, Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, Peng B, Wu T, Tsao MS, Evans DB, Abbruzzese JL, McDonnell TJ, Chiao PJ. The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 6510-6519
- 19 Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* 2000; 60: 3477-3483
- 20 Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNFalpha-induced apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 1759-1767
- 21 Kwon KB, Kim EK, Jeong ES, Lee YH, Lee YR, Park JW, Ryu DG, Park BH. Cortex cinnamomi extract prevents streptozotocin- and cytokine-induced beta-cell damage by inhibiting NF-kappaB. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4331-4337

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 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2007-08下旬在石家庄市召开第十九届全国中西医结合消化学术交流会, 并同时举办全国中西医结合消化疾病诊治新进展学习班。

1 征文内容和要求

征文内容: (1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肝、胰等诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对“淤血症”以及脾胃学说与脾虚证研究进展。征文要求: 来稿请附800字论文摘要, 并附软盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送)。征文请于2007-06-30前邮寄。

2 学习班招收对象

学习班招收对象: 从事中西医结合、中医或西医消化专业医师以上人员。参加学习班者授予国家继续教育学分12分; 在大会论文报告者另授继续教育学分6分。

3 联系方式

(1) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路45号 解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会), 邮编: 150080, 联系人: 李春雷, 贾云, 联系电话: 0451-57752440或86632450, 传真: 0451-86603878或0451-57752440; (2) 河北省石家庄和平西路215号河北医科大学附属第二医院, 邮编: 050000, 联系人: 姚希贤, 冯志杰, 联系电话: 0311-87222301或13333015658。

髓源性树突状细胞过继转移诱导1型糖尿病小鼠免疫耐受及其机制

张程亮, 向明, 邹晓蕾, 彭佳蓓

张程亮, 向明, 邹晓蕾, 彭佳蓓, 华中科技大学同济医学院药学院药理学室 湖北省武汉市 430030

张程亮, 2004年华中科技大学同济医学院硕士, 主要从事免疫药理学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30200343

通讯作者: 向明, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院药学院药理学教研室. xiangming@mails.tjmu.edu.cn

电话: 027-83657813 传真: 027-83657547

收稿日期: 2006-08-23 接受日期: 2006-09-21

Immune tolerance and its mechanism induced by adoptive transfer of bone marrow-derived dendritic cells in mice with insulin-dependent diabetes mellitus

Cheng-Liang Zhang, Ming Xiang, Xiao-Lei Zou, Jia-Bei Peng

Cheng-Liang Zhang, Ming Xiang, Xiao-Lei Zou, Jia-Bei Peng, Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30200343

Correspondence to: Ming Xiang, Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. xiangming@mails.tjmu.edu.cn

Received: 2006-08-23 Accepted: 2006-09-21

Abstract

AIM: To investigate immune tolerance induced by adoptive transfer of bone marrow-derived dendritic cells (DCs) in mice with type 1 diabetes, and to explore its underlying mechanism.

METHODS: Bone marrow cells from BALB/c mice were used to generate DCs by *in vitro* co-culturing with cytokines. After identifying the purity of DCs, We injected the cells into BALB/c mice intraperitoneally. The mouse model of type 1 diabetes was established by injecting low dose of streptozotocin (STZ) for 5 consecutive days. The blood glucose was examined once a week.

At the end of the 4th week, all the mice were killed and splenic lymphocytes were collected. After *in vitro* culturing, the proliferation of lymphocytes was detected by MTT assay, and the proportion of CD4⁺CD25⁺T cells was analyzed by fluorescence activated cell sorter (FACS). The serum levels of cytokines IL-2 and IL-4 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The level of blood glucose was decreased significantly after adoptive transfer of DCs in comparison with that in the model controls (8.32 ± 1.05 mmol/L *vs* 18.36 ± 1.55 mmol/L, $P < 0.01$). *In vitro*, the proliferation of splenic lymphocytes was inhibited as compared with that of the model controls (0.264 ± 0.019 *vs* 0.489 ± 0.012 , $P < 0.05$) while the proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells was enhanced to 5.28% (1.56% in the model controls). Adoptive transfer of DCs effectively suppressed the secretion of IL-2 (121 ± 19 ng/L *vs* 195 ± 32 ng/L, $P < 0.05$) while elevated the content of IL-4 (187 ± 36 ng/L *vs* 76 ± 30 ng/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Adoptive transfer of bone marrow-derived DCs can induce the immune tolerance to type 1 diabetes in mice, and the mechanism may be related with the production of CD4⁺CD25⁺ T cells and balance between Th1 and Th2 cytokines.

Key Words: Dendritic cells; Type 1 diabetes; Immune tolerance; Regulatory T cells

Zhang CL, Xiang M, Zou XL, Peng JB. Immune tolerance and its mechanism induced by adoptive transfer of bone marrow-derived dendritic cells in mice with insulin-dependent diabetes mellitus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3175-3179

摘要

目的: 探讨髓源性树突状细胞(DC)过继转移诱导1型糖尿病(IDDM)小鼠免疫耐受的作用及其机制。

■背景资料

1型糖尿病是器官特异性自身免疫病, 自身耐受的破坏是发病的重要环节。因此, 重建机体免疫耐受是防治1型糖尿病的关键。树突状细胞在自身免疫耐受的诱导中扮有重要角色, 近年来利用该细胞的过继转移在防治自身免疫性脑脊髓炎和关节炎中取得了一定成果, 而对于树突状细胞对1型糖尿病的作用有待深入研究。

■研究前沿

利用树突状细胞建立免疫耐受而防治自身免疫性疾病是当前研究热点。树突状细胞在体内多个组织均有分布,各种来源的树突状细胞在诱导耐受中所发挥的作用有所不同。树突状细胞免疫生物学与自身免疫性疾病模型的关系及在防治自身免疫病中的作用正处于广泛而深入的研究之中。

方法: 体外培养BALB/c小鼠骨髓来源DC,测定纯度,经ip小鼠体内。随后,采用少量多次链脲佐菌素(STZ)ip的方法建立IDDM小鼠模型。每周测定血糖,第4周时处死动物,分离脾脏淋巴细胞并进行体外培养,MTT法测定小鼠脾淋巴细胞增殖反应,采用流式细胞术检测CD4⁺CD25⁺调节性T细胞。ELISA法测定血清IL-2, IL-4含量。

结果: 过继转移表达CD11c⁺的DC 4 wk后,小鼠的血糖可明显降低,与模型对照组有极显著差异(8.32 ± 1.05 mmol/L vs 18.36 ± 1.55 mmol/L, $P < 0.01$)。与模型对照相比,过继转移DC可使小鼠脾淋巴细胞增殖能力降低(0.264 ± 0.019 vs 0.489 ± 0.012 , $P < 0.05$)。流式细胞术测定结果显示CD4⁺CD25⁺T细胞亚群比例上升到5.28%,而模型对照组仅1.56%。DC过继可有效抑制IL-2分泌(121 ± 19 ng/L vs 195 ± 32 ng/L, $P < 0.05$),而提高IL-4含量(187 ± 36 ng/L vs 76 ± 30 ng/L, $P < 0.01$)。

结论: 过继转移髓源性DC可以诱导免疫耐受防止IDDM的发生,其机制与促进体内CD4⁺CD25⁺T细胞亚群产生,重建Th1/Th2细胞因子平衡相关。

关键词: 树突状细胞; 1型糖尿病; 免疫耐受; 调节性T细胞

张程亮, 向明, 邹晓蕾, 彭佳蓓. 髓源性树突状细胞过继转移诱导1型糖尿病小鼠免疫耐受及其机制. 世界华人消化杂志 2006; 14(33): 3175-3179

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3175.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是已知机体体内最重要的抗原提呈细胞(APC),在体内可诱导强烈的免疫反应,同时在自身免疫耐受的维持中也扮有重要角色。近来的研究显示,体外培养DCs可作为诱导免疫耐受的工具,在各种自身免疫性疾病的调节中发挥着重要的作用^[1]。已有报道认为,DCs的过继转移可以减少自身免疫性疾病如实验性自身免疫性脑脊髓炎和胶原诱导的关节炎的发病率^[2]。1型糖尿病(IDDM)是由自身反应性T淋巴细胞介导的器官特异性自身免疫性疾病,自身免疫耐受的破坏和胰岛β细胞的特异性免疫损伤是其发病的重要环节^[3]。基于DCs的免疫调节特性,Clare-Salzler *et al*^[4]通过分离胰腺淋巴结的DCs过继至未发病的NOD小鼠体内能够延缓糖尿病的发病,而来自其他淋巴结和

脾脏的DCs则无效。本研究拟通过分离小鼠髓源性DCs,过继转移至Balb/c小鼠体内观察其诱导免疫耐受的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 δ BALB/c小鼠,平均体质量22 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。链脲佐菌素(STZ)、刀豆蛋白ConA购自Sigma公司; Ficoll-Paque细胞分层液购自Amersham公司; MTT购自Amresco公司; RPMI1640培养基购自Gibco公司; FITC标记抗小鼠CD4、PE标记抗小鼠CD25购自eBioscience公司; 小鼠GM-CSF、小鼠IL-2, IL-4酶联免疫检测试剂盒购自R&D system; FITC-标记抗小鼠CD11c购于BD公司。金鹊牌血糖测定仪(上海新立医疗器械有限公司); MK3酶联免疫检测仪(芬兰Thermo公司); ELX—800型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 骨髓来源DCs的体外诱导与纯度鉴定 无菌条件下取BALB/c小鼠双侧股骨和胫骨,剪开骨两端,用注射器抽取PBS缓冲液,冲洗收集小鼠骨髓细胞混合液。离心弃上清,用Ficoll-Paque淋巴细胞分离液(按与样本体积1:1混合)梯度离心2000 r/min, 15-20 min。吸取中间白细胞层, PBS液洗2次,以RPMI1640(含100 mL/L胎牛血清)液制备成细胞悬液,调整细胞浓度为 2×10^{10} /L,置于6 cm培养皿中,贴壁4 h后去除悬浮细胞,加入含小鼠GM-CSF(20 μg/L)的完全培养基,置于37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养,隔天半量换液,补加细胞因子。将培养7 d后收集的小鼠骨髓来源的DCs用PBS洗2遍,取 2×10^6 个细胞悬浮于含50 mL/L胎牛血清的PBS液中,加入FITC-标记抗小鼠CD11c mAb,混匀后4℃避光放置30 min。再用PBS洗2遍,细胞悬浮于0.4 mL PBS中,用流式细胞仪进行检测。

1.2.2 DCs过继转移及糖尿病发病检测 24只8 wk龄BALB/c小鼠,随机分为3组:空白对照组、模型对照组和DCs过继组,每组8只。DCs处理组小鼠ip给以上述DCs,剂量为 3×10^5 个/只,模型组小鼠给以200 μL生理盐水。按照文献[5]方法,除空白对照组外,各组小鼠每日ip 40 mg/kg的链脲佐菌素,连续5 d,建立IDDM模型。各组小鼠每日称质量,每周测定血糖值,以血糖值 ≥ 16.7 mmol/L诊断为糖尿病。造模4 wk后,实验动物摘眼球取血,分离血清,采用酶联免疫分析法(ELISA)测定血清中IL-2和IL-4含量,操作步骤按试剂盒说明

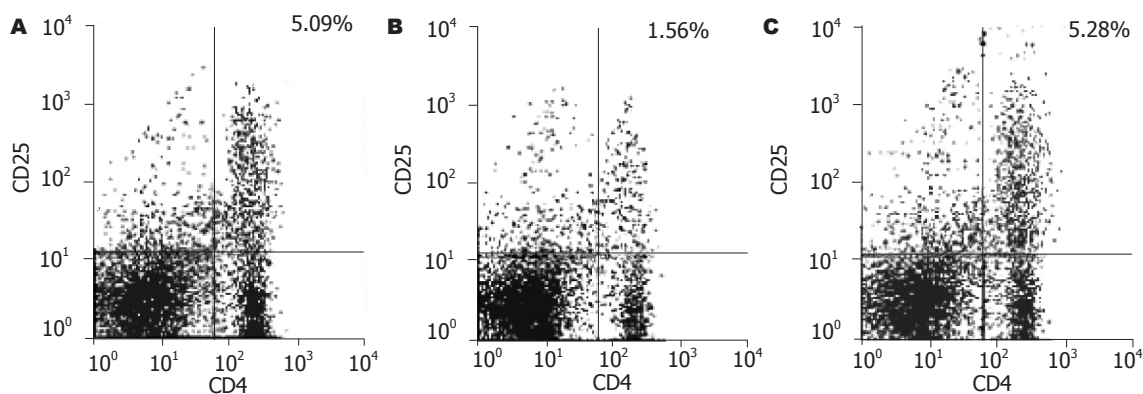


图1 DC过继后IDDM小鼠脾脏CD4⁺CD25⁺T细胞亚群比例的变化. A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: DCs处理组.

■创新盘点

本研究从小鼠骨髓细胞前体诱导树突状细胞, 将其过继转移至STZ诱导的IDDM模型体内, 成功建立了免疫耐受. 目前, 在国内尚无相关报道.

表1 DCs过继对IDDM模型小鼠血糖的影响. (mean ± SD, mmol/L, n = 8)

分组	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk
空白对照	5.72 ± 1.24	6.27 ± 0.92	5.87 ± 1.65	7.02 ± 1.35
模型对照	14.40 ± 1.57	15.04 ± 2.06	15.34 ± 1.48	18.36 ± 1.55
DCs处理	7.56 ± 1.08 ^a	7.06 ± 1.30 ^b	8.18 ± 0.85 ^b	8.32 ± 1.05 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 模型对照组.

进行. 脱颈臼法处死各组小鼠, 无菌取小鼠脾细胞, 制备单个脾细胞悬液. 采用台盼蓝计数后, 将2×10⁶细胞接种于96孔板内, 同时加入总浓度为5 mg/L的ConA, 37℃, 50 mL/L CO₂孵育72 h后, 每孔加入MTT(5 g/L)溶液20 μL, 继续培养4 h, 加入DMSO 150 μL, 充分振荡后在570 nm的波长下采用酶标仪测定A值. 取上述脾细胞悬液, 调整细胞浓度为1×10¹⁰/L, 于200 μL细胞悬液中分别加入FITC标记抗小鼠CD4和PE标记抗小鼠CD25 mAb或相关阴性对照, 4℃孵育30 min后, 以PBS离心洗2次, 重新悬于0.4 mL的PBS液后流式细胞仪检测.

统计学处理 所有数据以mean±SD表示, 实验数据以组间t检验处理.

2 结果

2.1 体外培养DCs的形态及纯度分析 光镜下观察可见, 小鼠骨髓细胞在细胞因子GM-CSF存在的条件下培养从第2天开始可见部分细胞形状不规则且有短的毛刺状突起, 随培养时间的延长, 绝大部分细胞体积增大, 毛刺状突起拉长, 为典型树突状细胞形态特征. 经流式细胞仪测定, 培养7 d的DCs高水平表达相对特异性标志CD11c, 纯度达到86.33%.

2.2 DCs过继转移对IDDM模型小鼠发病的影响 BALB/c小鼠经少量多次ip STZ后可建立血糖进

表2 DCs过继对血清IL-2, IL-4的影响. (mean ± SD, ng/L, n = 8)

分组	IL-2	IL-4
空白对照	104 ± 25	119 ± 29
模型对照	195 ± 32	76 ± 30
DCs处理	121 ± 19 ^a	187 ± 36 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 模型对照组.

行性升高的IDDM模型. 模型建立1 wk后小鼠出现多饮、多尿及体重减轻的典型糖尿病症状. 与正常小鼠相比, 模型组小鼠血糖值显著升高(P<0.01). DCs过继转移可明显预防糖尿病的发生, 血糖值与模型组相比, 具有极显著性差异(P<0.01, 表1).

2.3 淋巴细胞增殖实验 小鼠脾淋巴细胞在体外经ConA刺激后增殖, 采用MTT法在570 nm的波长下测定A值, 空白对照组为0.315±0.028. 与模型对照组(0.489±0.012)相比, DCs处理组脾淋巴细胞增殖能力显著降低(0.264±0.019), 差异有显著性(P<0.05).

2.4 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞亚群分析 经流式细胞仪测定, 模型对照组小鼠脾脏CD4⁺CD25⁺T细胞比例仅1.56%, 明显低于正常对照组小鼠的5.09%. 而经DCs处理组CD4⁺CD25⁺T细胞比例恢复到5.28%(图1, 其中每图右上象限表示CD4⁺CD25⁺T细胞亚群).

■应用要点

本研究利用髓源性树突状细胞建立免疫耐受防治1型糖尿病,为树突状细胞在自身免疫性疾病尤其是1型糖尿病中的应用提供了理论基础,对于1型糖尿病免疫平衡的重建有一定价值。

2.5 DCs过继对血清细胞因子IL-2, IL-4的影响 经ELISA测定,结果表明,糖尿病小鼠IL-2水平显著升高,而IL-4含量明显下降.与模型对照组相比,DCs过继转移可有效降低IL-2水平($P<0.05$)并促进IL-4的分泌($P<0.01$)(表2).

3 讨论

IDDM为器官特异性自身免疫性疾病.在其发病中有许多免疫细胞参与,其中自身反应性T淋巴细胞起主要作用. STZ是从无色链霉菌属分离出来的一种广谱抗生素,具有选择性 β 细胞毒性.目前较多采用的是少量多次STZ法,可诱导类似于人类IDDM的实验动物模型^[6-8].大量证据表明,该模型具备T细胞依赖性特征,自身免疫性细胞因子如IL-2, IFN- γ 和TNF等在发病中发挥了重要作用,从而导致胰岛炎和 β 细胞的进行性破坏,引起血糖升高.目前,这一模型已被广泛应用于自身免疫性糖尿病的研究.由于自身免疫反应的增强是IDDM发病中的主要因素,因此,重建机体对自身抗原的免疫耐受是1型糖尿病免疫治疗的关键. DCs是机体免疫系统最重要的抗原提呈细胞,在机体的自身免疫调节中也发挥着相当重要的作用.最近还发现,DC能调节和诱导调节性T细胞的发育,从而影响中枢性和外周性免疫耐受,因此成为近几年免疫学领域研究的热点之一^[9-10].已有报道认为,DCs的过继转移可以减少自身免疫性疾病如实验性自身免疫性脑脊髓炎和胶原诱导的关节炎的发病率^[11]. Yarinlin *et al*^[12]的研究也发现,体外经过处理的DCs过继转移可以有效缓解实验性自身免疫性重症肌无力的症状.因此,通过深入研究DCs在自身免疫病中的作用可望使该类疾病的预防和治疗有新的突破.基于此,我们体外培养高纯度的髓源性DCs,过继转移至IDDM小鼠模型内,观察其对糖尿病小鼠发病的作用,通过测定调节性T细胞亚群比例和体内细胞因子分泌水平,探讨其诱导免疫耐受的机制.

按DCs的来源可将其分为髓系来源DCs及淋巴系来源DCs. GM-CSF是髓系DCs前体的分化发育中最根本的细胞因子.利用GM-CSF,可在体外从骨髓前体细胞中扩增大量DCs^[13].由于该方法相对外周血中分离DCs,具有操作简便,分离得到细胞数量大等优点,现已被广泛用于对DCs的各种研究.本研究通过体外培养髓源性DCs,采用CD11c作为小鼠DC的相对特异性标志^[14],纯度可达到85%以上.实验中观察到在髓

源性DCs过继转移后,小鼠并未发生明显的糖尿病,血糖值显著低于模型对照组($P<0.01$),提示通过体外过继髓源性DCs可以有效防止IDDM的发生. $CD4^+CD25^+$ T细胞在维持自身免疫耐受中起重要作用^[15].其功能是通过抑制自身反应性T细胞活化,从而抑制自身免疫性疾病的发生,因此属于调节性T细胞,他所参与的免疫调节是个体维持免疫自稳的重要调节机制之一.已证实的多种预防和治疗IDDM的途径,其保护机制与体内不同类型的调节性T细胞相关联^[16].本研究发现,糖尿病模型小鼠脾脏 $CD4^+CD25^+$ T细胞仅1.43%,而正常小鼠为5.09%,因此调节性T细胞数量的减少可能是IDDM发病中的一个重要机制.当过继转移髓源性DCs给IDDM小鼠后,小鼠脾脏 $CD4^+CD25^+$ T细胞可增加到5.28%,提示DCs过继转移可通过促进体内 $CD4^+CD25^+$ T细胞的产生达到诱导小鼠免疫耐受的目的. IDDM患者外周血单个核细胞及NOD小鼠的脾淋巴细胞,其增殖率明显高于正常人和正常小鼠^[17].在STZ所致糖尿病小鼠模型中也观察到相同的结果($P>0.05$).在DCs过继转移诱导耐受的小鼠中, $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞亚群比例的增加,这类调节性T细胞可以“主动”的方式对自身反应性T细胞进行活化抑制,因此脾淋巴细胞增殖能力明显下降.在对血清细胞因子的测定实验中发现,DCs过继可有效降低Th1型细胞因子IL-2的含量,促进Th2型细胞因子IL-4的分泌.这一免疫反应的偏离可有效预防小鼠糖尿病的发生. $CD4^+CD25^+$ T细胞可高表达IL-10和TGF- β 等抑制性细胞因子,诱导 $CD4^+$ T细胞由Th1型转向Th2型,从而保护胰岛免受自身反应性免疫攻击.所以免疫耐受小鼠的这一免疫偏离状态可能与 $CD4^+CD25^+$ T细胞比例的增加密切相关.

总之,体外培养髓源性DCs过继转移可诱导IDDM模型小鼠免疫耐受的产生,其机制与促进体内 $CD4^+CD25^+$ 调节性T细胞的产生,纠正体内Th1/Th2型细胞因子失衡状态,从而防止IDDM的发生有关.基于DCs过继诱导免疫耐受的策略,可能成为预防IDDM的一条新思路.

4 参考文献

- 1 Zhu M, Wei MF, Liu F, Shi HF, Wang G. Interleukin-10 modified dendritic cells induce allo-hyporesponsiveness and prolong small intestine allograft survival. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2509-2512
- 2 Huang YM, Yang JS, Xu LY, Link H, Xiao BG. Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance

- to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 437-444
- 3 Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest* 2005; 115: 5-12
- 4 Clare-Salzler MJ, Brooks J, Chai A, Van Herle K, Anderson C. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *J Clin Invest* 1992; 90: 741-748
- 5 Holstad M, Sandler S. A transcriptional inhibitor of TNF-alpha prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice. *J Autoimmun* 2001; 16: 441-447
- 6 Yang Z, Chen M, Fialkow LB, Ellett JD, Wu R, Nadler JL. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas* 2003; 26: e99-e104
- 7 Mensah-Brown EP, Stosic Grujicic S, Maksimovic D, Jasima A, Shahin A, Lukic ML. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Mol Immunol* 2002; 38: 941-946
- 8 向明, 张程亮, 邹晓蕾, 蔡晓寒, 彭佳蓓. 树突状细胞和调节性T细胞在自身抗原所致小鼠免疫耐受模型中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 687-692
- 9 Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. *Immunity* 2003; 18: 605-617
- 10 Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445-449
- 11 Xiao BG, Huang YM, Yang JS, Xu LY, Link H. Bone marrow-derived dendritic cells from experimental allergic encephalomyelitis induce immune tolerance to EAE in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 300-309
- 12 Yarinlin D, Duan R, Huang YM, Xiao BG. Dendritic cells exposed *in vitro* to TGF-beta1 ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 214-219
- 13 Cayeux S, Richter G, Becker C, Pezzutto A, Dorken B, Blankenstein T. Direct and indirect T cell priming by dendritic cell vaccines. *Eur J Immunol* 1999; 29: 225-234
- 14 Basak SK, Harui A, Stolina M, Sharma S, Mitani K, Dubinett SM, Roth MD. Increased dendritic cell number and function following continuous *in vivo* infusion of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* 2002; 99: 2869-2879
- 15 Kondo Y, Kobayashi K, Ueno Y, Shiina M, Niitsuma H, Kanno N, Kobayashi T, Shimosegawa T. Mechanism of T cell hyporesponsiveness to HBcAg is associated with regulatory T cells in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4310-4317
- 16 Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 423-449
- 17 Xue M, Thompson PJ, Clifton-Bligh R, Fulcher G, Gallery ED, Jackson C. Leukocyte matrix metalloproteinase-9 is elevated and contributes to lymphocyte activation in type I diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2406-2416

■名词解释

1 树突状细胞: 已知机体内最重要的专职抗原提呈细胞(APC), 在体内数量较少, 在体内可诱导强烈的免疫反应, 同时在自身免疫耐受的维持中也发挥重要作用。

2 免疫耐受: 指在一定条件下, 机体免疫系统接触某种抗原后所产生的对该抗原的特异性弱应答或无应答状态。

电编 李琪 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 •

第五届中国百种杰出学术期刊评选揭晓

本刊讯 第五届中国百种杰出学术期刊评选日前揭晓, 周光召院士任主编的《科学通报》、韩启德院士任主编的《北京大学学报医学版》以及马连生任主编的《World Journal of Gastroenterology》等100种期刊入选“第五届中国百种杰出学术期刊”。中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》, 定期公布《中国科技论文与引文数据库》(CSTPCD)收录的中国科技核心期刊的十余项科学计量指标, 目前该数据库共收录中国科技核心期刊1652种。(记者 潘锋 2006-11-08)

缺氧对大鼠肝细胞转化生长因子 β_1 表达的影响

李侠, 詹皓, 齐颖, 王琼, 赵安东, 王喆, 笪冀平, 施新猷

■背景资料

临床上缺氧可以引起多组织器官的损伤和不同系统的疾病, 而且缺氧对机体的损伤机制和防护措施的研究在航空航天医学领域亦具有重要意义和实用价值。近年的研究表明, 转化生长因子 β_1 在脑、心、骨骼、周围神经等器官组织的缺血缺氧损伤和修复中起重要作用, 但关于缺氧条件下肝组织中该因子表达的变化研究较少。

李侠, 詹皓, 齐颖, 王琼, 赵安东, 中国人民解放军空军航空医学研究所 北京市 100036

王喆, 笪冀平, 中国人民解放军空军总医院病理科 北京市 100036

施新猷, 第四军医大学动物实验室 陕西省西安市 710032

李侠, 1998年第四军医大学硕士, 主任医师, 主要从事临床医学及病理生理的分子生物学研究。

通讯作者: 李侠, 100036, 北京市海淀区阜成路28号一室, 中国人民解放军空军航空医学研究所。jbslawyer158@sina.com

电话: 010-81817155 传真: 010-66927100

收稿日期: 2006-08-21 接受日期: 2006-09-12

Effects of anoxia on expression of transforming growth factor- β_1 in rat liver

Xia Li, Hao Zhan, Ying Qi, Qiong Wang, An-Dong Zhao, Zhe Wang, Ji-Ping Da, Xin-You Shi

Xia Li, Hao Zhan, Ying Qi, Qiong Wang, An-Dong Zhao, Institute of Aviation Medicine, Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China

Zhe Wang, Ji-Ping Da, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China
Xin-You Shi, Department of Animal Laboratory, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Dr. Xia Li, Institute of Aviation Medicine, Chinese PLA Air Force, 28 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100036, China. jbslawyer158@sina.com

Received: 2006-08-21 Accepted: 2006-09-12

Abstract

AIM: To investigate the effect of anoxia on the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in the rat liver.

METHODS: A total of 20 Sprague Dawley rats were used in this study. Trachea obstructive method was employed to establish the animal model of mild, moderate, and severe anoxia. Liver samples were collected 15 and 60 min after obstruction for the examination of TGF- β_1 expression using immunohistochemical technique.

RESULTS: TGF- β_1 was not or lowly expressed in normal rats (3.6 ± 1.9 and 3.6 ± 1.9 , respectively at 15 and 60 min). The level of hepatic TGF- β_1 expression was increased with prolonging of anoxia time and enhancement of anoxia degree. The expression of hepatic TGF- β_1 at 15 and 60

min was 8.5 ± 2.0 and 15.2 ± 3.1 under mild anoxia, 18.4 ± 3.5 and 63.7 ± 3.8 under moderate anoxia, and 68.9 ± 3.2 and 86.7 ± 3.6 under severe anoxia, respectively. There were significant differences between normal and anoxia rats ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

CONCLUSION: TGF- β_1 expression is increased under the condition of anoxia, which accelerates the formation of extracellular matrix, and further contributes to the repair and regeneration of liver cells.

Key Words: Anoxia; Transforming growth factor- β_1 ; Hepatic cell; Rat; Immunohistochemistry

Li X, Zhan H, Qi Y, Wang Q, Zhao AD, Wang Z, Da JP, Shi XY. Effects of anoxia on expression of transforming growth factor- β_1 in rat liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3180-3183

摘要

目的: 探讨缺氧对转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)在肝细胞表达的影响。

方法: 选择SD大鼠20只, 采用气管阻塞的方法建立轻、中、重度的缺氧模型, 15 min和60 min采集肝脏标本, 用免疫组化技术SABC法检测肝细胞转化生长因子 β_1 表达的变化。

结果: 在正常肝脏中TGF- β_1 极少表达或无表达(15和60 min分别为 3.6 ± 1.9 , 3.6 ± 1.9), 随着缺氧时间的延长与缺氧程度的加重, 肝细胞转化生长因子 β_1 表达逐渐增加(轻度缺氧15和60 min分别为 8.5 ± 2.0 , 15.2 ± 3.1 ; 中度缺氧15和60 min分别为 18.4 ± 3.5 , 63.7 ± 3.8 ; 重度缺氧15和60 min分别为 68.9 ± 3.2 , 86.7 ± 3.6)。

结论: 大鼠缺氧条件下肝脏TGF- β_1 表达增加可促进细胞外基质的合成, 有利于肝细胞的再生与修复。

关键词: 缺氧; 转化生长因子 β_1 ; 肝细胞; 大鼠; 免疫组化

李侠, 詹皓, 齐颖, 王琼, 赵安东, 王喆, 管冀平, 施新猷. 缺氧对大鼠肝细胞转化生长因子 β_1 表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3180-3183

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3180.asp>

0 引言

众所周知, 临床上缺氧可以引起多组织器官的损伤和不同系统的疾病; 而且缺氧对机体的损伤机制和防护措施的研究在航空航天医学领域亦具有重要意义和实用价值. 近年来的研究表明, 转化生长因子 β_1 在脑、心、骨骼、周围神经等器官组织的缺血缺氧损伤和修复中起重要作用^[1-5], 但关于缺氧条件下肝组织该因子表达的变化研究甚少. 为探讨缺氧对肝转化生长因子 β_1 表达的影响, 本研究以SD大鼠为对象, 采取轻、中、重度缺氧条件下的肝脏标本, 用免疫组化方法观察了肝细胞转化生长因子 β_1 在不同的缺氧程度和缺氧时间表达水平的变化.

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠20只, 体质量120-140 g, 购自军事医学科学院实验动物中心. TGF- β_1 鼠mAb与免疫组化SABC试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司. 大鼠随机分4组: 轻度缺氧组、中度缺氧组、重度缺氧组及正常对照组. 大鼠ip苯巴比妥(40 mg/kg)麻醉后行气管插管, 气管阻塞1/2为轻度窒息缺氧, 气管阻塞2/3为中度窒息缺氧, 气管完全阻塞为重度窒息缺氧. 各组均取缺氧15 min和60 min时的肝组织, 用40 g/L甲醛固定24 h, 然后用石蜡包埋固定, 做连续切片5 μ m, 脱蜡, 分别进行HE染色与免疫组化染色. 切片用双盲法在显微镜下观察, 每张切片取5个高倍视野($\times 400$).

1.2 方法 石蜡切片, 脱水, 采用ABC法, 按照试剂盒说明进行, 检测正常与实验组TGF- β_1 抗原蛋白, 切片经过DAB染色, 染色过程中设阳性和阴性对照. 细胞核为蓝色, 胞质内着棕褐色为阳性细胞, 阴性(-)为细胞内未见棕褐色颗粒, 弱阳性(±)为细胞内棕褐色颗粒极少表达, 轻度阳性(+)为细胞内棕褐色颗粒局灶性弱表达, 中度阳性(++)为较大片肝细胞内着棕褐色颗粒或小局灶性着棕褐色颗粒的强表达, 强阳性(+++)为弥漫性肝细胞内着深棕褐色颗粒重度表达. 结果的定量判断是计数100个细胞, 轻度阳性为着色阳性细胞比例小于25%, 中度阳性为着色阳性细胞比例为25%-75%, 强阳性为着色阳性细胞比例

表 1 大鼠缺氧时肝细胞TGF- β_1 蛋白表达的定性和定量比较

分组	定性		定量	
	15 min	60 min	15 min	60 min
正常	±	±	3.6 ± 1.9	3.6 ± 1.9
轻度缺氧	±	+	8.5 ± 2.0	15.2 ± 3.1 ^d
中度缺氧	+	++	18.4 ± 3.5 ^a	63.7 ± 3.8 ^{ad}
重度缺氧	++	+++	68.9 ± 3.2 ^{bc}	86.7 ± 3.6 ^{bcd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常和轻度缺氧组; ^c $P < 0.05$ vs 中度缺氧组; ^d $P < 0.01$ vs 15 min.

为大于75%.

统计学处理 用SPSS统计学软件包对数据进行处理, 所有计量数据资料用mean ± SD表示, 组间比较采用方差分析.

2 结果

典型肝细胞TGF- β_1 抗原蛋白表达为细胞核蓝色, 胞质着棕褐色. 各组间TGF- β_1 抗原蛋白表达水平有明显差异. 随着缺氧时间的延长和缺氧程度的加重, 各组肝细胞TGF- β_1 抗原蛋白表达逐渐增强(表1, 图1).

3 讨论

转化生长因子是细胞产生和分化的多功能调节因子, 具有调节细胞增殖, 分化及细胞外基质合成代谢的作用^[6-7]. TGF- β_1 主要由血小板、单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞和淋巴细胞等合成, 其生理功能很多, 最早发现他能促进成纤维细胞的生长, 其后发现在调节细胞周期、伤口愈合、血管形成、细胞分化、胚胎形成、免疫调节、细胞凋亡等方面都有作用. 迄今的研究表明, TGF- β_1 参与肝损伤有关的一些临床疾病的病理生理过程^[8-10]. 在肝脏中, TGF- β_1 是最主要的成份, 他主要由肝脏的贮脂细胞/肌成纤维细胞、枯否细胞及内皮细胞等合成. 枯否细胞、成纤维细胞和血小板合成的TGF β 78%-98%是无活性的, 需经内皮细胞通过纤维蛋白溶酶的作用, 将其结构中的LAP裂解, 使其转化为有活性的TGF- β_1 , 后者能与其相应受体结合, 发挥生理功能. 国外研究较多的当属TGF- β_1 对细胞外基质的合成及降解的影响^[10]. 肝脏受损后刺激单核巨噬细胞因子, 在经内皮细胞活化后, 以旁分泌和自分泌方式作用于贮脂细胞及其激活后的成纤维细胞, 促进细胞外

■ 相关报道

迄今的许多研究表明, TGF- β_1 在肝硬化与肝癌中与肝损伤有关国外研究较多的当属TGF- β_1 对细胞外基质的合成及降解的影响. 肝脏受损后刺激单核巨噬细胞因子, 在经内皮细胞活化后, 以旁分泌和自分泌方式作用于贮脂细胞增殖与肌成纤维细胞, 说明TGF- β_1 与肝纤维化的发生密切相关. 另有研究表明, 由于能够促进细胞外基质合成, TGF- β_1 在创伤修复中起重要作用.

■应用要点

探讨缺氧对TGF- β_1 在肝细胞表达的影响, TGF- β_1 参与大鼠缺氧条件下肝脏细胞的生理与病理过程, 其表达增加可促进细胞外基质的合成, 有利于肝细胞的再生与修复. 本研究结果有可能开辟缺氧状态下保护与治疗肝脏细胞损失的科学理论依据.

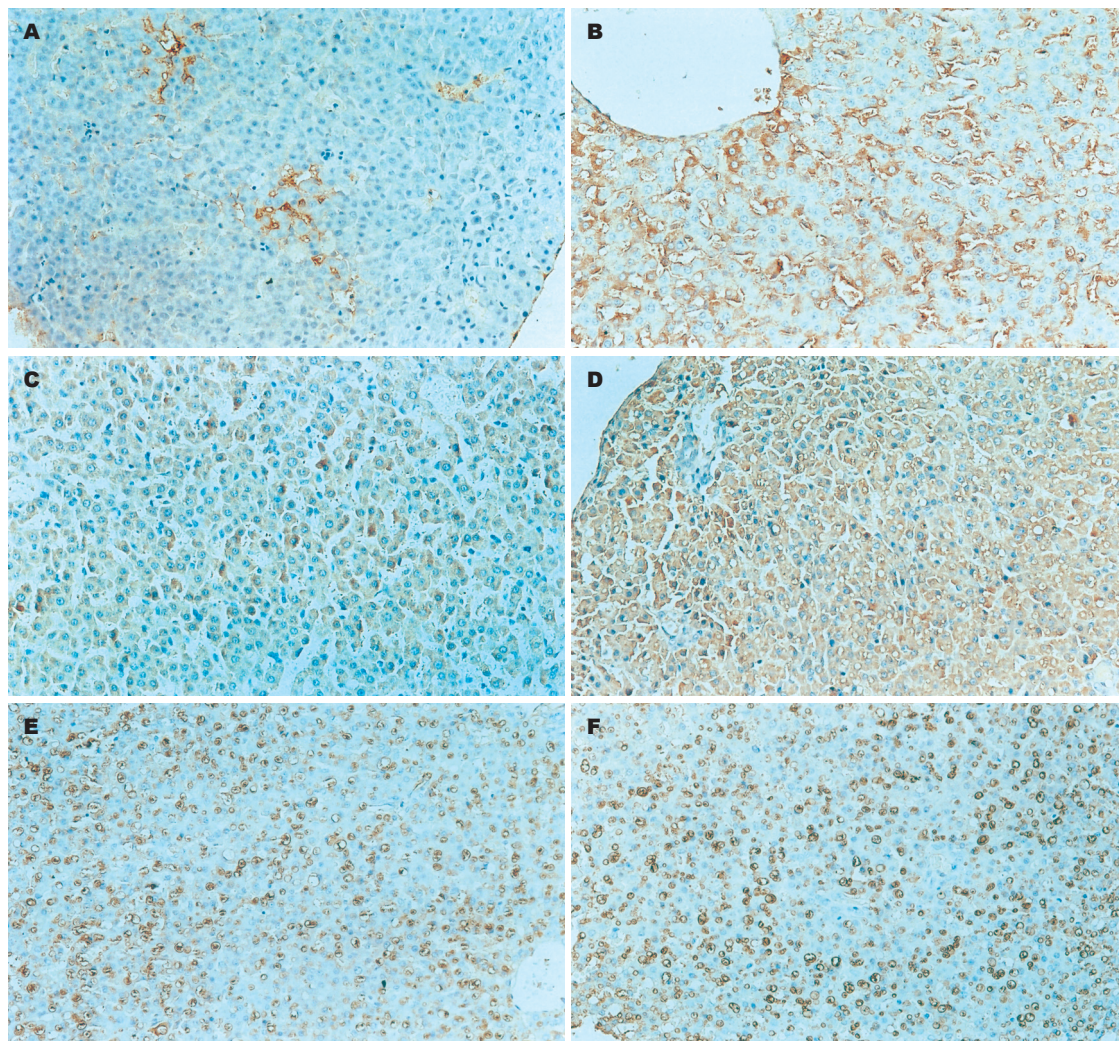


图1 大鼠肝脏TGF- β_1 表达(SABC $\times 400$). A: 轻度缺氧组15 min; B: 轻度缺氧组60 min; C: 中度缺氧组15 min; D: 中度缺氧组60 min; E: 重度缺氧组15 min; F: 重度缺氧组60 min.

基质的合成, 促进贮脂细胞增殖与肌成纤维增殖^[11], TGF- β_1 与肝纤维化的发生密切相关^[12-14]. 有研究表明, 由于能够促进细胞外基质与蛋白多糖合成, TGF- β_1 在创伤修复中起重要作用^[15-17].

本研究的结果表明, 在正常大鼠肝脏中TGF- β_1 极少表达或无表达, 随着缺氧时间的延长与缺氧程度的加重, 肝细胞转化生长因子 β_1 表达逐步增加. 提示TGF- β_1 与缺氧条件下肝细胞的病理生理过程, TGF- β_1 有可能对缺氧导致肝细胞损伤的再生与修复起重要作用. 本研究结果与近年来国内外关于TGF- β_1 对非缺氧条件所致肝细胞损伤具有再生与修复作用的报道相一致^[17-19]. 关于TGF- β_1 是如何调控凋亡基因以减轻或逆转肝细胞的凋亡使损伤的肝细胞得到再生与修复等问题有待做更深入的研究.

4 参考文献

- 1 Benveniste EN, Kwon J, Chung WJ, Sampson J, Pandya K, Tang LP. Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF-beta. *J Immunol* 1994; 153: 5210-5221
- 2 李侠, 雷金竹. 转化生长因子 β 在神经组织、肝脏以及平滑肌损伤时的表达及作用. *空军总医院学报* 2002; 18: 93-94
- 3 李府, 郑立波, 薛波. 急性脑缺血小鼠脑组织中转化生长因子- β_1 的表达及意义. *中国当代儿科杂志* 2003; 5: 429-434
- 4 付小兵. 生长因子与创伤修复. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1991, 91-100
- 5 Lefer AM. Mechanisms of the protective effects of transforming growth factor-beta in reperfusion injury. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1323-1327
- 6 Arteaga CL, Carty-Dugger T, Moses HL, Hurd SD, Pietenpol JA. Transforming growth factor beta 1 can induce estrogen-independent tumorigenicity of human breast cancer cells in athymic mice. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 193-201
- 7 Warn RM, Warn A, Planques V, Robert-Nicoud M. Cytokines in the early Drosophila embryo. *Ann N*

- Y Acad Sci 1990; 582: 222-232
- 8 Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032: 79-87
- 9 庄岳鹏, 王崇国. 肝病患者血清TGF- α 和TGF- β_1 的检测及临床意义. *临床肝病杂志* 2001; 17: 28-29
- 10 Davis BH, Chen A. Transforming growth factor beta and liver regeneration: the stage may be set, but what's the script? *Hepatology* 1996; 23: 1703-1705
- 11 Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis-a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* 1995; 56: 335-346
- 12 丁宁, 李岩. 转化生长因子 β_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: 2521-2526
- 13 黄玉波, 魏红山, 董庆鸣, 刘志英, 郭晶晶, 成军, 毛羽. 转化生长因子 β_1 启动子区C-509T位点基因多态性与肝纤维化关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1093-1096
- 14 熊章鄂, 但自力, 唐望先, 严红梅. 中药肝炎平对CC1₄诱导的肝纤维化大鼠TGF β_1 /Smad信号通路的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 152-157
- 15 Roth S, Michel K, Gressner AM. (Latent) transforming growth factor beta in liver parenchymal cells, its injury-dependent release, and paracrine effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27: 1003-1012
- 16 Weiner JA, Chen A, Davis BH. E-box-binding repressor is down-regulated in hepatic stellate cells during up-regulation of mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression in early hepatic fibrogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 15913-15919
- 17 Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. *J Mol Med* 1999; 77: 556-564
- 18 许青, 李石. 转化生长因子 β 与肝纤维化. *国外医学·消化系统病分册* 1998; 18: 158-160
- 19 杨银辉, 付小兵, 孙同柱, 蒋礼先. 肠缺血再灌注损伤后大鼠肝和肺组织bFGF和TGF β 基因表达的变化. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 850-852

■同行评价

本研究内容重要也比较新颖, 缺氧对机体的损伤机制和防护措施的研究在临床医学上与航空航天医学领域亦具有重要意义, 具有科学性和创新性。

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 2007 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》2007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, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务人员及科教人员、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。

短发夹状RNA对人肝癌细胞环氧合酶-2的抑制作用

王华枫, 徐可树, 钱伟, 汪步海

■背景资料

环氧合酶-2在多种肿瘤的发生、发展和转移中起重要作用。RNA干扰是近年来出现的一种基因沉默技术,能快速、高效的阻滞肿瘤细胞或组织中异常或突变蛋白的表达。

王华枫, 徐可树, 钱伟, 汪步海, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

王华枫, 2006年华中科技大学同济医学院附属协和医院硕士, 主要从事肝癌的基础研究。

通讯作者: 徐可树, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. xuzou@medmail.com.cn

电话: 027-67119890

收稿日期: 2006-07-03 接受日期: 2006-08-10

Silencing cyclooxygenase-2 gene by construction of eukaryotic expression vector expressing short hairpin RNA in human hepatocellular carcinoma cells

Hua-Feng Wang, Ke-Shu Xu, Wei Qian, Bu-Hai Wang

Hua-Feng Wang, Ke-Shu Xu, Wei Qian, Bu-Hai Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Ke-Shu Xu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xuzou@medmail.com.cn

Received: 2006-07-03 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To construct the eukaryotic expression plasmids of short hairpin RNA (shRNA) specific to human cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and observe their inhibitory effects on COX-2 expression in human hepatocellular carcinoma cells.

METHODS: Plasmids named WBH1 and WBH2, containing the different sequences of human COX-2 mRNA coding region, were constructed. The expression of COX-2 was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively, 24, 48, 72 and 96 h after HepG2 and Bel7402 cells were transfected with liposomes.

RESULTS: The transfection rates in HepG2 and Bel7402 cells were about 60% and 54% respectively. RT-PCR showed that the inhibition efficiencies of the plasmid WBH1 were 18.5%,

88.6%, 52.8%, 42.4% in HepG2 cells and 9%, 45.1%, 70.1%, 56.3% in Bel7402 cells, respectively, 24, 48, 72 and 96 h after transfection ($P < 0.01$). Western blot demonstrated that the inhibition efficiencies of the plasmid WBH1 were 10.3%, 80.5%, 45.3%, 39.0% in HepG2 cells and 8.3%, 40.2%, 66.4%, 35.6% in Bel7402 cells, respectively ($P < 0.01$). The plasmid WBH2 had no significant inhibitory effect on COX-2 expression ($P > 0.05$).

CONCLUSION: COX-2 expression in human hepatocellular carcinoma cells can be inhibited significantly by construction of eukaryotic expression vector expressing the shRNA. The maximal inhibition occurs at the 48th and 72th h after transfection, respectively.

Key Words: Small hairpin RNA; Cyclooxygenase-2; Hepatocellular carcinoma

Wang HF, Xu KS, Qian W, Wang BH. Silencing cyclooxygenase-2 gene by construction of eukaryotic expression vector expressing short hairpin RNA in human hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3184-3189

摘要

目的: 构建针对人环氧合酶-2(COX-2)基因编码区的短发夹状RNA(shRNA)真核表达载体质粒, 观察其在不同时间点对人不同肝癌细胞株COX-2表达的影响。

方法: 以人COX-2 mRNA编码区作为RNA干扰靶点, 构建shRNA真核表达载体质粒WBH1和WBH2, 应用阳离子脂质体分别转染人肝癌细胞株HepG2和Bel7402, 利用逆转录聚合酶链反应和Western blot法分别观察两株细胞转染后24, 48, 72和96 h COX-2 mRNA和蛋白的表达变化, 检测抑制效果。

结果: 质粒在HepG2细胞和Bel7402细胞中的转染率分别约为60%和54%。WBH1导入细胞24, 48, 72和96 h后, 逆转录聚合酶链反应检测COX-2 mRNA表达抑制率, HepG2细胞分别为18.5%, 88.6%, 52.8%和42.4% ($P < 0.01$)。Bel7402细胞分别为9%, 45.1%, 70.1%和

56.3% ($P < 0.01$). Western blot法检测蛋白表达抑制率, HepG2细胞分别为10.3%, 80.5%, 45.3%和39.0% ($P < 0.01$); Bel7402细胞分别为8.3%, 40.2%, 66.4%和35.6% ($P < 0.01$). 质粒WBH2对COX-2的表达无影响 ($P > 0.05$).

结论: 针对人COX-2的shRNA能高效特异的抑制不同肝癌细胞株的COX-2表达. HepG2细胞和Bel7402细胞分别以48 h和72 h抑制效果最明显.

关键词: 短发夹状RNA; COX-2; 肝细胞癌

王华枫, 徐可树, 钱伟, 汪步海. 短发夹状RNA对人肝癌细胞环氧合酶-2的抑制作用. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3184-3189
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3184.asp>

0 引言

肝癌的发生和发展是多因素、多步骤的过程. 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)作为前列腺素生物合成过程中的一个重要限速酶, 在多种肿瘤的发生、发展和转移中起重要作用^[1]. 研究表明COX-2在肝癌组织中呈高表达, 应用COX-2抑制剂能抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡^[2]. 作为特异性阻断基因表达的新方法, RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近年来出现的一种基因沉默技术, 能快速、高效的阻滞肿瘤细胞或组织中异常或突变蛋白的表达, 目前已应用于基因功能、肿瘤及病毒性疾病等的研究^[3-5]. 我们利用RNA干扰技术, 设计构建编码人COX-2 mRNA的短发夹状双链RNA(small hairpin RNA, shRNA)的质粒载体, 并转染人不同肝癌细胞株, 观察其对COX-2表达的影响, 同时探讨利用RNA干扰技术作为肿瘤基因治疗的一种方法.

1 材料和方法

1.1 材料 pGenesil-1质粒、感受态大肠杆菌DH-5 α 购自武汉晶赛生物工程技术公司, 限制性核酸内切酶BamH I, Hind III, Sal I, Pst I, T4多聚核苷酸激酶和Taq酶购自大连宝生物工程有限公司, T4 DNA连接酶购自New England Biolabs, 凝胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒购自宁波中鼎公司, 寡核苷酸DNA单链由上海博亚生物技术有限公司合成. 阳离子脂质体jetPEITM购自Biontexas公司, COX-2, actin羊抗人多克隆一抗和辣根酶标记兔抗山羊IgG购自Santa Cruz公

司. 人肝癌细胞株HepG2, Bel7402由消化内科实验室提供, 细胞用含100 mL/L胎牛血清(FCS)的RPMI 1640液, 置于37℃, 50 mL/L CO₂孵育箱中培养, 定期观察细胞生长情况, 每2-3 d消化传代培养.

1.2 方法 根据shRNA设计原则构建质粒^[6]. 从人COX-2 mRNA编码区的起始密码(AUG)下游寻找两条以“AA”二联序列开始, 设计长度为21 nts的序列, 分别为5'-AAGTGCG ATTGTACCCGGACA-3', 5'-AAGAACGTT CGACTGAACTGT-3', 同时设计一条非特异性序列: 5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3'作为阴性对照, 并利用BLAST查询排除与其他人源基因的同源性. 按下列结构设计并合成编码shRNA序列的DNA单链: [BamH I

+Sense+Loop+Antisense+终止信号+Sal I +Hind III], 黑色背景为Loop环和终止信号, 两端框中为限制性核酸内切酶BamH I 和Hind III部分酶切残基. 设计的编码两条靶序列如下. 序列1: 5'-GATCCGTGCGATTGTACCCGGACAATTCAAGACGTGTCCGGGTACAATCGCACTTTTTGAATTC-3'; 3'-GACGCTAACATGGGCC TGTAAAGTTCTGCACAGGCCCATGTTAG CGTGAAAAAACTTAAGTTCGA-5'. 序列2: 5'-GATCCGAACGTTGCGACTGAACTGTTCAGACGACAGTTCAGTCGAACGTTCTTTTTGAGCTC-3'; 3'-GCTTGAAGCTGACTTGAC AAAGTTCTGCTGTCAAGTCAGCTTGCAAG AAAAACTCGAGTTCGA-5'. 阴性对照序列: 5'-GATCCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAGACGCGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTGTGCGAC-3'; 3'-GCTGAAGTATTCCGCGTAC GAAGTTCTGCGTACGCGGAATACTTCAGAAAAACAGCTGTTCGA-5'. 合成上述设计的双链DNA, 退火连接. 与BamH I 和Hind III酶切的质粒pGenesil-1连接, 转化感受态细胞. 挑选克隆扩增, 质粒提取, 限制性核酸内切酶Sal I 和Pst I 做酶切鉴定, 对重组质粒测序(上海博亚), 验证序列的准确性. 序列1, 2分别将重组质粒命名为WBH1和WBH2, 阴性对照质粒命名为HK.

1.2.1 细胞转染 将HepG2细胞和Bel7402细胞在含有100 mL/L FCS的RPMI 1640培养液中连续培养. 转染前1 d将两株细胞分别接种于6孔培养板, 每孔 2×10^5 个细胞, 过夜培养后将构建的WBH1, WBH2和HK 3种质粒分别转染细胞, 操作按脂质体jetPEITM转染手册进行. 取一试管加

■ 研发前沿

目前研究较多的COX-2抑制剂并非真正意义的特异性抑制, 其使用安全性也有待进一步的临床验证. RNA干扰作为特异性阻断基因表达的新方法, 目前已应用于基因功能、肿瘤及病毒性疾病等的研究.

■相关报道

COX-2在肝癌组织中呈高表达,应用COX-2抑制剂能抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡。已有报道利用腺病毒介导的COX-2反义RNA技术在抑制COX-2表达的同时,可抑制人肝癌细胞株的生长。与反义寡核苷酸基因治疗手段相比, RNA干扰技术对其基因抑制作用更强,特异性更高。

入质粒3 μg , 用100 μL 150 mmol/L NaCl混合稀释, 另一试管加入脂质体jetPEI™ 6 μL , 用100 μL 150 mmol/L NaCl混合稀释。室温无菌条件下放置5 min, 两试管液体混合后放置25 min, 在6孔板中每孔加入量为200 μL 混合液后培养4 h, 更换培养液继续培养。实验以未转染细胞为空白对照组, 细胞分4组: 空白对照组、WBH1转染组、WBH2转染组、HK转染组。每组设3复孔, 每个实验均重复3次。转染后48 h, 荧光显微镜下观察10个200倍视野下发绿色荧光的细胞占全部细胞的百分比即为细胞转染率。

1.2.2 COX-2 mRNA表达的测定 转染后24, 48, 72和96 h, 用TRIzol法分别提取各组细胞中总RNA, RT-PCR法分别扩增COX-2 mRNA, COX-2上游引物5'-TCAAGTCCCTGAGCATCTAC-3', 下游引物5'-CATTCCTACCACCAGCAACC-3'。PCR法反应条件为94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共35个循环, 循环结束后72℃ 6 min延伸, 扩增片段长度为488 bp。β-actin为内参照, β-actin上游引物为5'-GAAACTACCTTCAACTCCATC-3', 下游引物为5'-CGAGGCCAGGATGGAGCCGCC-3', PCR法反应条件为94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 48℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共35个循环, 循环结束后72℃ 6 min延伸, 扩增片段长度为219 bp。扩增产物用15 g/L琼脂糖凝胶电泳检测结果, 在凝胶成像系统中测出各条带面积灰度值, 以各组COX-2与自身β-actin灰度值的比作为各组细胞中COX-2 mRNA的相对含量。

1.2.3 Western blot法对COX-2蛋白表达测定 转染后24, 48, 72和96 h, 收集上述各组细胞, 消化后加入预冷的细胞裂解液, 置冰上30 min, 4℃, 12 000 g离心, 取上清液进行蛋白定量, 每组取50 μg 蛋白加热变性后, 100 g/L SDS-PAGE电泳分离, 转移至PVDF膜上, 含50 g/L脱脂奶粉的Tris盐溶液封闭2 h, 加入COX-2羊抗人多克隆一抗(1:200), 4℃孵育过夜。用含吐温-20的Tris盐溶液洗膜3次, 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗(1:2000), 室温下孵育1 h。化学发光法(ECL法)检测条带。actin作为内参。计算机扫描图像, 测出各条带面积灰度值, 以各组COX-2与自身actin灰度值的比作为各组细胞中COX-2蛋白的相对含量。

统计学处理 PCR法及Western blot法所得相应的条带, 采用美国Biorad公司Quantity One 4.0图像分析软件进行扫描分析, 采用SPSS 10.0统计软件包进行单因素方差分析。

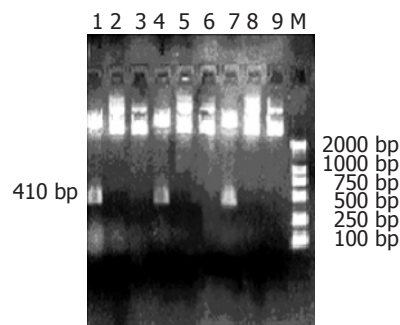


图1 重组质粒的酶切鉴定。1: HK *Sal* I; 2: HK *Pst* I; 3: HK; 4: WBH2 *Sal* I; 5: WBH2 *Pst* I; 6: WBH2; 7: WBH1 *Sal* I; 8: WBH1 *Pst* I; 9: WBH1; M: DL2000 Marker。

2 结果

我们共得到3个重组质粒, 编码两条靶序列的重组质粒WBH1, WBH2及阴性对照质粒HK。质粒pGenesil-1能够被*Pst* I所酶切, 而插入目的基因片段之后, *Pst* I酶切位点被取代, 不能被*Pst* I所酶切。pGenesil-1序列中无*Sal* I的酶切位点, 在插入的目的基因片段里, 我们设计了一个*Sal* I的酶切位点, 如若插入正确, 就能被*Sal* I酶切出一条约410 bp的条带, 重组shRNA表达质粒WBH1, WBH2和HK均能被*Sal* I酶切, 而不能为*Pst* I酶切, 即为插入正确的质粒(图1)。质粒中含有编码绿色荧光蛋白的基因, 转染后48 h荧光显微镜下以10个200倍视野下有绿色荧光的细胞占全部细胞的百分比计算转染率。HepG2细胞WBH1转染组、WBH2转染组和HK转染组转染率分别为60.20%±1.95%, 60.30%±1.00%, 60.84%±0.05%(图2A-B)。Bel7402细胞WBH1转染组、WBH2转染组和HK转染组转染率分别为54.19%±1.09%, 54.10%±0.83%, 54.21%±0.78%(图2C-D)。两株细胞3组间转染率均无统计学差异($P>0.05$)。

2.1 shRNA对COX-2 mRNA表达的影响 如表1所示, HepG2细胞WBH2转染组与HK转染组COX-2相对表达量分别为0.607±0.054, 0.610±0.041, 与空白对照组(0.614±0.048)比较无显著差异($P>0.05$, 图3A)。转染后24, 48, 72, 96 h, WBH1转染组COX-2相对表达量分别为0.500±0.012, 0.070±0.023, 0.290±0.010, 0.354±0.018, 与空白对照组比较有显著差异($P<0.01$, 图3A)。24, 48, 72, 96 h抑制率分别为18.5%, 88.6%, 52.8%, 42.4%。质粒WBH1对HepG2细胞COX-2 mRNA的表达以48 h时间点的抑制率最高, 以后逐渐下降。Bel7402细胞WBH2转染组与HK转染

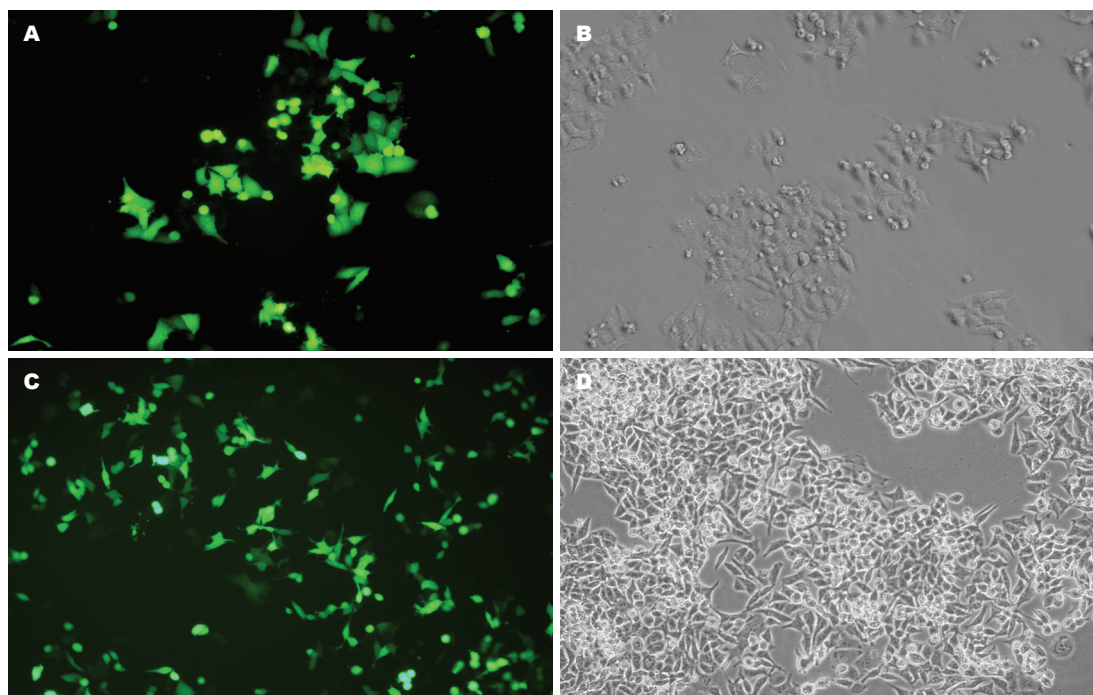


图 2 人肝癌细胞的转染效率($\times 200$). A: HepG2细胞转染后48 h, 荧光显微镜; B: HepG2细胞相同视野, 普通光线; C: Bel7402细胞转染后48 h, 荧光显微镜; D: Bel7402细胞相同视野, 普通光线.

■应用要点

本文设计构建编码人COX-2 mRNA的短发夹状双链RNA的质粒载体, 并转染人不同肝癌细胞株, 观察其对COX-2表达的影响, 为进一步研究COX-2与肝癌的生物学特性及肿瘤的基因治疗提供了实验依据.

组COX-2相对表达量分别为 0.720 ± 0.018 , 0.723 ± 0.020 , 与空白对照组(0.726 ± 0.024)比较无显著差异($P > 0.05$, 图3B). WBH1转染组COX-2相对表达量分别为 0.660 ± 0.020 , 0.398 ± 0.014 , 0.217 ± 0.031 , 0.354 ± 0.038 , 与空白对照组比较有显著差异($P < 0.01$, 图3B). 24, 48, 72, 96 h抑制率分别为9.0%, 45.1%, 70.1%, 56.3%. 质粒WBH1对Bel7402细胞COX-2 mRNA的表达以72 h时间点的抑制率最高, 以后逐渐下降.

2.2 shRNA对COX-2蛋白表达的影响 COX-2在SDS-PAGE凝胶电泳中表现为72 kDa和74 kDa两条条带. 如表1所示, HepG2细胞WBH2转染组与HK转染组COX-2蛋白相对表达量分别为 0.397 ± 0.011 , 0.403 ± 0.017 , 与空白对照组(0.415 ± 0.023)相比无显著差异($P > 0.05$, 图4A). 转染后24, 48, 72, 96 h, WBH1转染组COX-2蛋白相对表达量分别为 0.372 ± 0.007 , 0.081 ± 0.015 , 0.227 ± 0.017 , 0.253 ± 0.008 , 与空白对照组比较有显著差异($P < 0.01$, 图4A). 24, 48, 72, 96 h抑制率分别为10.3%, 80.5%, 45.3%, 39.0%. Bel7402细胞WBH2转染组与HK转染组COX-2蛋白相对表达量分别为 0.520 ± 0.011 , 0.523 ± 0.006 , 与空白对照组(0.526 ± 0.007)相比无显著差异($P > 0.05$, 图4B). 转染后24, 48, 72, 96 h, WBH1转染组COX-2蛋白相对表达量分别为 0.482 ± 0.014 , $0.316 \pm$

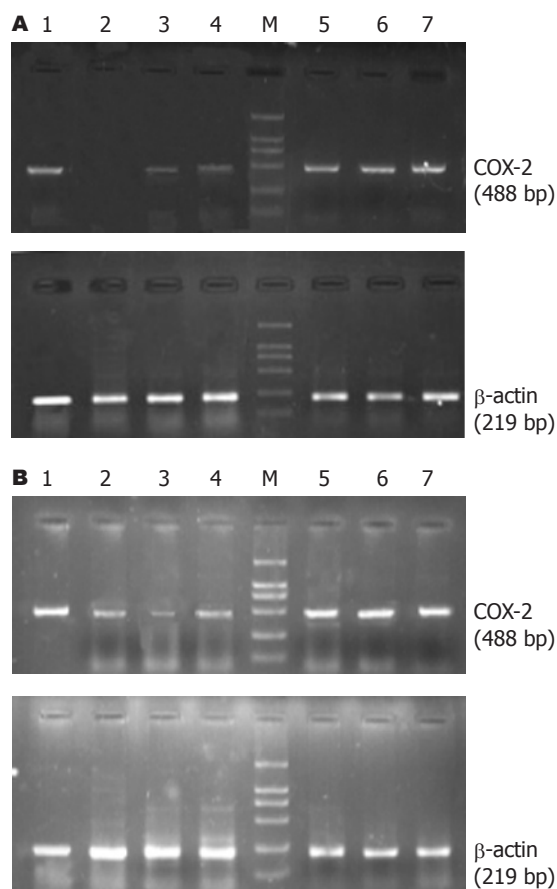


图 3 人肝癌细胞COX-2 mRNA的表达. A: HepG2; B: Bel7402; 1: 24 h WBH1转染组; 2: 48 h WBH1转染组; 3: 72 h WBH1转染组; 4: 96 h WBH1转染组; 5: 48 h空白对照组; 6: 48 h WBH2转染组; 7: 48 h HK转染组; M: marker.

■名词解释

RNA干扰(RNAi): 是利用双链RNA特异性介导其互补同源mRNA序列的降解的基因沉默技术。

表 1 shRNA对HepG2和Bel7402细胞COX-2相对表达量的影响

指标	细胞	空白对照	HK	WBH2	WBH1			
					24 h	48 h	72 h	96 h
mRNA	HepG2	0.614 ± 0.048	0.610 ± 0.041	0.607 ± 0.054	0.500 ± 0.012 ^b	0.070 ± 0.023 ^b	0.290 ± 0.010 ^b	0.354 ± 0.018 ^b
	Bel7402	0.726 ± 0.024	0.723 ± 0.020	0.720 ± 0.018	0.660 ± 0.020 ^b	0.398 ± 0.014 ^b	0.217 ± 0.031 ^b	0.354 ± 0.038 ^b
蛋白	HepG2	0.415 ± 0.023	0.403 ± 0.017	0.397 ± 0.011	0.372 ± 0.007 ^b	0.081 ± 0.015 ^b	0.227 ± 0.017 ^b	0.253 ± 0.008 ^b
	Bel7402	0.526 ± 0.007	0.523 ± 0.006	0.520 ± 0.011	0.482 ± 0.014 ^b	0.316 ± 0.014 ^b	0.176 ± 0.014 ^b	0.340 ± 0.007 ^b

^b $P < 0.01$ vs 空白对照组。

0.014, 0.176 ± 0.014 , 0.340 ± 0.007 , 与空白对照组比较有显著差异($P < 0.01$, 图4B)。24, 48, 72, 96 h抑制率分别为8.3%, 40.2%, 66.4%, 35.6%。

3 讨论

环氧合酶是催化花生四烯酸形成前列腺素的关键酶, 其包括COX-1和COX-2两种亚型。COX-2是一种可诱导型酶, 不仅能启动炎症反应, 而且通过调节细胞增殖、抑制凋亡、促进新生血管形成等机制参与肿瘤的发生和发展过程^[7-8]。研究显示, COX-2的表达水平在高分化肝癌组织中明显高于中、低分化肝癌组织, 与肿瘤的分化有关。这种在高分化的肝癌组织中呈高表达而在进展期中低分化肝癌组织中呈低表达, 提示COX-2发挥作用是在肝癌发生的早期阶段而不是进展期^[9-10]。国外研究还发现, 将COX-2基因质粒转染肝癌细胞株能明显促进肝癌细胞的增殖, 且发现COX-2的过度表达可诱导Akt磷酸化, 且磷酸化位点在Thr308, 推测COX-2可能通过Akt/PI3K信号通路起作用^[11]。Cheng *et al*^[12]在对HBV相关的肝癌研究发现, COX-2的表达与血管内皮生长因子(VEGF)的表达及肿瘤微血管密度(MVD)相关, 在使用COX-2抑制剂NS-398后PGE2及VEGF表达下调, 加入前列腺素PGE2和PGI2可增加VEGF的表达, 推测COX-2可能通过产生前列腺素促进VEGF表达, 刺激新生血管形成, 参与肿瘤的产生与发展。

RNA干扰是近年来发现的一种新技术, 其原理是利用双链RNA特异性介导其互补同源mRNA序列的降解, 阻断体内特定基因的表达。由于RNA干扰具有高度的序列专一性, 目前已作为一种简单有效的代替基因敲除工具。肿瘤的形成是一个多因素和多步骤参与的过程, 肿瘤相关基因的异常表达及部分关键酶的过量表达与细胞癌变关系密切。已有报道利用腺病毒介导的COX-2反义RNA技术在抑制COX-2表

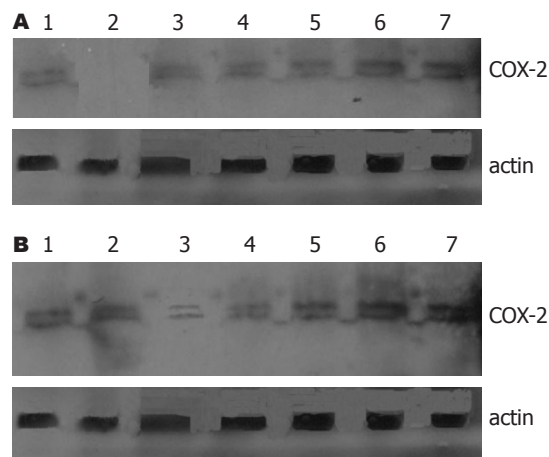


图 4 人肝癌细胞COX-2蛋白的表达。A: HepG2; B: Bel7402; 1: 24 h WBH1转染组; 2: 48 h WBH1转染组; 3: 72 h WBH1转染组; 4: 96 h WBH1转染组; 5: 48 h空白对照组; 6: 48 h WBH2转染组; 7: 48 h HK转染组。

达的同时, 可抑制人肝癌细胞株的生长^[13]。与反义寡核苷酸基因治疗手段相比, RNA干扰技术对其基因抑制作用更强, 特异性更高^[14]。目前为止, 尚未见到有关应用RNAi技术抑制肝癌细胞COX-2表达的报道, 因此, 本研究选用RNA干扰技术构建针对COX-2基因的shRNA真核表达载体WBH1和WBH2^[15], 转染不同分化程度的人肝癌细胞株: 高分化程度的HepG2细胞和中分化程度的Bel7402细胞, 分别在不同时间点从mRNA和蛋白质水平观察COX-2的抑制情况。实验表明, 肝癌细胞株HepG2及Bel7402均有COX-2表达。WBH1质粒对HepG2细胞COX-2 mRNA和蛋白表达的抑制率分别可达88.6%和80.5%, 抑制效率均在48 h最高。而对于Bel7402细胞, WBH1质粒对COX-2 mRNA和蛋白表达的抑制率分别可达70.1%和66.5%, 抑制效率在72 h最高。两株细胞的有效抑制时间均可维持在48-96 h。这种不同细胞株间抑制效率的不同, 考虑为不同细胞株中U6启动子转录后RNA受到抑制和干扰的效果存在较大差异, 因此对肿瘤细胞的抑制

效果也不同. 两株细胞的脂质体转染率分别为60%, 54%, 而COX-2抑制率可达上述水平, 说明抑制作用可以在细胞间传递^[16]. 此外, 对中分化的肝癌细胞株抑制高峰时间较高分化的肝癌细胞株出现晚, 推测shRNA真核表达载体在不同分化的肝癌细胞内转录过程存在差异而导致最佳干扰效果时间的不同. 而同为编码COX-2 shRNA的质粒WBH2对两株细胞均无干扰效应, 说明干扰效应与干扰靶点的选择高度相关.

总之, 我们所构建的针对COX-2基因的shRNA真核表达载体WBH1对两种不同分化程度的肝癌细胞株均有明显抑制作用, 为进一步研究COX-2与肝癌的生物学特性及肿瘤的基因治疗提供了实验依据.

4 参考文献

- 1 Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 96-102
- 2 Liu NB, Peng T, Pan C, Yao YY, Shen B, Leng J. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human HepG2, Bel-7402 and SMMC-7721 hepatoma cell lines and mechanism of cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib-induced cell growth inhibition and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6281-6287
- 3 Bagasra O. RNAi as an antiviral therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 1463-1474
- 4 Lv W, Zhang C, Hao J. RNAi technology: a revolutionary tool for the colorectal cancer therapeutics. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4636-4639
- 5 Romano PR, McCallus DE, Pachuk CJ. RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3857-3865
- 6 Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 446-448
- 7 Wang W, Bergh A, Damber JE. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3250-3256
- 8 Tjiu JW, Liao YH, Lin SJ, Huang YL, Tsai WL, Chu CY, Kuo ML, Jee SH. Cyclooxygenase-2 overexpression in human basal cell carcinoma cell line increases antiapoptosis, angiogenesis, and tumorigenesis. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1143-1151
- 9 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- 10 Qiu DK, Ma X, Peng YS, Chen XY. Significance of cyclooxygenase-2 expression in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 815-817
- 11 Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* 2003; 38: 756-768
- 12 Cheng AS, Chan HL, To KF, Leung WK, Chan KK, Liew CT, Sung JJ. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 24: 853-860
- 13 王小虎, 李胜保, 谢国建, 易建华, 吴清明. 腺病毒介导的环氧合酶-2反义RNA对肝癌细胞株生长的影响. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 355-358
- 14 Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, Kamiya J, Kiyosawa K. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 96-102
- 15 汪步海, 钱伟, 郜元军, 王华枫, 侯晓华. 利用RNA干扰技术抑制环氧合酶-2表达对人胃癌细胞系SGC-7901增殖和凋亡影响的实验研究. *中华医学杂志* 2006; 86: 266-271
- 16 Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 2000; 127: 4147-4156

■同行评价

本文实验设计合理, 内容新颖, 方法先进, 所得结果可靠, 图片资料可信, 文献引用得当, 讨论具体客观, 是一篇较好的论著.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

cagA基因缺失的中国幽门螺杆菌突变菌株的构建及鉴定

黄志刚, 段广才, 范清堂, 黄学勇

■背景资料

世界范围内不同 *H pylori* 菌株 cagA 分子变异较大, 该变异可能导致不同菌株的 cagA 生物学作用乃至致病性不同。我国作为 *H pylori* 感染较严重的国家之一, 临床分离株中超过 90% 含有 cagA 基因, 但对于毒力因子 cagA 的生物学功能不甚明了。另外, 由于 cagA 阴性自然突变株与 cagA 阳性野生株之间缺乏除 cagA 基因以外的相同遗传背景, 所以无法对 cagA 基因功能做出真实判断。目前, 利用基因打靶技术, 敲除生物体内特定的靶基因已成为后基因组时代研究基因功能最直接和最有效的手段。

黄志刚, 段广才, 黄学勇, 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室 河南省郑州市 450052

段广才, 范清堂, 郑州大学河南省分子医学重点实验室 河南省郑州市 450052

黄志刚, 河北工程大学医学院教师, 副教授, 郑州大学公共卫生学院在读博士研究生, 主要从事幽门螺杆菌分子流行病学研究。

通讯作者: 段广才, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学河南省分子医学重点实验室。gcduan@public.zz.ha.cn
电话: 0371-66912869

收稿日期: 2006-07-29 接受日期: 2006-08-14

Construction and identification of Chinese mutant *Helicobacter pylori* strain with absent expression of cagA gene

Zhi-Gang Huang, Guang-Cai Duan, Qing-Tang Fan, Xue-Yong Huang

Zhi-Gang Huang, Guang-Cai Duan, Xue-Yong Huang, Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Guang-Cai Duan, Qing-Tang Fan, Henan Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Guang-Cai Duan, Henan Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. gcduan@public.zz.ha.cn

Received: 2006-07-29 Accepted: 2006-08-14

Abstract

AIM: To knock out the entire cagA gene of Chinese *Helicobacter pylori* strain via homologous recombination and construct a cagA-deleted mutant strain of Chinese *H pylori*.

METHODS: Two DNA fragments locating in the upper and downstream of cagA gene were amplified and a kanamycin resistance gene of pEGFP-N2 between them were engineered into pBluescript SK II(-) plasmid (pBs-cagA-mutant). Electrotransformation of *H pylori* cells with pBs-cagA-mutant resulted in isolation of kanamycin-resistant *H pylori* transformants, which was identified by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing analysis.

RESULTS: Restriction endonuclease analyses

showed that pBs-cagA-mutant vector had been successfully recombined. The cagA-deleted status of Chinese *H pylori* mutants was confirmed by PCR with primers specific for the genes of cagA and kanamycin resistance. After 25 generations of culture, the constructed Chinese *H pylori* mutants were confirmed stable.

CONCLUSION: A cagA-negative mutants of Chinese *H pylori* strain is firstly constructed, which can help to further study the role of cagA in the pathogenesis of *H pylori* infection.

Key Words: *Helicobacter pylori*; cagA gene; Deletion; Mutant

Huang ZG, Duan GC, Fan QT, Huang XY. Construction and identification of Chinese mutant *Helicobacter pylori* strain with absent expression of cagA gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3190-3194

摘要

目的: 构建cagA基因缺失的中国幽门螺杆菌突变株。

方法: 运用基因同源重组方法将卡那霉素抗性基因(km^R)连接到PCR扩增cagA基因两端区域产生的2个基因片段之间, 并共同插入到pBluescript SK II(-)载体的多克隆位点中, 构建出带卡那霉素抗性标志的缺失突变载体pBs-cagA-mutant。将突变载体转化到含完整cagA基因的突变受体MEL-*H pylori* 27菌株中。卡那霉素筛选出cagA基因缺失的中国幽门螺杆菌突变株, 并经PCR和DNA测序鉴定。

结果: 构建的突变载体经限制性内切酶酶切分析显示, 产生的条带与设计结果完全一致。PCR方法扩增突变株cagA, km^R基因显示, cagA基因已被完整敲除掉, DNA测序证实筛选得到了cagA基因缺失的幽门螺杆菌突变株。连续培养25代后证实, 幽门螺杆菌突变株具有良好稳定性。

结论: 首次成功构建出1株中国人来源的、cagA基因缺失的幽门螺杆菌突变株。

关键词: 幽门螺杆菌; *cagA*基因; 缺失表达; 突变体

黄志刚, 段广才, 范清堂, 黄学勇. *cagA*基因缺失的中国幽门螺杆菌突变菌株的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3190-3194

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3190.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种可长期定植于人类胃黏膜的革兰氏阴性螺旋形微需氧菌, 在全世界范围内感染率超过50%。*H. pylori*是引起慢性胃炎和胃十二指肠溃疡的致病因子, 流行病学和动物实验证实*H. pylori*慢性感染是导致胃癌的重要危险因素。*H. pylori*致病的多样性与尿素酶、黏附因子、应激反应蛋白、脂多糖、空泡毒素以及细胞毒素相关基因A蛋白(cytotoxin-associated gene A, *cagA*)等毒力因子关系密切^[1]。其中*cagA*是*H. pylori*最重要的毒力因子之一^[2]。近来发现, *cagA*可通过IV型分泌系统转移进宿主细胞, 经由Src家族的酪氨酸激酶磷酸化修饰后, 与含Src同源序列SH2结构域的酪氨酸磷酸酶(tyrosine phosphatase 2, SHP-2)结合, 干扰细胞信号转导, 使细胞骨架排列紊乱^[3]。世界范围内不同*H. pylori*菌株*cagA*分子变异较大, 该变异可能导致不同菌株的*cagA*生物学作用乃至致病性不同^[4]。我国作为*H. pylori*感染较严重的国家之一, 临床分离株中超过90%含有*cagA*基因, 但对于毒力因子*cagA*的生物学功能不甚明了。另外, 由于*cagA*阴性自然突变株与*cagA*阳性野生株之间缺乏除*cagA*基因以外的相同遗传背景, 所以无法对*cagA*基因功能做出真实判断。基于以上原因, 本研究通过同源重组方法敲除掉幽门螺杆菌中国株MEL-*H. pylori* 27 *cagA*基因, 首次构建出*cagA*基因全部缺失的源自中国的幽门螺杆菌*cagA*阴性突变株, 为研究中国株幽门螺杆菌*cagA*基因的生物学功能及在毒力相关蛋白表达中的作用, 从而最终明确*cagA*基因与幽门螺杆菌致病性的关系等方面提供良好的实验前提。

1 材料和方法

1.1 材料 含*cagA*基因的幽门螺杆菌菌株MEL-*H. pylori* 27(简称*H. pylori* 27)由本教研室从郑州市慢性萎缩性胃炎患者体内分离并保种。克隆载体pBluescript SK II(-)由军事医学科学院韩聚强博士惠赠, 质粒pEGFP-N2(含卡那霉素抗性基因)由河南省医学科学研究所范天黎博

士惠赠。大肠杆菌DH5 α 为本室保存。pyrobest DNA聚合酶、T₄ DNA连接酶、DL15000 DNA Marker、100 bp DNA Marker、限制性内切酶*Xho* I、*Hind*III、*Pst* I和*Xba* I为TaKaRa公司产品; 蛋白酶K、RNA酶A购自Sigma公司; 胰蛋白胨、酵母提取物购自OXOID公司; quick gel extraction kit购自Qiagen公司。

1.2 方法 将*H. pylori* 27接种于含100 mL/L羊血的布氏平板培养基(万古霉素10 mg/L、多黏菌素B 2500 U/L、TMP 5 mg/L、两性霉素5 mg/L), 37℃, 微需氧条件下(100 mL/L CO₂, 50 mL/L O₂, 850 mL/L N₂)培养3-4 d。从培养基上刮取生长良好的*H. pylori*菌落, TE洗涤后采用酚/氯仿法提取基因组DNA, 紫外分光光度计测定DNA的浓度和纯度。抽提的DNA溶于50 μ L去离子双蒸水中, 置-20℃保存备用。

1.2.1 PCR扩增 根据本室报道的*H. pylori* 27 *cagA*基因全序列(GenBank登录号: DQ306710)自行设计用于扩增*cagA*基因两翼的同源臂片段: P1: 5'-CGCTCGAGAGCCCTAAAGTTACTACAA-3'(含*Xho* I位点), P2: 5'-GCAAGCTTTGTTTCTCCTTTACT-3'(含*Hind* III位点), 扩增片段长约720 bp; P3: 5'-GGCTGCAGAGGATTGAGGAATAC-3'(含*Pst* I位点), P4: 5'-CGTCTAGATCAAGTTGTCTAATTTAG-3'(含*Xba* I位点), 扩增片段长约985 bp。根据*cagA*基因编码区保守序列设计引物: P5: 5'-GGTCTGCCAAACAATCTTTTGCAG-3', P6: 5'-TCAAGTTGTCTAATTTAGCGTTG-3', 扩增片段长约760 bp。根据质粒pEGFP-N2全序列设计用于扩增抗性筛选标记基因(卡那霉素)的引物: P7: 5'-GCAAGCTTATGATTGAACAAGATGGATTG-3'(含*Hind* III位点), P8: 5'-GGCTGCAGTCAGAAGAAGCTCAAGAAG-3'(含*Pst* I位点), 扩增片段长约800 bp。引物设计软件为Primer 5.0。所有引物均由北京赛百盛公司合成。以*H. pylori* 27基因组DNA为模板, 分别用P1, P2和P3, P4引物扩增*cagA*基因的两翼序列, 扩增产物分别记作F_{L1}和F_{R2}; 以质粒pEGFP-N2为模板, 用P7, P8引物扩增卡那霉素抗性基因, 扩增产物记作km^R。反应体系50 μ L, 扩增条件为: 94℃ 4 min \times 1; 94℃ 50 s, 54℃ 50 s, 72℃ 50 s \times 30; 72℃ 7 min \times 1, 产物于4℃保存备用。

1.2.2 突变载体的构建 将酶切消化后的扩增片段: F_{L1}/*Xho* I + *Hind* III, km^R/*Hind* III + *Pst* I, F_{R2}/

■创新盘点

本文通过同源重组方法敲除幽门螺杆菌中国株MEL-*H. pylori* 27 *cagA*基因, 首次构建出*cagA*基因全部缺失的源自中国的幽门螺杆菌*cagA*阴性突变株, 为研究中国株幽门螺杆菌*cagA*基因的生物学功能及在毒力相关蛋白表达中的作用, 从而最终在明确*cagA*基因与幽门螺杆菌致病性的关系等方面提供良好的实验前提。

■同行评价

本文构建了一株中国人来源的、*cagA*基因缺失的幽门螺杆菌突变株,为今后研究幽门螺杆菌*cagA*基因的功能做了一定的基础研究工作。文章选题准确,研究方法合理,结果可靠。

Pst I + *Xba* I 与载体pBluescript SK II (-)/*Xho* I + *Xba* I 进行体外连接,连接体系40 μ L,目的片段与载体分子比为3:3:3:1,16 $^{\circ}$ C连接24 h后,按常规方法转化感受态DH5 α 细胞。限制性内切酶消化鉴定出阳性重组克隆,记作pBS-*cagA*-mutant。

1.2.3 突变菌株的构建与鉴定 参考Yuan *et al*^[5]的方法,自培养72 h的固体培养基上刮取*H pylori*于1 mL 150 mL/L甘油-90 g/L蔗糖溶液,4 $^{\circ}$ C 5000 r/min离心10 min(重复3次),沉淀重悬于50 mL 150 mL/L甘油-90 g/L蔗糖溶液中,调整细菌浓度为 10^{10} CFU/L。4 $^{\circ}$ C放置10 min,加质粒pBS-*cagA*-mutant 5 μ g,冰上静置5 min,移入-20 $^{\circ}$ C预冷的0.1 cm电击池中,冰浴5 min,电击池置电穿孔架上,电击条件:25 F,1.8 kV,200 Ω ,4.92 s,电击后,加SOC缓冲液100 μ L,将电转液均匀涂布于普通*H pylori*平板上,37 $^{\circ}$ C微需氧培养48 h后,刮取平板上菌落于无菌生理盐水中混匀,转涂于含25 mg/L卡那霉素的*H pylori*平板上,37 $^{\circ}$ C微需氧培养3-6 d,挑取单个菌落接种于含25 mg/L卡那霉素的*H pylori*平板上继续培养3-6 d,刮取平板上的菌落进行尿素酶活性检测和细菌染色鉴定,并且抽提基因组DNA进行鉴定:以扩增*cagA*基因编码区序列引物P5, P6和卡那霉素抗性基因引物P7, P8,结合*cagA*基因侧翼的引物P1, P4,进行PCR扩增,并以野生株*H pylori* 27为对照。将引物P1, P4的扩增产物克隆后,送上海鼎安生物科技有限公司测序。鉴定出的突变菌株记作*H pylori* 27 Δ *cagA*。*H pylori* 27野生株和*cagA*基因缺失的*H pylori* 27 Δ *cagA*突变株分别连续培养25代(突变株培养基中含25 mg/L卡那霉素)后,再接上述条件行相关基因片段的PCR扩增,以鉴定突变菌株稳定性。

2 结果

2.1 目的基因的扩增结果 引物P1, P2扩增*cagA*基因编码区的上游序列,扩增片段 F_{L1} 长约720 bp;引物P3, P4扩增*cagA*基因编码区的下游序列,扩增片段 F_{R2} 长约985 bp;引物P7, P8扩增质粒pEGFP-N2的抗性筛选标记基因(卡那霉素)的编码序列,扩增片段 km^R 长约800 bp(图1)。

2.2 突变载体的构建与酶切鉴定 *H pylori cagA*基因缺失突变的重组载体pBS-*cagA*-mutant的连接顺序为:两侧同源臂是*cagA*基因编码区上游、下游两端区域的基因片段 F_{L1} 和 F_{R2} ,中间为卡那霉素抗性基因 km^R ,以上3个DNA片段

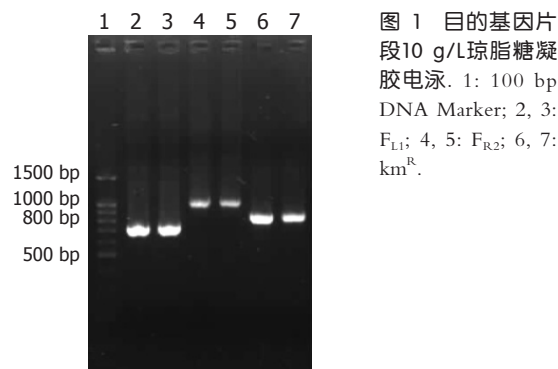


图1 目的基因片段10 g/L琼脂糖凝胶电泳。1: 100 bp DNA Marker; 2, 3: F_{L1} ; 4, 5: F_{R2} ; 6, 7: km^R 。

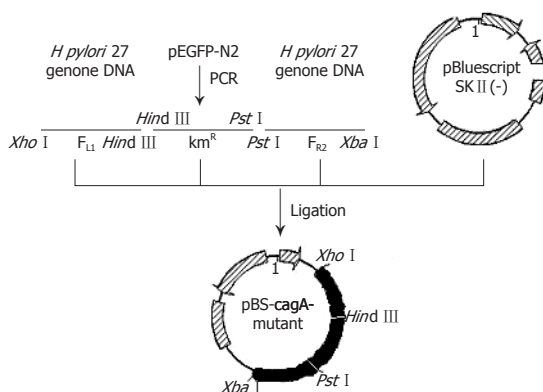


图2 *cagA*缺失突变载体构建示意图。

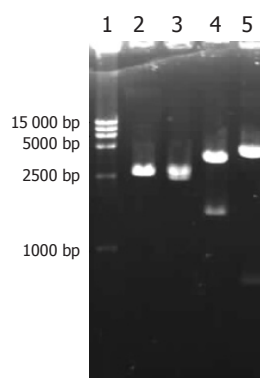


图3 突变载体的酶切鉴定结果。1: DL 15000 DNA Marker; 2: *Xho* I 消化空质粒pBluescriptSK II (-); 3: *Xho* I, *Xba* I 双切pBS-*cagA*-mutant; 4: *Xho* I, *Pst* I 双切pBS-*cagA*-mutant; 5: *Xho* I, *Hind* III 双切pBS-*cagA*-mutant。

与pBluescript SK II (-)连接构建突变载体pBS-*cagA*-mutant,模式图见图2。pBS-*cagA*-mutant经*Xho* I + *Xba* I 双酶切产生2500 bp(F_{L1} + km^R + F_{R2}),3000 bp片段;经*Xho* I + *Pst* I 双酶切产生1520 bp(F_{L1} + km^R),3985 bp片段;*Xho* I + *Hind* III 双酶切产生720 bp(F_{L1}),4785 bp片段(图3)。与设计结果完全相符。

2.3 突变菌株的鉴定 卡那霉素筛选出的*cagA*基因缺失突变株*H pylori* 27 Δ *cagA*及其对应的野生株*H pylori* 27,采用PCR方法进行鉴定,以引物P5, P6扩增*cagA*基因片段,以引物P7, P8扩增卡那霉素抗性基因片段,结果显示,突变株*H pylori* 27 Δ *cagA*可以扩出长约800 bp的卡那

霉素抗性基因片段, 而不能扩出*cagA*基因长约760 bp片段; 野生株*H. pylori* 27可以扩出长约760 bp的*cagA*基因片段, 而不能扩出卡那霉素抗性基因片段(图4A)。引物P1, P4的扩增结果显示, *H. pylori* 27野生株可扩出约5100 bp的片段(包括*cagA*基因完整编码区序列和5, 3非编码区序列以及*cagA*基因上下游结构基因的部分序列), *H. pylori* 27 Δ *cagA*突变株仅能扩出约2500 bp的片段, 提示*cagA*基因完整编码区缺失(约3510 bp), 代之以800 bp的卡那抗性基因(图4B)。测序结果进一步证实同源重组成功, GenBank登录号: DQ789393(序列略)。突变菌株的稳定性鉴定: 野生株和突变株分别连续培养25代后, 其基因组DNA的PCR结果与上述相同, 表明*cagA*基因缺失突变株具有良好稳定性。

3 讨论

*cagA*是*H. pylori*最重要的毒力因子之一, 根据该蛋白有无可将*H. pylori*分成两型: I型为高毒力株, 含*cagA*基因, 表达*cagA*和*vacA*蛋白, 具有空泡毒素活性; II型为低毒力株, 不含*cagA*基因, 不表达*cagA*和*vacA*蛋白, 无空泡毒素活性^[6]。流行病学研究发现, *H. pylori* I型菌株可明显增加患严重性胃炎及胃癌的危险性^[7-8]。因此, *cagA*可能是一种重要的疾病相关蛋白, 在*H. pylori*致病过程中发挥重要作用。编码*cagA*蛋白的*cagA*基因定位于被称为*cag*致病岛(*cag* pathogenicity island, *cagPAI*)的长约40 kb的基因群中, 其中包含约编码27-31种蛋白质的基因。*cagPAI*的部分序列可编码形成注射器样结构的IV型分泌系统, 该系统可以把*cagA*蛋白注入宿主细胞。迄今为止, *cagA*是*H. pylori*毒力因子中唯一一个通过这种方式进入宿主细胞的蛋白质, 因此对于*cagA*蛋白的研究备受关注^[2]。为了更好的研究中国幽门螺杆菌*cagA*基因的功能, 本文根据同源重组的原理构建了*cagA*基因缺失突变株: 采用PCR方法扩增*cagA*基因两端区域目的基因片段F_{L1}和F_{R2}, 其中F_{L1}包含有*cagA*基因完整的调控序列, 运用基因重组方法将卡那霉素抗性基因(km^R)连接到F_{L1}和F_{R2}两片段之间, 并共同构建到pBluescriptSK II (-)载体的多克隆位点中, 构建出带卡那霉素抗性标志的*cagA*基因缺失突变的pBS-*cagA*-mutant载体。将该载体转化大肠杆菌DH5 α , 转化菌可以在氨苄青霉素/卡那霉素双抗性培养基中生长, 提示卡那霉素抗性基因可以在*cagA*基因调控序列作用下表达。我们采用电

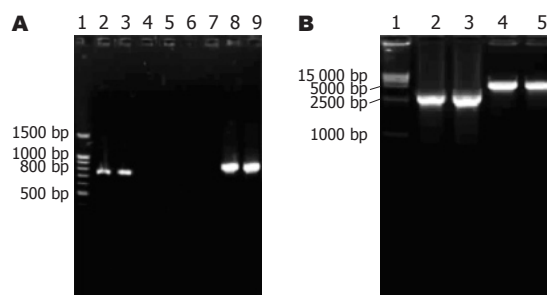


图4 野生株*H. pylori* 27与*cagA*缺失突变株*H. pylori* 27 Δ *cagA*的PCR鉴定结果。A: 1: 100 bp DNA Marker; 2, 3: 以野生株为模板, P5, P6; 4, 5: 以突变株为模板, P5, P6; 6, 7: 以野生株为模板, P7, P8; 8, 9: 以突变株为模板, P7, P8; B: 1: DL 15 000 bp DNA Marker; 2, 3: 以突变株为模板, P1, P4; 4, 5: 以野生株为模板, P1, P4。

穿孔转化技术, 将突变载体pBS-*cagA*-mutant转化进入野生株*H. pylori* 27菌体, 突变载体与野生株染色体之间发生同源重组, 使卡那霉素抗性基因(km^R)置换野生株的*cagA*基因, 随后因突变载体不能在*H. pylori*菌体内生长复制而丢失, 所以*cagA*基因缺失的突变株*H. pylori* 27 Δ *cagA*得以构建。本文所用的电穿孔技术是一种高效的基因转移方法, 且没有种属的特异要求, 被广泛用于各种细菌、细胞的基因转化和转染中。但不同的目的菌株或细胞的转化体系中, 缓冲液不同, 所用电压、电阻、电容也不同^[9]。本研究实验过程中, 经反复比较不同条件的转化情况, 确定了最佳条件。与Yuan *et al*^[5]的条件略有不同, 可能与所用菌株不同有关。

检测突变株*H. pylori* 27 Δ *cagA*中是否还存在*cagA*基因, 是最后认证*cagA*基因缺失突变株构建成功与否的关键。我们对野生株和突变株的基因组DNA进行了PCR鉴定: 野生株可以扩出*cagA*基因片段, 而不能扩出卡那霉素抗性基因; 突变株未能扩出*cagA*基因片段, 但可扩出卡那霉素抗性基因, 提示*cagA*基因已经缺失。另外, 用*cagA*基因两侧的引物进行长片段扩增, 也得到了相同的验证: 野生株可以扩出包含完整*cagA*基因和非编码序列的长约5100 bp片段, 而突变株仅能得到约2500 bp的基因片段, 提示*cagA*基因完整编码区(3510 bp)被卡那霉素抗性基因(800 bp)所取代。以往国外虽有构建*cagA*基因失活突变株的报道, 但因均采用在*cagA*基因编码区中插入抗性基因使*cagA*基因失活, 进而研究*cagA*基因的相关功能, 但是由于残存*cagA*基因片段的存在, 必然会对研究结果产生一定影响, 不利于评价完整*cagA*基因的功能^[10-11]。另

外, *cagA*基因失活突变株均是以西方菌株或国际参考株为基础进行构建^[12], 而就*cagA*分子而言, 东西方菌株之间存在明显差异^[13-14], 以西方菌株为基础的研究结果不能全面反映东方菌株*cagA*基因的生物学作用. 因此构建一株中国人感染*H pylori*的*cagA*基因缺失突变株具有重要的价值及意义. 本研究首次构建出一株中国人来源的、*cagA*全基因缺失的*H pylori*突变株, 为进一步研究幽门螺杆菌中国株*cagA*基因的功能, 阐明其在*H pylori*致病中的地位及作用奠定了实验基础. 目前, 有关*H pylori* 27野生株与*H pylori* 27△*cagA*突变株的相关功能差异研究正在进行之中.

4 参考文献

- 1 严英, 钱利生. 幽门螺杆菌毒力因子的研究进展. 国外医学(流行病学传染病学分册) 2002; 29: 27-30
- 2 Al-Ghoul L, Wessler S, Hundertmark T, Kruger S, Fischer W, Wunder C, Haas R, Roessner A, Naumann M. Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 860-866
- 3 Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002; 43: 971-980
- 4 Hsu PI, Hwang IR, Citty D, Lai KH, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Kim JG, Osato MS, Graham DY, Yamaoka Y. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2231-2238
- 5 Yuan JP, Li T, Shi XD, Hu BY, Yang GZ, Tong SQ, Guo XK. Deletion of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene by introduction of directed mutagenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2251-2257
- 6 Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14648-14653
- 7 Nomura AM, Lee J, Stemmermann GN, Nomura RY, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* CagA seropositivity and gastric carcinoma risk in a Japanese American population. *J Infect Dis* 2002; 186: 1138-1144
- 8 Enroth H, Kraaz W, Engstrand L, Nyren O, Rohan T. *Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 981-985
- 9 Tilly K, Elias AF, Bono JL, Stewart P, Rosa P. DNA exchange and insertional inactivation in spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000; 2: 433-442
- 10 Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Mutation of the cytotoxin-associated *cagA* gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62: 2609-2613
- 11 Crabtree JE, Xiang Z, Lindley IJ, Tompkins DS, Rappuoli R, Covacci A. Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995; 48: 967-969
- 12 Zeng X, He LH, Yin Y, Zhang MJ, Zhang JZ. Deletion of *cagA* gene of *Helicobacter pylori* by PCR products. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3255-3259
- 13 Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Muramatsu A, Suto H, Ito Y, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis* 2004; 189: 820-827
- 14 Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14428-14433

电编 张敏 编辑 张焕兰

原发性肝癌患者血清leptin, VEGF和AFP表达的意义

侯振江, 王秀文, 张丽华, 周秀艳, 戴殿禄, 闫金辉

侯振江, 张丽华, 闫金辉, 沧州医学高等专科学校 河北省沧州市 061001

王秀文, 戴殿禄, 沧州市中心医院 河北省沧州市 061001

周秀艳, 唐山市人民医院 河北省唐山市 063001

侯振江, 副教授, 从事实验诊断和医学检验教学、临床和科研25年, 发表论文、译文、综述286篇, 参编和主编教材、专著14部。

河北省科学技术发展和规划项目, No. 052761288

通讯作者: 侯振江, 061001, 河北省沧州市迎宾大道高教区, 沧州医学高等专科学校. houzhenjiang@sina.com

电话: 0317-5507805

收稿日期: 2006-06-13 接受日期: 2006-08-22

Clinical significance of serum leptin, vascular endothelial growth factor and alpha-fetoprotein expression in hepatocellular carcinoma

Zhen-Jiang Hou, Xiu-Wen Wang, Li-Hua Zhang, Xiu-Yan Zhou, Dian-Lu Dai, Jin-Hui Yan

Zhen-Jiang Hou, Li-Hua Zhang, Jin-Hui Yan, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China
Xiu-Wen Wang, Dian-Lu Dai, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, Hebei Province, China

Xiu-Yan Zhou, Tangshan Municipal People's Hospital, Tangshan 063001, Hebei Province, China

Supported by Development and Programming Foundation of Science and Technology of Hebei Province, No. 052761288

Correspondence to: Zhen-Jiang Hou, Cangzhou Medical College, Yingbin Road, Cangzhou 061001, Hebei Province, China. houzhenjiang@sina.com

Received: 2006-06-13 Accepted: 2006-08-22

Abstract

AIM: To explore the expression of serum leptin (Lep), vascular endothelial growth factor (VEGF) and alpha-fetoprotein (AFP) and their clinical significances in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum Lep, VEGF and AFP levels in 146 patients with HCC, 31 patients with liver cirrhosis and 30 healthy controls. The correlations Lep, VEGF, and AFP expression with clinical indexes were analyzed.

RESULTS: The serum Lep level was correlated with body mass index (BMI) in HCC patients ($r = 0.64$, $P < 0.01$), and significantly lower than

that in cirrhotic patients and healthy controls ($19 \mu\text{g/L}$ vs 35 , $27 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$). The serum Lep level in HCC patients was significantly decreased with upgrade of TNM stages, metastasis and recurrence ($P < 0.05$). In comparison with that in cirrhotic patients and healthy controls, the serum VEGF level in HCC patients was significantly increased (398 ng/L vs 179 , 167 ng/L , $P < 0.01$). There was no correlation between VEGF and AFP expression. The sensitivity and specificity of VEGF were 71.2% and 80.6%, and those of AFP were 73.3% and 83.9%, respectively, in the diagnosis of HCC. However, the sensitivity was increased to 91.8%, while the accuracy reached 90.4% after the combined detection of VEGF and AFP was used. There was a relationship between the level of serum VEGF and tumor size ($<3 \text{ cm}$: $237 \pm 96 \text{ ng/L}$, $>3 \text{ cm}$: $398 \pm 124 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$). As compared with that of TNM I, II stage, the serum VEGF of TNM III, IV stage was obviously higher (346 ± 131 , $401 \pm 152 \text{ ng/L}$ vs 228 ± 89 , $259 \pm 102 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$), and it also showed a significant elevation in the patients with metastasis and recurrent HCC ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Nutrition status and prognosis of patients with HCC can be judged by serum Lep level, and the combined detection of serum VEGF and AFP may provide a significant marker for HCC diagnosis and prognosis.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Leptin; Vascular endothelial growth factor; Alpha-fetoprotein; Body mass index

Hou ZJ, Wang XW, Zhang LH, Zhou XY, Dai DL, Yan JH. Clinical significance of serum Lep, VEGF and AFP expression in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3195-3200

摘要

目的: 探讨HCC患者血清Lep, VEGF和AFP表达的临床意义。

方法: 用ELISA检测30例健康对照、31例肝硬化和146例HCC患者血清Lep, VEGF和AFP含量, 分析Lep, VEGF和AFP及其联合检测对

■背景资料

Lep和VEGF作为参与多种肿瘤新生血管形成重要的细胞因子, 已成为国内外对肿瘤发生、发展分子机制研究和认识的热点和重点。

■研究前沿

Lep和VEGF参与多种肿瘤的发生、发展过程,其相互协同在肿瘤新生血管的形成中发挥着举足轻重的作用。因此,进一步研究血清Lep和VEGF在肝癌发生、发展、转移和复发中的分子机制,可能成为下一步研究的前沿和热点。

HCC的诊断、临床分期和预后的意义。

结果: HCC患者血清Lep水平与BMI显著相关($r = 0.64, P < 0.01$), 且显著低于肝硬化组/健康对照组($19 \mu\text{g/L}$ vs $35, 27 \mu\text{g/L}, P < 0.05$)。随TNM分期增加和转移、复发, HCC血清Lep水平明显降低($P < 0.05$)。HCC患者血清VEGF水平显著高于肝硬化组/健康对照组(398 ng/L vs $179, 167 \text{ ng/L}, P < 0.01$), VEGF和AFP间无相关性, 二者对HCC诊断的敏感性和特异性分别为71.2%, 73.3%和80.6%, 83.9%, 联合检测可提高诊断的敏感性(91.8%)和准确度(90.4%)。HCC患者VEGF水平与肿瘤大小呈正相关($< 3 \text{ cm}: 237 \pm 96 \text{ ng/L}, > 3 \text{ cm}: 398 \pm 124 \text{ ng/L}, P < 0.01$), III, IV期患者血清VEGF水平也明显高于I, II期患者($346 \pm 131, 401 \pm 152 \text{ ng/L}$ vs $228 \pm 89, 259 \pm 102 \text{ ng/L}, P < 0.01$), 术后转移和复发患者血清VEGF水平明显升高($P < 0.05$)。

结论: 血清Lep测定可判断HCC患者营养状况和预后, 血清VEGF与AFP联合测定可作为诊断HCC和判断其预后的重要指标。

关键词: 肝细胞癌; 瘦素; 血管内皮生长因子; 甲胎蛋白; 体重指数

侯振江, 王秀文, 张丽华, 周秀艳, 戴殿禄, 闫金辉. 原发性肝癌患者血清leptin, VEGF和AFP表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3195-3200

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3195.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤, 其发病率目前有上升趋势, 死亡率列消化系统肿瘤的第3位, 我国每年约有33万人死于肝癌。HCC侵袭性极强, 预后差, 根治切除是最有效的治疗手段, 小肝癌的预后相对较好。因此, 早期诊断、早期治疗对肝癌尤其重要。甲胎蛋白(AFP)是临床上诊断HCC最常用的肿瘤标志物之一, 但敏感性较低(70%左右), 特异性也较低(64%)^[1], 因此单独应用AFP诊断HCC容易造成漏诊和误诊。有研究证实, 瘦素(leptin, Lep)可抑制肿瘤细胞的凋亡、促进其增殖、增加对基底膜的侵袭能力及促进血管形成^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)不仅促进血管内皮细胞分裂、增殖, 促进细胞的生长, 维持血管的完整性, 而且还参与细胞间黏附, 促进细胞浸润, 在肿瘤的发生、发展中起重要作用^[3]。我们用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA)测定146例HCC患者血清Lep, VEGF和AFP水平, 探讨其在HCC诊疗中的相关性及其与临床的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 HCC患者146例, 多属于中、晚期, 2004-06/2006-06沧州市中心医院和唐山市人民医院门诊和住院患者。其中男性101例, 女性45例, 年龄18-69(平均 46.2 ± 10.7)岁。根据临床症状和体征、B超、CT、肿瘤标志(AFP定量)确诊, 部分病例经病理切片或核磁共振进一步诊断。肝硬化组31例, 平均年龄 44.7 ± 8.2 岁; 健康对照组30例, 平均年龄 38.5 ± 9.8 岁, 均为本院住院患者和健康体检者。所有受试者均准确测量身高、体质量, 并计算体重指数(BMI)和体脂肪含量(FAT)。BMI = 体重/身高², 男FAT = $(1.2 \times \text{BMI} + 0.23 \times \text{年龄} - 16.2)\%$, 女FAT = $(1.2 \times \text{BMI} + 0.23 \times \text{年龄} - 5.4)\%$ 。清晨空腹肘静脉采血3 mL, 30 min内分离血清, 常规进行AFP定量, 并留取相应血清置-20℃冰箱保存, 用于Lep和VEGF检测。

1.2 方法 AFP采用微粒子酶免化学发光分析法, 美国雅培公司提供AXSYM全自动免疫分析仪和试剂盒。采用ELISA法测定血清Lep和VEGF, 仪器为奥地利HT2型酶标仪, 试剂盒由尚柏生物医学技术有限公司提供(分别为德国和美国进口), 严格按试剂盒操作程序和要求进行测定。标准品均双孔检测, 血清Lep和VEGF浓度直接从标准曲线查得。

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 组间均数比较采用 t 检验和协方差分析。

2 结果

2.1 HCC患者血清Lep和VEGF水平 HCC患者其血清Lep水平显著低于肝硬化组和健康对照组, 健康对照组也显著低于肝硬化组, 差异均有显著性意义($P < 0.05$); VEGF水平显著高于肝硬化组和健康对照组, 且无论AFP阳性与否, 其血清VEGF水平均显著高于肝硬化组和健康对照组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 但肝硬化组和健康对照组之间无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。

2.2 血清Lep, VEGF和AFP联合诊断HCC 以健康对照组血清Lep平均值减2SD和健康对照组血清VEGF平均值加2SD为阳性, 即Lep $< 15 \mu\text{g/L}$, VEGF $> 251 \text{ ng/L}$ 为阳性; AFP以 $> 25 \mu\text{g/L}$ 为阳性, Lep, VEGF和AFP对HCC的诊断价值(表

表 1 146例HCC患者血清Lep和VEGF水平 (mean \pm SD)

分组	总		男		女		VEGF (ng/L)
	<i>n</i>	Lep (μ g/L)	<i>n</i>	Lep (μ g/L)	<i>n</i>	Lep (μ g/L)	
对照组	30	27 \pm 12	15	24.7 \pm 10.1	15	34.4 \pm 15.2 ^d	167 \pm 84
肝硬化组	31	35 \pm 14 ^a	19	31.0 \pm 13.2	12	36.8 \pm 15.1 ^d	179 \pm 98
HCC组	146	19 \pm 9 ^a	101	15.4 \pm 9.8	45	31.6 \pm 17.5 ^{ad}	398 \pm 153 ^b
AFP(+)	107	20 \pm 9					395 \pm 157 ^b
AFP(-)	39	19 \pm 9					402 \pm 150 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 其他两组; ^d $P < 0.01$ vs 男.

表 2 VEGF和AFP对146例HCC的诊断价值 (%)

诊断价值	Lep	VEGF	AFP	Lep+VEGF	VEGF+AFP	Lep+AFP	Lep+VEGF+AFP
敏感度	56.9	71.2	73.3	78.1	92.8	78.1	88.0
特异度	96.7	80.7	83.9	77.3	79.7	75.7	77.1
准确度	63.8	72.9	75.1	77.9	90.5	77.9	74.8

2). 根据BMI将HCC患者分为3组: 营养不良组(BMI<18.5)78例(Lep = 14.89 \pm 8.91), 营养正常组(BMI介于18.5-25)51例(Lep = 24.72 \pm 11.84), 肥胖组(BMI>25)17例(Lep = 29.85 \pm 12.26). 采用协方差分析, 校正性别、年龄后, 营养不良组血清Lep含量显著低于营养正常组和肥胖组, 3组间均有显著性差异($P < 0.05$). 男性患者与其他两组之间也有显著性差异. 男、女营养正常的HCC患者血清Lep水平低于相同性别的健康对照组, 但未见显著性差异.

2.3 HCC患者血清VEGF水平与临床分期和病理分级的关系 HCC的分期按国际恶性肿瘤联盟(UICC) TNM分类标准, 肿瘤直径<3 cm为小肝癌, >3 cm为大肝癌. 将有癌栓和/或肝内播散和/或0.5 a内复发的HCC患者定为高转移复发组, 反之为低转移复发组(表3). 对43例术前VEGF升高的HCC患者进行治疗后的动态监测, 发现31例术后1 wk VEGF含量下降, 1 mo降至正常水平. 7例患者于术后2-3 wk血清VEGF含量仍维持高水平, 分别于术后3-6 mo死亡, 5例上升, 2 wk后有2例高于术前. 随访中有3例患者分别于12, 15, 17 mo后VEGF再度升高, 进一步证实为HCC复发或转移.

3 讨论

Lep是脂肪细胞肥胖基因(obese gene, Ob基因)的编码产物, 通过与瘦素受体(Ob-R)结合发挥其生物学作用. 目前发现Ob-R至少有5种亚型, 即Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd和Ob-Re^[4], 广泛分布于下丘脑、垂体、肺、心、肝、肾、胰腺、胎

表 3 68例 HCC患者血清Lep和VEGF表达与病理分级之间的关系

病理学特点	<i>n</i>	Lep (μ g/L)	VEGF (ng/L)
肿瘤大小\ (cm)			
<3	19	22.2 \pm 9.9	237 \pm 96
>3	49	17.1 \pm 10.9	398 \pm 124
TNM分期			
I	6	25.7 \pm 9.8	228 \pm 89
II	13	23.6 \pm 10.2	259 \pm 102
III	21	18.2 \pm 8.7	346 \pm 131 ^b
IV	28	15.4 \pm 9.6	401 \pm 152 ^b
转移与复发			
高	41	16.4 \pm 8.2	401 \pm 138
低	27	24.4 \pm 11.0	184 \pm 79

^b $P < 0.01$ vs I, II.

盘、卵巢、子宫内膜、睾丸、附睾等全身组织器官, 因而具有广泛的生物学作用. 流行病学调查和基础研究证实, Lep与肿瘤的发生密切相关. 肿瘤的发生、发展和转归在很大程度上依赖于新生血管的形成; VEGF是促进内皮细胞分裂和血管生成的重要因子, 其表达水平不仅与肿瘤血管的发生、增殖有关, 而且直接参与浸润和转移^[5-8]. Brown *et al*^[9]用免疫组化和原位杂交技术测定21例消化系统原发癌, 所有恶性上皮均明显表达VEGF mRNA及其蛋白, 与肿瘤坏死区紧密连接的癌细胞中表达更显著, 肿瘤血管内VEGF染色阳性, 肿瘤以外的组织没有表达, 表明VEGF在消化系统肿瘤内血管形成中有一定作用. 毛振彪 *et al*^[10]研究表明, 血清VEGF表达与胃癌的发生、发展和肿瘤的浸润、侵袭有关,

应用要点

流行病学调查和基础研究证实, Lep和VEGF在各种肿瘤细胞内均有表达, 在肿瘤的发生和发展过程中起重要作用. 因此, 研究血清Lep, VEGF和AFP的表达对肝癌的诊断、治疗、疗效观察、预后监测具有重要的临床价值.

■同行评价

本文立意新颖, 选择指标先进, 研究方法得当, 结果、结论可信, 文献引用比较全而新, 学术价值较高。

其含量增高, 预示胃癌的转移和预后不良。有资料报道, VEGF表达密集区大多位于HCC肿瘤细胞周边和肿瘤向周围浸润的区域, 说明VEGF在HCC组织血管中的增殖作用^[11]。Torimura *et al*^[12]报道, 肝癌组织内VEGF蛋白及VEGF mRNA表达较正常肝组织明显增高, 并与肿瘤的血管分化程度密切相关。李立人 *et al*^[13]发现VEGF在细胞质和细胞膜呈局灶性分布, 在肝细胞肝癌、肝硬化和正常肝组织的表达阳性率分别为81.0%、36.7%和23.8%, 肝细胞肝癌和肝硬化组织之间、肝细胞肝癌和正常肝组织之间均有显著性差异($P<0.05$)。李兴睿 *et al*^[14]进一步证实, VEGF阳性颗粒定位于肝癌细胞的胞质内, 其表达水平明显高于邻近正常组织, 且呈异质性分布, 强阳性染色的肿瘤细胞多位于肿瘤浸润边缘或肿瘤包膜附近。常实 *et al*^[15]报道, 肝癌组织中VEGF蛋白检测可作为判断HCC有无血行转移倾向的指标, 但需要组织标本, 不适用于高危人群的普查和肝癌患者的动态监测, 而血清VEGF水平对判断肿瘤的预后更有意义^[16]。可溶性VEGF不仅在肝癌组织中高表达, 外周血中也存在与疾病进程一致的水平改变^[17]。

Lep作为脂肪细胞分泌的Ob基因的产物, 在维持机体正常能量代谢平衡方面发挥重要的作用。Ockenga *et al*^[18]和Widjaja *et al*^[19]发现, 肝硬化患者的血清结合型瘦素浓度增加引起肝硬化患者的瘦素水平增高, 是反映肝硬化患者能量代谢异常的指标。还有报道称酒精性肝硬化患者的血清瘦素水平升高, 并与性别有关^[20-21]。我们研究发现, 肝硬化组血清Lep水平高于健康对照组, 这与Onodera *et al*^[22]和王学清 *et al*^[23]报道肝硬化患者的血清Lep升高的结果一致。还发现HCC患者其血清Lep水平显著低于肝硬化组和健康对照组, 而HCC患者血清VEGF水平明显高于肝硬化和健康对照组($P<0.05$), 但肝硬化组与健康对照组之间无显著性差异, 部分肝癌患者血清VEGF水平在健康对照范围内, 且肝硬化组与HCC组有部分重叠。因此, 血清VEGF含量正常不能排除HCC的诊断, 伴肝硬化者其含量升高对HCC的诊断应慎重。但对疑诊为肝癌的患者, 其血清VEGF升高有一定的提示作用。在4例肝硬化血清VEGF含量升高的患者中, 有1例于18 mo转化为肝癌。因此, 动态监测血清VEGF含量升高的肝硬化患者, 可能有助于肝癌的早期诊断。

常实 *et al*^[15]报道, 肝癌患者术前外周血

AFP mRNA的阳性率为70%, 显著高于AFP的阳性率(65%)。刘剑波 *et al*^[24]发现, 原发性肝癌患者血清VEGF的阳性率(77.8%)显著高于肝硬化(10.0%)和正常对照(3.3%), 而血清Lep在肝癌中的诊断价值尚无报道。我们研究发现, 血清Lep和VEGF对HCC诊断的阳性率分别为56.9%和71.2%, 与AFP对HCC诊断的阳性率(73.3%)比较, 前者有显著性意义($P<0.01$), 而后者差异无统计学意义。就其特异度和准确度而言, 分别以Lep和AFP最高, 但VEGF和AFP之间无相关性, 提示VEGF可作为独立于AFP的诊断指标。3项指标两两联合和同时测定, 以VEGF和AFP联合检测对HCC的诊断起互补作用, 其阳性率提高到92.8%($P<0.05$), 特异度达80%, 准确度达90%以上。因此联合测定VEGF和AFP对HCC的诊断具有重要的临床价值。

业已证实, 人类Lep水平与BMI、FAT呈正相关, 且有明显的性别差异。张宪真 *et al*^[25]研究证实, 肿瘤患者血清Lep与体重指数、脂肪百分比呈显著正相关, 肿瘤患者血清Lep水平下降, 其低水平不能刺激食欲增加, 体重恢复, 提示肿瘤患者的Lep反馈调节系统存在着功能缺陷。本研究结果显示, HCC患者血清Lep水平与BMI呈高度正相关, 且HCC组和女性患者血清Lep水平显著高于男性, 在扣除性别因素影响后, Lep仍与BMI高度相关, 这与多数肿瘤患者的Lep水平, 肿瘤患者与FAT含量呈高度正相关, 并与正常人一致的结论相吻合^[26]; 在扣除BMI、年龄等因素后, Lep的性别差异明显($P<0.01$), 女性Lep水平约为男性的1-2倍。此性别差异不仅与男、女脂肪含量和分布、下丘脑调节Lep的产生和脂蛋白脂酶活性的性别差异有关, 还与性激素有关, 睾酮可抑制肥胖基因的表达和Lep的产生^[27]。经分析确定BMI与FAT为协变量, 进行协方差分析显示, HCC组血清总Lep水平和男性患者血清Lep水平均显著低于健康对照组, F值分别为5.463($P<0.05$)和16.251($P<0.01$), 但女性患者血清Lep水平与健康对照组比较差异无统计学意义。这与张中书 *et al*^[27]报道的男性癌症患者血清Lep显著低于其正常对照, 而女性患者与其正常对照组无显著性差异的结果一致。提示HCC患者Lep水平下降与其本人的营养不良和体内脂肪消耗过多有关。还发现, 肝硬化组血清Lep水平显著高于HCC组和健康对照组, 3组间均存在明显差异($P<0.05$)。相对女性肝硬化而言, 男性患者增

高更显著; 营养不良组Lep水平明显低于非营养不良组, 且在男、女性结果一致. 这与体重下降的肺癌患者, Lep水平很低甚至无法测出的结果一致. 由于Lep与FAT呈高度正相关, 而FAT减少是癌性恶病质患者的明显特征, 血清Lep水平可反映机体的营养状况, 是诊断癌性恶病质的客观指标^[26], 因此血清Lep水平可作为判断HCC患者BMI、营养状况及其病情变化的指标.

新生血管形成是实体瘤生长和转移的必备条件, 促血管形成因子的表达能促进肿瘤新生血管的形成, 为肿瘤的生长、浸润和转移创造条件. 微血管密度(MVD)是反映肿瘤血管生成的金标准, 不仅与肿瘤细胞的营养和给养有关, 而且也反映肿瘤的浸润和转移能力. 李宏江 *et al*^[28]发现, 有复发和转移的乳腺肿瘤患者MVD和VEGF的阳性率均明显高于无复发和无转移者, 提示两者在促进肿瘤生长和转移的作用上是一致的. 76.5%的肝癌组织表达VEGF mRNA, 在肿瘤内癌栓或包膜形成差的标本中VEGF mRNA水平显著高于肿瘤内无癌栓或包膜形成好者, 提示VEGF可能参与肝癌的浸润和转移^[29]. 研究证实, HCC癌组织VEGF的表达与癌灶大小、镜下癌栓及肿瘤TNM分期密切相关^[30]. 表明HCC癌组织中VEGF表达参与肿瘤微血管的形成, 并与肿瘤快速增长、肝内及远处播散转移密切相关. 黄清玲 *et al*^[31]报道, 肝癌细胞Lep及其Ob-R表达与MVD呈正相关, 在肝癌的血管生成和转移过程中可能起重要作用. 本研究发现, 68例HCC中小肝癌和大肝癌的血清Lep水平($\mu\text{g/L}$)分别为 22.2 ± 9.9 和 17.1 ± 10.9 , 其差异有统计学意义($P < 0.01$); 小肝癌的转移或复发率(47.4%, 9/19)显著低于大肝癌的转移或复发率(65.3%, 32/49), 转移或复发组Lep水平与无转移或复发组之间差异有显著性($P < 0.01$); 有门脉癌栓和肝内外转移者低于无门脉癌栓和无肝内转移者, 合并肝硬化患者Lep水平高于无肝硬化组, 差异有显著性意义($P < 0.05$). 随TNM分期的进展, 血清Lep水平逐渐降低, 但I、II期之间无差异, 当肿瘤发展到晚期(尤其IV期)其血清Lep水平显著降低. HCC患者随临床分期、病理分级和转移或复发其血清Lep水平下降越明显. 这与Wallace *et al*^[32]报道胃肠道肿瘤患者血清Lep水平显著低于正常对照组的结果一致. 进一步说明血清Lep降低与HCC的复发和转移有关.

对68例HCC患者血清VEGF水平与临床病

理特征的相关性分析表明, 肿瘤的大小与VEGF的表达呈正相关, 即随肿瘤体积的增大, VEGF呈明显的上升趋势, 小肝癌和大肝癌患者其血清VEGF水平差异有统计学意义($P < 0.01$), 但AFP的变化则无此现象; 伴有远处转移及III、IV期的患者其血清VEGF水平显著高于无转移和I、II期患者($P < 0.01$), 呈浸润型生长者也显著高于膨胀型生长者, 说明高水平的血清VEGF其预后较差. 有门脉癌栓和肝内外转移或复发的HCC患者血清VEGF水平显著高于无门脉癌栓及无肝内转移或复发的患者($P < 0.01$), 合并肝硬化患者VEGF水平高于无肝硬化组($P < 0.05$). HCC患者其VEGF阳性表达随血清VEGF水平显著升高, 其上升幅度与有门脉癌栓和肝内外转移以及合并肝硬化密切相关. 提示随HCC病情进展, 肿瘤负荷增加, 具有VEGF高表达的肿瘤组织释放更多的VEGF进入血循环, 导致VEGF在HCC组织中呈过表达. 进一步说明血清VEGF升高与HCC的复发和转移有关.

从68例HCC的TNM分期看, 随病情进展, 血清VEGF水平逐渐升高, 但I、II期之间无差异, 当肿瘤发展到晚期, 尤其IV期患者血清VEGF水平显著升高. 证实VEGF在HCC的组织生长中起重要作用, 复发组肝癌细胞分泌的VEGF急剧增加, 血管形成加速, 结构和功能异常的血管增多, 使肿瘤细胞更易侵入血管而出现转移. 血清VEGF水平明显升高($>400 \text{ ng/L}$)及术后仍维持在高水平或再度升高者的HCC患者转移、复发率明显升高, 这与Karayiannakis *et al*^[33]报道90%的结肠癌患者术后血清VEGF未降至正常, 很快出现复发和转移的研究结果类似. 表明高水平的血清VEGF患者容易出现较早的复发和转移, 其预后较差、生存期较短. 因此动态监测血清VEGF水平可判断HCC的疗效, 并对复发和转移有预报作用.

根据Lep调整患者的营养状况, 预防恶病质的发生和发展有一定价值. 通过提高Lep可阻止HCC的发生、发展, 为改善患者的生活质量和预后开辟新途径. 通过阻断VEGF/VEGFR的通路, 抑制肿瘤血管的形成, 从而达到治疗肿瘤的目的. 应用VEGF及其受体的单克隆抗体直接拮抗VEGF或阻止VEGF与其受体的结合, 使VEGF成为阻断血管形成比较理想的靶点. 及时找到预示HCC无早期转移的指标, 可选择合理的治疗方案. 根据术前血清VEGF水平可判断患者的病程

和肿瘤的侵袭性,对侵袭性高的患者,术前进行辅助治疗,可降低术后的复发率。随着对HCC患者VEGF表达研究的不断深入,将对肝癌发生、发展、治疗和转移机制的探讨提供依据,为最终征服肝癌产生深远的影响。

4 参考文献

- Soresi M, Magliarisi C, Campagna P, Leto G, Bonfissuto G, Riili A, Carroccio A, Sesti R, Tripi S, Montalto G. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 1747-1753
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 1625-1638
- 侯振江, 张宗英. 血管内皮生长因子及其受体检测在恶性肿瘤诊疗中的应用. *诊断学理论与实践* 2005; 4: 86-88
- Ren J. Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol* 2004; 181: 1-10
- Wey JS, Stoeltzing O, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clin Adv Hematol Oncol* 2004; 2: 37-45
- Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer* 2005; 104: 427-438
- Huang H, Held-Feindt J, Buhl R, Mehdorn HM, Mentlein R. Expression of VEGF and its receptors in different brain tumors. *Neurol Res* 2005; 27: 371-377
- Lu ZQ, Li HG, Xie DR, Zhang HZ, Shen XM, Zeng YJ, Zeng H. Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in non-small cell lung carcinoma. *Ai Zheng* 2005; 24: 1132-1135
- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995; 26: 86-91
- 毛振彪, 肖明兵, 黄介飞, 倪海兵, 倪润洲, 魏群, 张弘. 血管内皮生长因子在胃癌血清的表达. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1220-1221
- 梁军, 于丽, 沈方臻. 肝癌中血管生成VEGF及其受体水平与预后的关系. *中国肿瘤临床* 2004; 31: 197-200
- Torimura T, Sata M, Ueno T, Kin M, Tsuji R, Suzaku K, Hashimoto O, Sugawara H, Tanikawa K. Increased expression of vascular endothelial growth factor is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 986-991
- 李立人, 施公胜, 孙超. PCNA和VEGF在肝细胞肝癌中的表达意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 560-561
- 李兴睿, 杨志芳, 易继林. 肝癌经肝动脉栓塞化疗后VEGF和CD44v6表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1305-1308
- 常实, 汤恢煊, 龚学军, 周军. 原发性肝癌组织VEGF与外周血AFP mRNA检测的临床意义. *中国普通外科杂志* 2004; 13: 205-208
- Lee JK, Hong YJ, Han CJ, Hwang DY, Hong SI.

- Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients: which is the optimal specimen? *Int J Oncol* 2000; 17: 149-152
- Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2239-2245
- Ockenga J, Bischoff SC, Tillmann HL, Rifai K, Widjaja A, Boker KH, Manns MP, Brabant G. Elevated bound leptin correlates with energy expenditure in cirrhotics. *Gastroenterology* 2000; 119: 1656-1662
- Widjaja A, Wedemeyer H, Tillmann HL, Horn R, Ockenga J, Jaekel E, von zur Muhlen A, Manns MP, Brabant G. Hepatitis C and the leptin system: bound leptin levels are elevated in patients with hepatitis C and decrease during antiviral therapy. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 426-431
- Campillo B, Sherman E, Richardet JP, Bories PN. Serum leptin levels in alcoholic liver cirrhosis: relationship with gender, nutritional status, liver function and energy metabolism. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55: 980-988
- Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Fatjo F, Casamitjana R, Bataller R, Sacanella E, Tobias E, Badia E, Estruch R. Increased circulating leptin levels in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 83-88
- Onodera K, Kato A, Suzuki K. Serum leptin concentrations in liver cirrhosis: relationship to the severity of liver dysfunction and their characteristic diurnal profiles. *Hepatol Res* 2001; 21: 205-212
- 王学清, 张卫卫, 李岩. 肝硬化患者的血清瘦素水平. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1177-1179
- 刘剑波, 连涛, 高学岗, 赵爱志, 李开宗. 原发性肝癌患者高水平VEGF的意义. *肿瘤防治杂志* 2005; 12: 682-685
- 张宪真, 陈随芹, 司海运, 刘吉勇. 消化道肿瘤患者血清瘦素的测定及意义. *现代肿瘤医学* 2003; 11: 166-167
- 黄琦, 江志伟, 俱永军, 刘碧竹, 贾云鹤, 李宁, 黎介寿. 胃癌恶病质患者血清瘦素的变化. *肠外与肠内营养* 2005; 12: 88-90
- 张中书, 许瑞吉, 王国洪, 施益群, 王筱劫. 瘦素RIA及其部分临床应用. *标记免疫与临床* 2004; 11: 15-17
- 李宏江, 敬静, 汪静, 吕青, 陈琳, 赵扬冰. 乳腺肿瘤中VEGF的表达和MVD分布. *四川大学学报(医学版)* 2005; 36: 288-289
- 李兴睿, 廖晓峰, 易继林. VEGF在肝癌经肝动脉栓塞化疗后的表达及临床意义. *中国现代医学杂志* 2005; 15: 2647-2649
- 黑振宇, 王鲁, 金惠明. VEGF与原发性肝癌血管新生关系的研究进展. *中国微循环* 2005; 9: 292-294
- 黄清玲, 张声, 林建银. Leptin及其受体的表达与肝癌血管生成、生长和转移的关系. *福建医科大学学报* 2002; 36: 29-32
- Wallace AM, Sattar N, McMillan DC. Effect of weight loss and the inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2977-2979
- Karayianakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Baibas N, Polychronidis A, Simopoulos C, Karatzas G. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colorectal cancer and the effect of tumor surgery. *Surgery* 2002; 131: 548-555

HSP70, HSP90在结肠癌中表达及其和生物学行为的相关性

陈 怡, 冉志华, 陈 翔, 朱长清, 萧树东

陈怡, 冉志华, 陈翔, 萧树东, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科 上海市消化疾病研究所 上海市 200001

陈怡, 朱长清, 上海交通大学医学院附属仁济医院急诊科 上海市 200127

陈怡, 2006年上海交通大学医学院消化专业硕士, 主治医师.

上海市重点学科建设项目资助, No. Y0205

通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属

仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所. z-ran@online.sh.cn

电话: 021-58752345 传真: 021-63266027

收稿日期: 2006-09-28 接受日期: 2006-10-11

Expression of heat shock protein 70 and 90 and their relationships with biological behaviors of colon cancer

Yi-Chen, Zhi-Hua Ran, Xiang-Chen, Chang-Qing Zhu, Shu-Dong Xiao

Yi-Chen, Zhi-Hua Ran, Xiang-Chen, Shu-Dong Xiao, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China

Yi-Chen, Chang-Qing Zhu, Department of Emergency Management, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Supported by Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. Y0205

Correspondence to: Dr. Zhi-Hua Ran, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China. z-ran@online.sh.cn

Received: 2006-09-28 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To investigate the expression of heat shock protein (HSP) 70 and 90 as well as their correlations with the biological behavior of colon cancer.

METHODS: Specimens were collected from the cancerous lesions, paracancerous tissues (2 cm away from cancer lesion) and normal mucosal tissues of 40 patients with colon cancer after colon resection. The expression of HSP70 and HSP90 were detected using affinitive immunohistochemical technique. Meanwhile, Duke's staging for the 40 colon cancer patients was analyzed, and the relationship between the ex-

pression levels of HSPs and Duke's staging was further investigated.

RESULTS: The levels of HSP70 and HSP90 expression between the cancerous tissues, paracancerous tissues, and normal tissues (HSP70: 82.5% vs 52.5% vs 25%, $\chi^2 = 26.58$, $P = 0.000$; HSP90: 72.5% vs 42.5% vs 22.5%, $P = 0.000$). The positive rates of HSP70 and HSP90 had significant correlations with clinical staging of colon cancer (HSP70: $\tau_{ab} = 0.392$, $P = 0.006$; HSP90: $\tau_{ab} = 0.396$, $P = 0.006$).

CONCLUSION: HSP70 and HSP90 are over-expressed in colon cancer, which are correlated with the biological behavior of colon cancer.

Key Words: Colon cancer; Heat shock protein 70; Heat shock protein 90; Biological behavior

Chen Y, Ran ZH, Chen X, Zhu CQ, Xiao SD. Expression of heat shock protein 70 and 90 and their relationships with biological behaviors of colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3201-3205

摘要

目的: 探讨HSP70, HSP90在人结肠癌中的表达情况及其和结肠癌细胞生物学行为的相关性.

方法: 结肠癌患者手术标本40例, 分别以癌组织、癌旁2 cm组织和远离癌灶的正常黏膜组织作为病例组和对照组. 用亲和免疫组织化学技术方法检测HSP70和HSP90, 并收集该40例患者的临床Duke's分期, 分析HSP70和HSP90蛋白的阳性程度和结肠癌临床分期是否存在相关性.

结果: 癌组织HSP70和HSP90的表达明显增高, 癌组织、癌旁组织和正常黏膜组织三组之间HSP70和HSP90表达率有明显差异 (HSP70: 82.5% vs 52.5% vs 25%, $\chi^2 = 26.58$, $P = 0.000$; 72.5% vs 42.5% vs 22.5%, $\chi^2 = 20.41$, $P = 0.000$); HSP70和HSP90蛋白的阳性程度和结肠癌临床分期存在相关性(HSP70: τ_{ab}

■背景资料

近年来我国结肠癌的发病人数有明显增多, 对结肠癌的诊断及治疗技术的提高显得尤为重要, 而近年来的研究发现HSP的高表达和肿瘤的发生、发展之间存在着联系, 对HSP在结肠癌中的表达情况的研究可能对结肠癌的诊断、预后以及治疗均存在意义.

■研发前沿

目前对HSP的深入研究在于:其促进肿瘤发生及转移的机制的深入探讨;在肿瘤治疗中HSP90的抗体geldanamycin(格尔德霉素)以及应用反义寡核苷酸技术抑制HSP70, HSP90结合肿瘤化疗、放疗或热疗,有些已在I/II期临床试验;而HSP-肽类复合物可制成免疫疫苗在肿瘤免疫治疗中有应用前景。

$= 0.392, P = 0.006$; HSP90: $\tau_{b} = 0.396, P = 0.006$).

结论: 结肠癌细胞存在HSP70和HSP90蛋白的过度表达, HSP70, HSP90和结肠癌细胞的生物学行为存在相关性。

关键词: 结肠癌; 热休克蛋白70; 热休克蛋白90; 生物学行为

陈怡, 冉志华, 陈翔, 朱长清, 萧树东. HSP70, HSP90在结肠癌中表达及其和生物学行为的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3201-3205

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3201.asp>

0 引言

近年来结肠癌的发病人数明显增多, 对结肠癌的诊断及治疗技术的提高显得尤为重要. 研究发现热休克蛋白(HSP)的高表达与肿瘤的发生、发展关系密切, 其机制可能与增强了肿瘤细胞抗凋亡能力有关, 且HSP可能与肿瘤的恶性程度及预后相关, HSP的抗体或反义HSP能增加肿瘤细胞对治疗的敏感性, 为肿瘤的治疗提供了新的方向. 对HSP在结肠癌中的表达情况的研究可能对结肠癌的诊断、预后及治疗均存在意义. 在HSP家族中HSP70, HSP90是拮抗细胞凋亡的2种主要蛋白, 与肿瘤的发生、发展关系密切, 我们探讨了HSP70和HSP90蛋白在结肠癌中的表达情况及其和结肠癌生物学活性的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-11/2004-02仁济医院东部结肠癌患者手术标本40例. 每例患者取癌组织、癌旁2 cm组织及远离癌组织的正常肠黏膜组织各一块, 用亲和免疫组织化学方法对HSP70和HSP90蛋白进行检测. 一抗: anti-human HSP70, HSP90 antibody购自美国Santa Cruz公司, 二抗: UltraSensitive SP试剂盒及DAB显色试剂盒购自福州迈新生物公司。

1.2 方法 组织固定, 石蜡包埋, 切片. 烤片1 h脱蜡, 流水冲10 min, PBS浸泡5 min×3次, 滴加内源性过氧化物酶抑制剂保持10 min. PBS浸泡5 min×3次, 柠檬酸钠抗原修复缓冲液进行抗原微波热修复. 冷却到室温后再次PBS浸泡5 min×3次, 滴加非免疫动物血清保持30 min. 擦去血清后放置入冰箱4℃过夜. PBS浸泡5 min×3次, 滴加生物素标记第二抗体保持1 h. PBS浸泡5 min×3次, 滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物

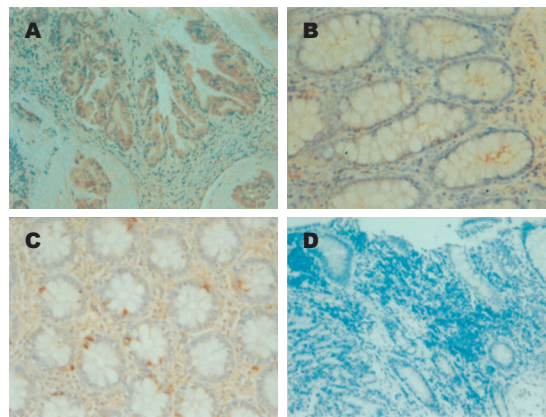


图1 HSP70在结肠癌、癌旁组织及正常组织中的表达情况. A: 肿瘤组织; B: 癌旁组织; C: 正常结肠黏膜组织; D: 阴性对照.

酶保持1 h. PBS浸泡5 min×3次, 滴加DAB显色剂保持1 min. 流水冲10 min, 放入苏木素染色剂中保持15-30 s. 流水冲10 min, 盐酸酒精分化. 流水冲10 min, 风干、封片、镜检. 阳性统计方法: 染色深度: 无色0分, 浅黄色1分, 棕黄色2分, 褐色3分; 靶组织染色百分比: 根据靶组织着色范围随机取上、下、左、右、中各五个高倍视野, <10%为1分, 11%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分. 取上面五个数字得到平均值和颜色深度的乘积得到最终积分: <2分为阴性, 2-4分为+, 4-6分为++, 6-9分为+++, 9-12分为++++.

统计学处理 用R×2列联表 χ^2 检验(SPSS)分析HSP70, HSP90在癌组织、癌旁组织及正常结肠黏膜组织表达的差异, 并从病史室得到40位患者临床资料, 用Kendall等级计数相关分析(SPSS)计算HSP70, HSP90阳性程度与肿瘤Duke's分期的相关性. $P<0.01$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 HSP70, HSP90在结肠癌、癌旁组织及正常组织中的表达情况 HSP70, HSP90在肿瘤组织的胞质及胞核均有表达, 为弥漫性棕色染色颗粒, 在40例结肠癌患者的肿瘤组织中阳性率分别达到82.5%和72.5%(图1A、图2A). 在癌旁组织中HSP70, HSP90主要表达在腺体及腺沟, 阳性率为52.5%和42.5%(图1B、图2B), 而在正常结肠黏膜组织中, HSP70, HSP90表达为腺体周围散在棕黄色颗粒, 阳性率为25%和22.5%(图1C、图2C). 结肠癌组织、癌旁组织及正常黏膜组织三组之间HSP70, HSP90表达率差异有统计学意义($P<0.01$).

2.2 HSP70, HSP90在结肠癌中的表达阳性程度

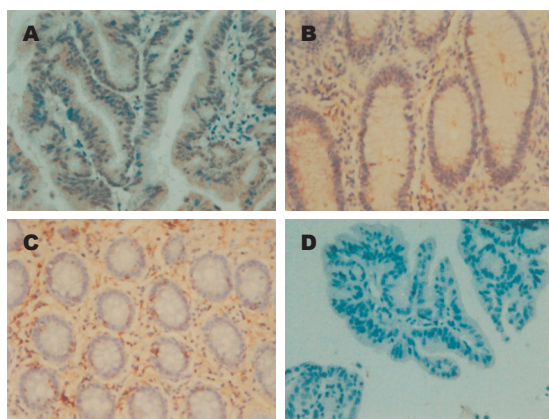


图 2 HSP90在结肠癌、癌旁组织及正常组织中的表达情况。A: 肿瘤组织; B: 癌旁组织; C: 正常结肠黏膜组织; D: 阴性对照。

和Duke's分期的相关性 应用Kendall等级计数相关分析(SPSS)提示结肠癌HSP70, HSP90的阳性程度和Duke's分期存在相关性(表1-2), 即随着肿瘤浸润逐渐加深, HSP70, HSP90的表达增加($P<0.01$)。

3 讨论

HSP是一组结构保守广泛存在的蛋白质, 根据同源程度及分子量大小可分为HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, 小分子HSP, HSP10 (HSP60的辅因子)及泛素等亚家族^[1]。多年的研究发现, HSP在细胞内能帮助其他蛋白质进行正确的折叠与重构, 并能把受损害的蛋白质递呈给蛋白酶进行降解^[2], 在保持细胞内的动态平衡中起重要作用, 因此被称为分子伴侣, 近年的研究提示, HSP的高表达能增强肿瘤细胞抗凋亡能力, 使细胞生长抑制效应与死亡减弱^[3], 和肿瘤的发生、发展之间存在着联系。在HSP家族中HSP70, HSP90是拮抗细胞凋亡的2种蛋白, 提示其可能在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。曾有研究表明热休克蛋白家族中HSP70, HSP90在肺癌^[4]、乳腺癌^[5]、卵巢癌^[6]、食道癌^[7]、骨肉瘤^[8]及淋巴细胞白血病^[9]等许多肿瘤发生、发展中起作用, 其中也发现许多肿瘤中高表达的HSP与肿瘤的淋巴结转移存在相关性^[10-14]。

本研究显示, 结肠癌组织的HSP70, HSP90蛋白染色阳性率(分别达到82.5%和72.5%)显著高于各自的癌旁组织(52.5%和42.5%)及正常结肠腺体组织(25%和22.5%), 与既往研究发现结肠癌组织存在HSF1(热休克因子1)、HSP70以及HSP40的高表达相符合^[15-16]。结肠癌组织中HSP70, HSP90阳性结果表现为弥漫性的棕色

表 1 结肠癌患者按照Duke's分期和HSP70染色阳性程度分类计数($n=40$)

Duke's分期	阳性程度(半定量)			总计
	-	+~++	+++	
A	3	5	0	8
B	3	10	1	14
C	1	9	3	13
D	0	3	2	5
总计	7	27	6	40

应用Kendall等级计数相关分析(SPSS): $\tau_{u,b} = 0.392$, Sig. (2-tailed) = 0.006, $P<0.01$ 。

表 2 结肠癌患者按照Duke's分期和HSP90染色阳性程度分类计数($n=40$)

Duke's分期	阳性程度(半定量)			总计
	-	+~++	+++	
A	4	4	0	8
B	5	9	0	14
C	1	10	2	13
D	1	2	2	5
总计	11	25	4	40

应用Kendall等级计数相关分析(SPSS): $\tau_{u,b} = 0.396$, Sig. (2-tailed) = 0.006, $P<0.01$ 。

染色颗粒, 证明其在细胞核、细胞质均有表达。在癌旁组织中其主要表达在肠黏膜腺体、腺沟等部位, 可能与癌组织HSP70, HSP90的高表达以及蛋白转运与分泌有关, 也有可能和癌组织周边存在的炎性反应环境有关, 曾有研究发现在炎性肠病组织中也存在HSP70等HSP的过度表达并起到细胞保护作用^[17]。在正常肠黏膜中HSP70, HSP90即有一定表达, 提示其在正常细胞活动中亦有一定作用。在癌组织, 癌旁组织中HSP70, HSP90的表达量均明显高于正常组织, 并且在癌组织中HSP70, HSP90的表达程度和结肠癌Duke's分期存在相关性, 即随着肿瘤浸润深度的增加, HSP70和HSP90表达增加, 提示其可能在结肠癌的发生、发展中起重要作用。

HSP70, HSP90在结肠癌组织中的高表达与其具有拮抗肿瘤细胞凋亡的能力有关。1990年代以来细胞凋亡在肿瘤发病学和治疗学上的意义受到广泛重视。细胞学研究发现, 肿瘤细胞能通过过度表达拮抗凋亡的蛋白质而生存^[18]。而HSP70, HSP90等能抑制凋亡, 在许多肿瘤细胞中有过度表达, 并且与多种肿瘤的分级、预后

■创新盘点

HSP70, HSP90在结肠癌中的表达情况国内外研究较少, 近年发现HSP家族中HSP70, HSP90是拮抗细胞凋亡的两种主要蛋白质, 可能与肿瘤的发生、发展关系密切, 故本次研究同时选择这两种蛋白, 并分析其与结肠癌生物学行为的相关性。

■应用要点

本项研究结果提示, HSP70, HSP90的表达在结肠癌发生、发展和转移中发挥重要作用, 其表达与结肠癌的生物学行为存在着相关性, 对于研发药物来抑制HSP70, HSP90增加结肠癌细胞对放疗、化疗及热疗的敏感性提供了理论依据, 且通过对HSP70, HSP90的检测, 对判断结肠癌患者的预后具有意义。

相关。曾有研究发现在食道鳞状细胞癌中高表达的HSP70与肿瘤细胞淋巴结转移, 淋巴管浸润存在相关性^[19], 研究者建议HSP70能作为食道癌术后患者的预后评价指标。Rashmi *et al*^[20]发现HSP70的高表达与胃肠道肿瘤患者肿瘤细胞转移, 不良预后以及对放疗化疗的不敏感有关。其机制可能为HSP70能抑制细胞色素c释放AIF活化并能抑制caspases-3和caspases-9的活性, 从而促进肿瘤细胞的发生与发展。也有研究表明在结直肠癌中HSP70可能与P53形成复合物从而导致抑癌基因P53失活, 抑制肿瘤细胞凋亡^[21]。Beliakoff *et al*^[22]发现在乳腺癌中高表达的HSP90与肿瘤的进展有关, 其机制与HSP90能够通过激活Akt并导致抑癌基因P53失活来抑制肿瘤细胞凋亡有关。可见HSP70, HSP90能通过各种途径抑制肿瘤细胞凋亡, 促进肿瘤细胞的发生、发展。HSP70, HSP90的高表达与结肠癌细胞的恶性增殖也密切相关。肿瘤的形成过程中, 肿瘤细胞不断增殖, 合成代谢增强, 需要大量的HSP调节和稳定这一异常增殖过程, 而肿瘤组织生长旺盛, 其增生的血管存在相对血供不足, 缺氧与应激的细胞环境也反过来诱导了HSP的过度表达。HSP70, HSP90的高表达一方面介导癌基因及抑癌基因产物的构象成熟、跨膜转运, 另一方面介导错配蛋白的降解, 协调肿瘤细胞的蛋白质快速代谢平衡, 使肿瘤细胞得以无限增殖。Yokota *et al*^[23]发现HSP的复合物在人结肠癌中的表达较正常组织显著增高, 并且其表达水平与PCNA(增殖细胞核抗原)相关, 而PCNA是细胞增殖的一个重要指标, 提示HSP的复合物的高表达与结肠癌细胞的快速增殖有关。也有研究发现高表达的HSP70, HSP90能通过促进HER2与c-Myc等原癌基因的激活, 从而使肿瘤细胞自主增生, 促进肿瘤细胞的发生、发展^[24]。

近年来的研究发现, 在结肠癌的治疗中使用HSP70, HSP90的抗体或应用反义寡核苷酸技术抑制这些基因的表达, 能增加肿瘤细胞对治疗的敏感性, 从而为结肠癌的治疗提供了新的方向。HSP90的拮抗剂格尔德霉素(geldanamycin)能增加人结肠癌HT-29细胞对放疗的敏感性并减少放射剂量^[25]。Zhao *et al*^[26]研究发现, 反义HSP70能抑制人胃癌SGC-7901细胞HSP70的表达并能诱导肿瘤细胞的凋亡, 抑制肿瘤细胞的增生。HSP-多肽复合物可制成免疫疫苗, 为结肠癌提供肿瘤免疫疗法, Chen *et al*^[27]研究发现, 从鼠肝癌细胞中提纯的HSP70-多肽

复合物疫苗接种肝癌小鼠能提高其对肝癌细胞的免疫力, Mazzaferro *et al*^[28]在29例结肠癌根治术后肝转移的患者中接种HSP-多肽复合物疫苗, 发现其能诱导CD8⁺ T细胞介导的免疫反应, 限制原发瘤的复发及转移, 并且未发现严重的毒性反应。也有研究发现高热对BGC-823人胃癌细胞的杀伤作用明显, 而各加热组均可使BGC-823细胞高表达HSP70^[29], 抑制HSP70能增加肿瘤细胞对热疗的敏感性并可能降低肿瘤热疗的温度^[30], 以上的各种治疗方法在结肠癌的治疗均中存在应用前景。

总之, HSP70, HSP90在肿瘤增生和转移过程中可以通过多个角度发挥促进作用。本项研究结果提示HSP70, HSP90的表达在结肠癌发生、发展和转移中发挥重要作用, 其表达与结肠癌的生物学行为存在正相关性。对于研发药物来干预和治疗结肠癌提供了理论依据, 且通过对HSP70, HSP90的检测, 对判断结肠癌患者的预后具有意义。

4 参考文献

- 1 Papp E, Nardai G, Soti C, Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors* 2003; 17: 249-257
- 2 Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 2000; 33: 341-365
- 3 Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1564-1572
- 4 Zhong L, Peng X, Hidalgo GE, Doherty DE, Stromberg AJ, Hirschowitz EA. Antibodies to HSP70 and HSP90 in serum in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 285-290
- 5 O'Neill PA, Shaaban AM, West CR, Dodson A, Jarvis C, Moore P, Davies MP, Sibson DR, Foster CS. Increased risk of malignant progression in benign proliferating breast lesions defined by expression of heat shock protein 27. *Br J Cancer* 2004; 90: 182-188
- 6 Elpek GO, Karaveli S, Simsek T, Keles N, Aksoy NH. Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries. *APMIS* 2003; 111: 523-530
- 7 Lambot MA, Peny MO, Fayt I, Haot J, Noel JC. Overexpression of 27-kDa heat shock protein relates to poor histological differentiation in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2000; 36: 326-330
- 8 Uozaki H, Ishida T, Kakiuchi C, Horiuchi H, Gotoh T, Iijima T, Imamura T, Machinami R. Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 665-673
- 9 Lauten M, Beger C, Gerdes K, Asgedom G, Kardinal C, Welte K, Schrappe M. Expression of heat-shock protein 90 in glucocorticoid-sensitive and -resistant childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2003; 17: 1551-1556

- 10 Torronteguy C, Frasson A, Zerwes F, Winnikov E, da Silva VD, Menoret A, Bonorino C. Inducible heat shock protein 70 expression as a potential predictive marker of metastasis in breast tumors. *Cell Stress Chaperones* 2006; 11: 34-43
- 11 Cappello F, David S, Rappa F, Bucchieri F, Marasa L, Bartolotta TE, Farina F, Zummo G. The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase. *BMC Cancer* 2005; 5: 139
- 12 Hwang TS, Han HS, Choi HK, Lee YJ, Kim YJ, Han MY, Park YM. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 690-700
- 13 Noguchi T, Wada S, Takeno S, Moriyama H, Kimura Y, Uchida Y. Lymph node metastasis could be predicted by evaluation of macrophage infiltration and hsp70 expression in superficial carcinoma of the esophagus. *Oncol Rep* 2003; 10: 1161-1164
- 14 Zuo DS, Dai J, Bo AH, Fan J, Xiao XY. Significance of expression of heat shock protein90alpha in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2616-2618
- 15 Kanazawa Y, Isomoto H, Oka M, Yano Y, Soda H, Shikuwa S, Takeshima F, Omagari K, Mizuta Y, Murase K, Nakagoe T, Ohtsuka K, Kohno S. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in colorectal cancer. *Med Oncol* 2003; 20: 157-164
- 16 Cen H, Zheng S, Fang YM, Tang XP, Dong Q. Induction of HSF1 expression is associated with sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3122-3126
- 17 Ohkawara T, Nishihira J, Nagashima R, Takeda H, Asaka M. Polaprezinc protects human colon cells from oxidative injury induced by hydrogen peroxide: Relevant to cytoprotective heat shock proteins. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6178-6181
- 18 Tsujimoto Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep* 2002; 22: 47-58
- 19 Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. Expression of heat shock protein 70 in grossly resected esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2002; 74: 222-226
- 20 Rashmi R, Kumar S, Karunagaran D. Ectopic expression of Hsp70 confers resistance and silencing its expression sensitizes human colon cancer cells to curcumin-induced apoptosis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 179-187
- 21 Shotar AM. P53 and heat shock protein 70 expressions in colorectal adenocarcinoma. *Saudi Med J* 2005; 26: 1602-1606
- 22 Beliakoff J, Whitesell L. Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2004; 15: 651-662
- 23 Yokota S, Yamamoto Y, Shimizu K, Momoi H, Kamikawa T, Yamaoka Y, Yanagi H, Yura T, Kubota H. Increased expression of cytosolic chaperonin CCT in human hepatocellular and colonic carcinoma. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6: 345-350
- 24 Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 164-172
- 25 Kobayashi S, Nantz R, Kitamura T, Higashikubo R, Horikoshi N. Combined inhibition of extracellular signal-regulated kinases and HSP90 sensitizes human colon carcinoma cells to ionizing radiation. *Oncogene* 2005; 24: 3011-3019
- 26 Zhao ZG, Shen WL. Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 73-78
- 27 Chen DX, Su YR, Shao GZ, Qian ZC. Purification of heat shock protein 70-associated tumor peptides and their antitumor immunity to hepatoma in mice. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 361-365
- 28 Mazzaferro V, Coppa J, Carrabba MG, Rivoltini L, Schiavo M, Regalia E, Mariani L, Camerini T, Marchiano A, Andreola S, Camerini R, Corsi M, Lewis JJ, Srivastava PK, Parmiani G. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3235-3245
- 29 戴洁, 邵雪辉, 孙黎, 薄爱华, 刘开洋, 李海锋. 温热对BGC-823胃癌细胞HSP70表达及超微结构的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 913-915
- 30 Rossi A, Ciafre S, Balsamo M, Pierimarchi P, Santoro MG. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7678-7685

■名词解释

热休克蛋白(HSP): 是应激状态下细胞产生的保护细胞免受损害的蛋白质, 在非应激状态下在细胞内亦有基本表达, 研究表明HSP能通过抑制细胞凋亡起到细胞保护作用, 而许多肿瘤细胞也能通过过度表达HSP从而使肿瘤细胞避免凋亡, 在HSP家族中HSP70, HSP90是拮抗细胞凋亡的两种蛋白质, 与肿瘤的发生、发展关系密切。

电编 张敏 编辑 张焕兰

中药复方辅助治疗肝外阻塞性黄疸的研究概况

张喜平, 仇凤梅, 倪杰

■背景资料

在中医对肝外OJ的诊疗方面, 很多专家都进行过有关方面的研究, 并且收到较好的疗效, 中药复方有效治疗肝外OJ的报道也日渐增多。在临床上中医治疗肝外OJ定位于辅助治疗位置。

张喜平, 倪杰, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
仇凤梅, 浙江中医药大学 浙江省杭州市 310053
浙江省中医药卫生计划项目, No. 2004C142
杭州市科技计划项目, No. 2005224
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市第一人民医院普外科.
zxp99688@vip.163.com
电话: 0571-87065701
收稿日期: 2006-07-14 接受日期: 2006-09-20

摘要

肝外阻塞性黄疸(obstructive jaundice, OJ)主要通过手术治疗, 有较高的围手术期并发症率及手术病死率, 如能用中药复方辅助治疗, 能够较好的降低手术带来的并发症发生率和病死率。本文从肝外OJ发病原因及相关并发症着手, 阐述中药复方辅助治疗肝外OJ的现状与进展, 多方面总结中药复方辅助治疗肝外OJ的重要作用, 为更进一步的实验及临床研究与应用提供理论依据。

关键词: 肝外阻塞性黄疸; 中药; 复方

张喜平, 仇凤梅, 倪杰. 中药复方辅助治疗肝外阻塞性黄疸的研究概况. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3212-3214
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3212.asp>

0 引言

阻塞性黄疸(obstructive jaundice, OJ)是由于肝内毛细胆管、小胆管、肝胆管或胆总管的机械性狭窄或闭塞, 导致胆汁不能通过胆管排入十二指肠反而流入血的一组常见疾病^[1]。由肝外胆道梗阻引起的称为肝外OJ, 肝外OJ不是独立的疾病, 只是一种征象, 是多种疾病的一种共同表现, 其主要特征是以直接胆红素升高为主的胆红素血症^[2]。肝外OJ病因若不能及时消除, 会进一步产生严重的并发症, 临床上此症患者病死率高。通常肝外OJ纯属外科性黄疸, 除了晚期或有手术禁忌症外, 绝大多数患者须外科手术治疗, 有较高的围手术期并发症发生率及手术病死率, 中药在此过程中主要起到辅助治疗作用。针对肝外OJ的发病原因和机制及对机体的损害, 其治疗应从消除病因、解除梗阻、控制

感染、保护和恢复肝功能等方面着手。目前中药复方辅助治疗肝外OJ的报道为数不少, 主要通过消除病因及治疗并发症起到治疗作用, 本文将重点从这两方面讨论中药复方治疗肝外OJ概况。

1 病因的消除及与黄疸的同步治疗

引起肝外OJ的主要病理因素为肿瘤、结石、炎症、损伤、畸形、寄生虫及其他少见因素。治疗肝外OJ的中药复方多包括解除病因和退黄两类中药, 其中以排石药和退黄药组合的中药复方最为常用。排石减黄: 四金排石汤合茵陈蒿汤加味(金钱草60 g、海金沙15 g、鸡内金15 g、茵陈蒿30 g、山栀10 g、大黄10 g、柴胡20 g、木香10 g、茯苓15 g)^[3]; 大承气汤合四逆散加減[生大黄、生甘草、芒硝(冲服)各8 g, 厚朴、枳实、柴胡、木香(泡服)、海金沙(冲服)各10 g, 栀子、茵陈各15 g, 郁金、赤芍、金钱草、白花蛇舌草、丹参各20 g]^[4]; 其他验方(茵陈、金钱草、海金沙、虎杖、大黄、柴胡、黄芩、枳实、赤芍、甲珠、桃仁、玄胡、川楝子, 根据症状加減)^[5]。

2 并发症的治疗

各种原因引起肝外胆道梗阻, 胆汁不能正常进入胃肠道特别是十二指肠并返流入血, 肝外OJ发病时, 由于胆血屏障被破坏, 大量胆色素入血并沉积于组织脏器中, 对组织细胞产生损害作用。此外, 由于胆汁不能流入消化道, 胆汁的肝肠循环被阻断, 肠黏膜上皮细胞因失去或减弱胆汁酸盐的刺激而减缓生长, 致肠道机械屏障功能障碍。胆汁的肝肠循环受阻后, 肠道内微生态环境发生改变, 大量致病菌失去胆汁酸盐的抑制而异常增殖, 使消化道免疫屏障功能被破坏, 致细胞及内毒素移位, 此时如不进行有效治疗则发生内毒素血症。因此, 肝外OJ病因若不能及时消除, 会进一步产生严重的感染性休克、胃肠道出血、肝脏损伤、肾功能衰竭继发等并发症, 病死率高。中药复方在肝外OJ并发症方面也能起

到积极辅助的治疗作用。

2.1 保护肝脏 肝外OJ时, 过多的胆盐潴留在肝脏内, 使肝细胞质内游离钙持续升高, 影响细胞代谢, 激活了胞质中的磷脂酶和蛋白激酶, 进一步激活钙离子依赖的核酸内切酶活性, 进而使DNA降解为寡聚小体, 诱导细胞凋亡; 门静脉内毒素含量明显升高, 使ET升高, 继而使肝血流量下降, 导致肝细胞变性和酶漏出, 使组织氧自由基产生增加, 损伤组织细胞, 不同致病因素引起肝外OJ时肝功能不全^[6]。肝复康(由丹参、黄芪等组成)通过拮抗钙内流、降低ET浓度而对肝外OJ所造成的肝功能损伤产生明显的保护作用^[7-8]; 加味大柴胡汤(柴胡、黄芩、大黄、白芍、半夏、生姜、大枣、茵陈、金钱草)能通过缓解内毒素血症, 抑制氧自由基产生, 减轻脂质过氧化对肝的损害, 保护肝功能^[9]; 小柴胡汤(柴胡、人参、黄芩、半夏、大枣、甘草、生姜)能降低门静脉压及转氨酶值, 改善肝功能^[10]; 汉丹肝乐(汉防己总碱、丹参、赤芍、黄芪、银杏叶等)具有糖皮质激素样退黄作用, 使尿胆红素转阴, 血清黄疸指数降低, 血清结合胆红素和总胆红素浓度降低, 具有恢复肝细胞功能, 减轻肝细胞损伤, 改善胆红素代谢障碍的作用, 并能降低死亡率^[11]; 利胆退黄汤(丹参、黄芪、虎杖、柴胡、白花蛇舌草、白术、白芍)可增加胆汁量, 促使肝功能恢复, 同时还有保护肝脏功效^[12]; 五味降酶汤(五味子55 g, 党参35 g, 白术、三棱、黄芪、茯苓、莪术各15 g, 甘草10 g)能降低转氨酶, 治疗OJ引起的肝脏损伤^[13]。针对肝外OJ时不同因素引起的肝损伤, 各中药复方通过不同作用途径达到治疗作用, 促进肝功能的恢复。

2.2 保护肾脏 急性肾功能衰竭是肝外OJ患者常见死亡原因, 肾功能衰竭的发生与肝外OJ术后并发肾功能紊乱的发生率和死亡率呈平行关系。内毒素可引起肾交感神经兴奋性增高, 激活肾素-血管紧张素系统, 提高血管对儿茶酚胺的敏感性, 引起血管收缩, 肾脏缺血缺氧, 以致功能改变; 内毒素刺激网状内皮系统产生TNF过量, 同时花生四烯酸代谢加快, 前列腺素增多, 血栓素亦明显增多, 使肾脏缺血缺氧更为严重, 导致不可逆性肾功能衰竭。舒胆合剂(茵陈、金钱草、大黄、元胡、木香、虎杖、陈皮、郁金)能明显降低血清内毒素、血清和肾组织ET水平, 明显升高血清总蛋白和血清IgG, IgM^[14], 升高血清和肾组织NO, NOS活性、内生肌酐清除率、肾皮质血流量, 有抗内毒素作用, 并通过减少体内ET水平来降低体内ET水平, 升高NO水平起到保

护肾功能的作用^[15]; 生脉注射液(人参、麦冬、五味子)拮抗OJ患者术后内毒素, 进而可降低TNF- α , IL-6, IL-8和ET水平, 同时他还可通过改善微循环, 降低血液黏滞度, 纠正血液动力学紊乱, 从而直接或间接的保护肾脏功能, 复方丹参和生脉注射液合用也有类似作用^[16-17]。

2.3 抗内毒素 肝外OJ时, 肠道内胆盐缺乏, 使肠源性内毒素产生和吸收增加, 肝网状内皮系统功能受抑, 内毒素溢入体循环, 形成内毒素血症, 进一步引起全身性的组织损伤坏死并发症, 因此, 内毒素是引发OJ时各种并发症的重要因素。清泻剂(大黄、牡丹皮、芒硝、栀子、双花、公英、黄芪、茵陈、地丁等十味中药)^[18]、大承气汤(大黄30 g、厚朴10 g、枳实10 g、芒硝10 g)^[19-20]、茵陈蒿汤[茵陈蒿18 g、栀子15 g(劈)、大黄6 g(去皮)]、大承气汤加味配复方丹参注射液(丹参、降香)^[21], 均能于局部充分发挥其降解内毒素、减少机体吸收内毒素作用, 减少肠源性内毒素移位发生, 从而减缓或防止肝外OJ的各种并发症的发生。

2.4 提高机体免疫功能 肝外OJ术后早期采取结合中药等药物综合治疗以提高机体免疫功能, 加速黄疸消退, 从根本上改善了患者临床状况。大柴胡汤加减(柴胡12 g、黄芩9 g、人参6 g、半夏9 g、炙甘草5 g、生姜9 g、大枣4枚、枳实9 g、赤芍9 g, 根据病证加减)治疗OJ疗效明显^[22], 对肝外OJ患者血T细胞亚群免疫功能的恢复和TNF水平的下降, 能够改善肝外OJ患者细胞免疫功能^[23-24]; 利胆扶正颗粒(茵陈、黄芪)联合血塞通注射液(三七皂苷)应用于肝外OJ患者术后早期治疗, 可明显提高机体免疫功能, 加速黄疸消退, 预防术后胆淤症的发生^[25-26]; 中药清热利湿疏肝方^[27](生大黄10 g、绵茵陈30 g、焦山栀10 g、软柴胡12 g、炒白术12 g、炒白芍12 g、枳壳9 g、当归12 g、广郁金9 g、茯苓12 g)、中药合剂(黄芪、党参、茯苓、女贞子、白芍、牛膝、土茯苓、黄芩、蒲公英各15 g, 金银花9 g)能使CD3, CD4, CD8及IL-2值明显下降^[28]。因此, 可以看出, 以上中药复方均具有增强肝外OJ细胞免疫功能的作用, 提高患者的抗病能力, 间接改善临床疾病症状。

2.5 综合治疗 肝外OJ的不同病因及复杂的并发症决定其中药复方的治疗并不是单纯的一个方面的临床处理, 而是几个方面或综合全面的有针对性的配伍给药治疗。茵陈蒿汤(茵陈、栀子、大黄)^[29]、清肝利胆退黄汤加减(茵陈、柴胡、郁金、山药、丹皮、茯苓、陈皮, 随证加

■应用要点

本综述从多方面总结了中药复方辅助治疗肝外OJ的作用与机制, 为进一步进行实验及临床研究与临床应用提供理论依据。

■同行评价

本文综述了有关方面有价值的报道,比较客观的阐述了中药复方制剂在肝外OJ辅助治疗领域中,所显示的良好疗效,对临床医生确实能起到指导作用,有较高研究价值。

减)^[30]、茵栀黄注射液(茵陈、栀子、黄芩)^[31]三者都有利胆、抗炎、保护肝脏、提高免疫能力等治疗作用,而且茵栀黄注射液通过胆道冲洗能直接去除梗阻。

3 结论

总之,中药复方治疗肝外OJ主要从消除病因和防治、治疗并发症着手。各种机械梗阻因素导致肝外OJ时,胆盐反流入血而不能进入肠道,肠道内细菌繁殖,内毒素释放增多,灭活减少。同时肠黏膜屏障功能受损,细菌和内毒素易进入血液循环,加之肝脏网状内皮系统清除功能下降,肝脏清除内毒素的能力下降,势必造成内毒素血症。而内毒素血症又可进一步诱导机体免疫抑制和胃肠黏膜、肝脏等组织脏器损伤,从而造成恶性循环。中药复方治疗肝外OJ主要通过阻断OJ对机体损伤的其中一个或多个环节,从而达到去除OJ病因或缓减、治疗严重的并发症的作用。以上中药复方在临床上对OJ的用药多数为术后的促进治疗,有助于巩固手术疗效和防止OJ手术并发症的发生和加重,但也有个别在术前进行中药复方治疗,无论术前还是术后给以中药复方治疗,其目的都是为手术的治疗做好准备和巩固手术疗效。并且依据肝外OJ机械梗阻因素,肝外OJ的治疗则主要以手术治疗为主,但是配合中药治疗则具有更佳的疗效。因此,中药是治疗肝外OJ围手术期的重要辅助措施之一。中药复方对肝外OJ的治疗作用范围的局限性及作用机制的不明确,限制了中药复方更广泛的使用。因此,需待进一步的通过实验及临床研究来填补这个空缺,从而促进中药的临床应用和推广。

4 参考文献

- 1 Baron RL, Stanley RJ, Lee JK, Koehler RE, Melson GL, Balfe DM, Weyman PJ. A prospective comparison of the evaluation of biliary obstruction using computed tomography and ultrasonography. *Radiology* 1982; 145: 91-98
- 2 耿小平. 关于梗阻性黄疸的几个问题. *中国基层医学* 1997; 4: 46-49
- 3 张东兰, 伊继玉. 中西医结合治疗阻塞性黄疸疗效观察. *滨州医学院学报* 1999; 22: 241
- 4 容树人, 容伯喜. 多发性肝内外胆管结石并发重度黄疸1例报告. *新中医* 1997; 29: 58
- 5 朱正淮, 杨晓萍. 中药治疗胆总管结石并阻塞性黄疸10例. *现代中西医结合杂志* 2005; 14: 2434-2435
- 6 李端阳, 吴金生, 马庆久, 高德明, 褚延魁. 梗阻性黄疸大鼠血及肝组织内皮素水平. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 891-892
- 7 秦冰, 王长友, 刘彩云, 赵宝泉, 林晓庆, 王忠裕. 肝复康对阻塞性黄疸肝细胞游离钙和内皮素的影响及其肝保

- 护作用机制. *中国煤炭工业医学杂志* 2004; 7: 574-576
- 8 秦冰, 王长友, 郭文希, 林晓庆, 马哲夫, 王忠裕. 肝复康对阻塞性黄疸肝脏保护作用的实验研究. *中国煤炭工业医学杂志* 2003; 6: 873-874
- 9 王三明, 伊新, 魏洪吉, 林木生. 加味大柴胡汤对阻塞性黄疸大鼠血浆内毒素的影响. *广东医学院学报* 2003; 21: 31-35
- 10 高野邦夫. 小柴胡汤对大鼠阻塞性黄疸的治疗效果. *1994; 44: 158*
- 11 谢娟, 黄能慧, 李诚秀. 汉丹肝乐对阻塞性黄疸影响的实验研究. *中华实用中西医结合杂志* 2000; 13: 905-906
- 12 孙伟, 何锋, 黄成钰, 王真, 翟珠妹, 章荣翔. 针刺、中药对胆道“T”字管外引流胆汁量的影响. *上海针灸杂志* 1998; 17: 9-10
- 13 于伟. 五味降酶汤治疗转氨酶升高98例. *中西医结合肝病杂志* 1994; 4: 33
- 14 季福, 孙建华, 施维锦, 姜广杰. 舒胆合剂降低阻塞性黄疸血清内毒素的实验研究. *上海第二医科大学学报*, 1999; 19: 64-65
- 15 王坚, 施维锦, 陈锦先, 李可为. 舒胆合剂防治阻塞性黄疸肾功能障碍的作用机制. *中国中西医结合外科杂志* 2003; 9: 70-73
- 16 王向东, 彭兵, 吴言涛. 生脉注射液、丹参注射液及生脉与丹参注射液合用对阻塞性黄疸术后细胞因子及肾功能的影响. *华西药理学杂志* 2003; 18: 10-12
- 17 Peng B, Du J, Jia Q, Qiao A, Wu Y, Liu X, Qiang Q. The effect of salvia miltiorrhiza and shengmai on inflammatory mediator and renal function of post-operative patients with obstructive jaundice. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2001; 32: 587-589
- 18 李斌, 段志忠. 清泻剂对梗阻性黄疸内毒素血症的影响. *大同医学学报* 1997; 17: 23-25
- 19 李金婷, 柳艳敏. 大承气汤保留灌肠对梗阻性黄疸患者血清内毒素水平影响. *天津中医* 1999; 16: 9-10
- 20 Chen HL, Zhou JY, Guan FL. Effect of da cheng qi decoction co. on endotoxemia in obstructive jaundice. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1991; 11: 724-726, 709
- 21 钟红卫, 刘登玉, 杜淑华. 中西医结合治疗梗阻性黄疸1例. *中国中医急症* 2005; 14: 279
- 22 蒋厚安. 中西医结合治疗阻塞性黄疸60例. *湖南中医药导报* 2002; 8: 482-484
- 23 巩涛, 曹月敏, 庄百溪, 张秋才, 杜权, 彭彦辉, 王跃欣, 杨冬野. 大柴胡汤加味对梗阻性黄疸患者血T细胞亚群和肿瘤坏死因子的影响. *中国中西医结合杂志*, 1997; 17: 660-662
- 24 Gong T, Cao YM, Zhuang BX. Effect of jiawei da-chaihu decoction on blood T lymphocyte subsets and tumor necrosis factor in patients with obstructive jaundice. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1997; 17: 660-662
- 25 杨秀竹, 孙静文, 李继坤. 利胆扶正颗粒对梗阻性黄疸患者术后细胞免疫功能的调节. *天津中医药* 2006; 23: 27-28
- 26 孙静文, 张伟. 中药对梗阻性黄疸患者术后免疫调节的研究. *陕西中医* 2006; 27: 14-16
- 27 叶蔚, 王小奇, 叶彬. 清热利湿疏肝方合西药对良性阻塞性黄疸患者血T细胞亚群及NK细胞的影响. *中国中医药科技* 2004; 9: 307-308
- 28 成志刚, 胡志前. 中药合剂调节梗阻性黄疸大鼠细胞免疫功能的实验研究. *中国中西医结合消化杂志* 2002; 10: 225-227
- 29 吴尘轩, 丁守成. 茵陈蒿汤用于梗阻性黄疸术后减黄的疗效观察. *中国中西医结合外科杂志* 2001; 7: 265-266
- 30 王立义, 柳德学. 原发性肝癌梗阻性黄疸的介入加中药治疗观察. *中华实用中西医结合杂志* 2005; 18: 893
- 31 靳三丁. 茵栀黄注射液胆道冲洗治疗新生儿阻塞性黄疸15例. *中医研究* 2001; 14: 40-41

癌基因C-erbB-2在结直肠癌中的表达及其与浸润转移的相关性

李巍, 田素礼, 李季

■背景资料

C-erbB-2, 又称 Neu或HER-2是人类癌基因之一。他是Shih在1974年从大鼠神经母细胞瘤和胶质母细胞瘤分离出来。研究表明, 他与多种肿瘤的发生、发展和预后密切相关, C-erbB-2在肿瘤中的表达及其与肿瘤临床生物学行为和预后的关系正受到人们日益密切的关注。

李巍, 田素礼, 李季, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科
黑龙江省哈尔滨市 150086

李巍, 2004年哈尔滨医科大学硕士生, 主要从事结直肠肿瘤的基因诊断和治疗的研究。

通讯作者: 田素礼, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科. stanley81@163.com
电话: 0451-86605044

收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-08-22

Expression of ontogene C-erbB-2 and its correlations with invasion and metastasis in colorectal carcinoma

Wei Li, Su-Li Tian, Ji Li

Wei Li, Su-Li Tian, Ji Li, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Su-Li Tian, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. stanley81@163.com

Received: 2006-07-25 Accepted: 2006-08-22

Abstract

AIM: To investigate the expression of oncogene C-erbB-2 and its significance in colorectal carcinoma.

METHODS: Immunohistochemical technique (SP) was performed to detect the expression of oncogene C-erbB-2 in 69 cases of colorectal carcinoma and its corresponding tissues from patients received curative resection.

RESULTS: The expression of C-erbB-2 was mainly found in cell membrane and cytoplasm of colorectal carcinoma tissues with a positive rate of 65.2% (45/69), which was significantly higher than that in the tissues of benign tumor (2/20, $P < 0.05$). The positive rate of C-erbB-2 expression had significant difference between colorectal cancer (65.2%) and its surrounding tissues (mesenteric: 47.8%, normal cancer-adjacent: 30.4%, distant resection margin: 13.0%; all $P < 0.05$). The expression of C-erbB-2 was signifi-

cantly correlated with the gross morphology, differentiation of the tumor cells, clinical staging (Dukes staging) and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not with the age, sex of patients, tumor location and size, as well as distant metastasis ($P > 0.05$). The expression of oncogene C-erbB-2 in the mesenteric margin and cancer-adjacent tissues was markedly different between routine histology and immunohistochemistry ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of C-erbB-2 gene is positively correlated with tumor invasion and metastasis in colorectal carcinoma, and it is a marker in evaluating the prognosis of colorectal carcinoma.

Key Words: C-erbB-2; Colorectal carcinoma; Immunohistochemistry; Invasion; Metastasis

Li W, Tian SL, Li J. Expression of ontogene C-erbB-2 and its correlations with invasion and metastasis in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3206-3211

摘要

目的: 探讨癌基因C-erbB-2在结直肠癌中的表达及其与局部浸润和淋巴结转移的相关性。

方法: 采用免疫组化SP法检测69例原发性结直肠癌患者根治性手术切除的癌组织及周围组织中C-erbB-2的表达。

结果: C-erbB-2基因主要为细胞膜及胞质内表达。结直肠癌组织中C-erbB-2阳性表达率为65.2%(45/69), 而在结直肠良性肿瘤中仅有2例表达(2/20), 两者存在显著差异($P < 0.01$); 其阳性表达率在结直肠癌组织(65.2%)及周围组织(系膜组织47.8%、癌旁组织30.4%、远端切缘组织13.0%)中有显著差异($P < 0.05$); 其表达与肿瘤大体类型、肿瘤细胞分化程度、临床分期(Dukes分期)及淋巴结转移关系密切($P < 0.05$), 而与结直肠癌患者年龄、性别、肿瘤部位及大小和远处转移无明显关系($P > 0.05$); C-erbB-2在系膜组织及癌旁组织中

的表达证实免疫组织化学方法同常规病理检测比较有显著差异($P<0.05$).

结论: C-erbB-2在结直肠癌中阳性表达与肿瘤浸润转移密切相关, 可作为预测预后的指标.

关键词: C-erbB-2; 结直肠肿瘤; 免疫组织化学; 浸润; 转移

李巍, 田素礼, 李季. 癌基因C-erbB-2在结直肠癌中的表达及其与浸润转移的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3206-3211
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3206.asp>

0 引言

结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 占消化道肿瘤的第二位. 随着近年分子生物学的发展从而明确结直肠癌的发生、发展是多个抑癌基因与原癌基因改变的多阶段形成的过程^[1]. C-erbB-2, 又称Neu或HER-2是人类癌基因之一. 他是Shih在1974年从大鼠神经母细胞瘤和胶质母细胞瘤分离出来^[2]. 研究表明, 他与多种肿瘤的发生、发展和预后密切相关^[3], C-erbB-2在肿瘤中的表达及其与肿瘤临床生物学行为和预后的关系正受到人们日益密切的关注^[4-10]. 肿瘤浸润转移是恶性肿瘤的主要特征之一, 在临床上, 肿瘤的浸润和转移是直接影响患者预后的重要因素. 本研究用免疫组化法探讨癌基因C-erbB-2在结直肠癌中的表达及其与肿瘤浸润转移的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-06/2006-01在哈尔滨医科大学附属第二医院行手术治疗的结直肠癌患者69例, 男51例、女18例; 年龄30-86(平均60.3)岁, 直肠癌27例、结肠癌42例, 其中回盲部癌3例, 升结肠癌3例, 结肠肝曲癌12例, 横结肠癌3例, 结肠脾曲癌3例, 降结肠癌7例, 乙状结肠癌8例, 结肠多源发癌3例; 溃疡型33例, 肿块型24例, 浸润型12例; 高分化腺癌12例, 中分化腺癌36例, 低分化腺癌及黏液腺癌21例; Dukes A期12例, B期30例, C期24例, D期3例. 所有患者术前均未接受化疗、放疗或其他针对肿瘤的治疗. 经过常规术前准备, 行结直肠癌根治术. 所有病例术后均经病理证实为结直肠腺癌, 并选取结直肠腺瘤(息肉)须经手术治疗患者20例作为对照组. 一抗鼠抗人C-erbB-2抗体和UltraSensitive™ SP超敏试

剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司.

1.2 方法 采用SP免疫组织化学方法, 操作步骤按试剂盒说明进行, 组织切片置入0.01 mol/L(pH 6.0)柠檬酸盐缓冲液中行高温高压抗原修复, 用已知阳性切片作阳性对照, PBS代替一抗作阴性对照. 实验组于手术结束时, 立即将新鲜切除的手术标本平铺无菌单上, 在肿瘤对侧纵向剖开肠管, 无菌生理盐水洗净. 牵拉标本使其处于无张力状态, 避开缺血及坏死区, 分别在癌组织(I)、结直肠远端切缘组织(II)、结直肠系膜组织(III)、癌旁组织(距癌3 cm处)(IV); 对照组分别在良性肿瘤组织(I')、远端切缘组织(II')、系膜组织(III')、肿瘤旁组织(IV')各切取1 cm×1 cm组织. 切取物分别置入40 g/L甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 4 μm厚连续切片. 同时测量肿瘤大小, 观察大体分型, 记录患者临床资料后病变组织送常规病理检查及C-erbB-2免疫组化SP法检测.

结果判定标准: C-erbB-2阳性为细胞质或细胞膜染色呈棕黄色, 为减少主观片面性, 每例分别有两人各自阅片, 然后核对所得结果, 获得共识. 以阳性细胞数为基础, 结合细胞染色强度, 定出抗原的表达强度, 在显微镜下(×400)计数至少5个随机视野, 取平均值. 阳性细胞比例<5%为(-), 5%-25%为(+), 26%-50%为(++), ≥51%为(+++).

统计学处理 采用SPSS 10.0统计分析软件包处理, 数据统计采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 C-erbB-2的表达 C-erbB-2在癌组织中的表达与良性肿瘤组织中的表达存在显著差异($\chi^2=18.97$, $P<0.01$), 说明C-erbB-2在结直肠癌组织中的表达有较高特异性. 实验组其他组织中也同样检测出C-erbB-2的存在, 且各组织中C-erbB-2的阳性表达率存在显著差异($\chi^2=43.813$, $P<0.01$, 表1).

2.2 C-erbB-2表达与临床病理的关系 结直肠组织中的C-erbB-2表达与患者年龄、性别、肿瘤部位及大小、远处转移无明显关系($P>0.05$), 而与大体分型、肿瘤细胞分化程度、淋巴结转移及临床分期密切相关($P<0.05$, 表2).

2.3 常规病理和C-erbB-2表达比较(表3) 本实验组69例结直肠癌患者系膜组织(III)经常规病理检查观察到27例系膜淋巴结转移, 转移率为

■ 研发前沿

癌基因C-erbB-2 (HER-2)在乳腺癌中的研究比较深入和透彻, 在此基础上使得C-erbB-2癌基因蛋白成为乳腺癌治疗中特异性细胞毒性药物的一卓越有效的靶目标. 赫赛汀(herceptin)应运而生并成功应用于乳腺癌患者. 而在其他肿瘤尤其在结直肠癌中的表达及其与浸润转移、预后的关系报道较少. 因为C-erbB-2广泛分布于皮肤、肌肉、骨、涎腺、乳腺、胃、肠、肺及卵巢等组织脏器中, C-erbB-2具有较广泛的普遍性, 近几年来, 国内外学者从不同角度广泛研究了癌基因C-erbB-2在肿瘤细胞中的激活和过表达与肿瘤的发生、发展及预后的关系, 以期其为其他肿瘤的诊断、鉴别诊断、基因治疗、免疫治疗以及同肿瘤患者预后关系的探讨开辟了新的途径.

■创新盘点

目前大多数的报道多为C-erbB-2阳性表达与结直肠癌患者的临床资料的单纯讨论而缺少对结直肠浸润和转移的解释,取材的部位大多数为癌和正常组织而未在癌组织周围组织(癌旁组织和系膜组织)取材,本研究取材部位上更加确切,分别在癌旁组织和系膜组织取得标本,能更好的说明癌的浸润和转移,通过精确取材、减少实验步骤,降低了假阳性和假阴性的发生率,提高了实验的准确性。

39.1%, 结直肠系膜C-erbB-2免疫组织化学染色阳性表达33例, 阳性表达率为47.8%。包括常规病理阳性27例, 并且这27例患者C-erbB-2的表达均呈阳性(++)和强阳性(+++). 在C-erbB-2免疫组织化学染色阴性的系膜中常规染色无一阳性. 应用C-erbB-2免疫组织化学染色比常规病理组织学染色能够发现更多的系膜转移($\chi^2 = 4.167$ $P < 0.05$); 69例结直肠癌患者癌旁(距癌3 cm)组织经常规病理检查未观察到癌细胞而只观察到腺体中至重度不典型增生, 而癌旁组织C-erbB-2免疫组织化学染色阳性表达21例, 其中弱阳性15例、阳性6例, 阳性表达率为30.4%, 两者差异显著($\chi^2 = 19.05$, $P < 0.005$).

3 讨论

越来越多的研究证明, 肿瘤浸润转移具有遗传物质基础, 受基因调控, 是由基因表达发生改变所致. C-erbB-2, 又称Neu或HER-2, 是目前研究较多的、与肿瘤的发生、发展相关的癌基因之一, 属于Src基因家族的成员. 后经证实人的HER-2, Neu, C-erbB-2为同一基因, 均定位于人染色体17q21区带^[11], 是一个有别于表皮生长因子受体(ERGF)基因(C-erbB-1, HER-1/Neu). C-erbB-2与EGFR具有高度同源性, 两者在肿瘤的发生和生物学行为等方面可能存在协同作用^[12-13], 且此协同作用主要取决于C-erbB-2^[14], C-erbB-2基因表达产物是一种具有受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)活性的跨膜糖蛋白, 由约1255个氨基酸构成, 相对分子质量为185 kDa, 故称P185. 该基因扩增或过表达出现于某些肿瘤组织中, 参与肿瘤的发生和发展过程, 并与患者预后有关^[15]. 通过分析肿瘤细胞中C-erbB-2基因在DNA, mRNA或其产物的不同水平上质和量的变化与肿瘤侵袭转移表型之间的相关性, 或通过基因转染使转染肿瘤细胞获得转移能力的实验, 已证明该基因与肿瘤转移相关^[16]. C-erbB-2在正常情况下处于非激活状态, 参与细胞生长、分化的调节, 当受到体内外各种致癌因素的作用后, 其基因结构或表达调控失调而被激活导致细胞无序生长、运动、浸润、转移. 具有肿瘤转化活性. 研究表明, C-erbB-2的过表达与上皮细胞恶性转化直接相关^[17]. 已有文献报道C-erbB-2基因在乳腺癌^[3]、卵巢癌^[3]、胰腺癌^[3]、结直肠癌^[3]、非小细胞肺癌^[18]、膀胱癌^[19]、胃和食管下段腺癌^[20]、前列腺癌^[21]等多种肿瘤中均有不同程度的表达, 在此

表 1 结直肠癌组织中C-erbB-2的表达情况

组织	C-erbB-2免疫组化				合计 <i>n</i>	阳性 率(%)	χ^2	<i>P</i> 值
	-	+	++	+++				
实验组								
(Ⅰ)	24	18	18	9	69	65.2 ^b		
(Ⅱ)	60	9	0	0	69	13.0		
(Ⅲ)	36	33	0	0	69	47.8		
(Ⅳ)	48	15	6	0	69	30.4	43.813	<0.01
对照组								
(Ⅰ')	18	2	0	0	20	10.0		
(Ⅱ')	20	0	0	0	20	0		
(Ⅲ')	20	0	0	0	20	0		
(Ⅳ')	20	0	0	0	20	0	6.154	>0.05

$\chi^2 = 18.97$, ^b $P < 0.01$ vs (I').

基础上使得C-erbB-2癌基因蛋白成为乳腺癌治疗中特异性细胞毒性药物的一个卓越有效的靶目标^[22], 赫赛汀(herceptin)应运而生并成功应用于乳腺癌患者. C-erbB-2检查已经常规用于乳腺癌转移的患者的甄别, 以期用赫赛汀针对性基因免疫治疗^[23].

C-erbB-2基因在结直肠癌中的阳性表达率国内外文献报道不一. 周志伟 *et al*^[24]报道为52%, 而高凤兰^[25]报道为80%, Baxevis *et al*^[3]报道高达90%, 本研究实验组C-erbB-2在癌组织中的阳性率为65.2%, 其表达与对照组良性肿瘤组织中的表达存在显著差异($\chi^2 = 18.97$, $P < 0.005$), 而在结直肠癌周围相关组织中也有不同程度的表达, 他们之间差异显著($P < 0.05$), 说明C-erbB-2在结直肠癌组织中的表达有较高特异性, 并提示可能参与结直肠癌的发生和发展过程中. 肿块型、溃疡型、浸润型肿瘤C-erbB-2阳性表达率分别为45.8%, 69.7%, 91.7%, 三者的阳性表达率依次上升, 两两之间有显著性差异($P < 0.05$). 原因可能是肿块型主要为膨胀性生长, 周围的纤维组织增生可阻挡癌的局部浸润, 而溃疡型与浸润型多呈浸润性生长, 侵袭力强, 易侵犯黏膜下, 而黏膜下组织相对比较疏松, 淋巴组织比较丰富, 更有利于癌细胞的直接浸润和淋巴转移; Dukes A, B, C, D期C-erbB-2阳性表达率分别为33.3%, 66.7%, 75.0%, 100.0%. 随着Dukes分期的增加阳性表达率依次增高, 两两之间差异显著($P < 0.05$), 说明肿瘤浸润肠壁越深, 癌组织中C-erbB-2阳性表达率越高, 临床分期与C-erbB-2阳性表达率呈正相关; 在有淋巴结转

表 2 C-erbB-2在结直肠癌组织的表达与临床病理的关系

临床病理	n	C-erbB-2免疫组化染色结果				阳性率 (%)	χ^2	P
		-	+	++	+++			
年龄(岁)								
<60	27	6	9	6	6	77.8	3.085	>0.05
≥60	42	18	9	12	3	57.1		
男	51	18	9	18	6	64.7	0.022	>0.05
女	18	6	9	0	3	66.7		
结肠	42	15	12	12	3	64.3	0.041	>0.05
直肠	27	9	6	6	6	66.7		
肿瘤大小								
<3 cm	21	6	6	9	0	71.4	0.513	>0.05
≥3 cm	48	18	12	9	9	62.5		
大体分型								
肿块型	24	13	6	3	2	45.8	7.968	<0.05
溃疡型	33	10	9	9	5	69.7		
浸润型	12	1	3	6	2	91.7		
分化程度								
高分化腺癌	12	0	9	2	1	100	7.800	<0.05
中分化腺癌	36	15	9	8	4	58.3		
低分化-黏液腺癌	21	9	0	8	4	57.1		
Dukes								
A	12	8	2	1	1	33.3	8.018	<0.05
B	30	10	9	8	3	66.7		
C	24	6	6	8	4	75.0		
D	3	0	1	1	1	100.0		
淋巴结转移								
有	27	5	6	10	6	81.5	5.172	<0.05
无	42	19	12	8	3	54.8		
远处转移								
有	3	0	1	1	1	100.0	1.673	>0.05
无	66	24	17	17	8	63.6		

■应用要点

本研究应用免疫组织化学染色方法对结直肠癌患者系膜内及癌旁组织中肿瘤相关癌基因C-erbB-2进行了检测,发现C-erbB-2阳性的结直肠癌更具侵袭性、易转移、预后差。应用免疫组织化学染色方法能够提高临床分期的准确性,对判断患者预后、癌前病变及早发现、肿瘤切除范围、指导术后辅助治疗具有重要意义。

移与无淋巴结转移比较有显著差异($P<0.05$),说明C-erbB-2癌基因的活化在癌细胞局部浸润肠壁至淋巴结转移的过程中起着一定作用,参与结直肠癌发生和发展, C-erbB-2阳性表达的结直肠癌具有更强的浸润、转移能力,预后差;肿瘤细胞分化越差,癌组织中C-erbB-2的阳性表达率越低,阳性表达强度越强,高、中、低(黏液腺癌)分化腺癌其表达率依次为100.0%, 58.3%, 57.1%, 两两之间差异显著($P<0.05$);其阳性(++和+++)表达强度依次升高,分别为25.0%(3/12), 33.3%(12/36)和57.1%(12/21),这与李晓杰 *et al*^[26]报道相一致,而与黄文 *et al*^[27]报道不同,这可能与C-erbB-2基因表达调控有关,有待进一步研究。

关于C-erbB-2基因在结直肠癌中的表达及其与预后的关系,有学者认为, C-erbB-2癌

表 3 系膜及癌旁组织常规组织病理检查与C-erbB-2免疫组织化学检查的对比

免疫组化	常规病理法		合计
	阳性	阴性	
阳性	27 (0)	6 (21)	33 (21)
阴性	0 (0)	36 (48)	36 (48)
合计	27 (0)	42 (69)	69 (69)

$$\chi^2 = 4.167(19.05), P < 0.05(0.005).$$

基因不是影响结直肠癌预后的主要因素^[28],而Ross *et al*^[29]和许天文 *et al*^[30]认为, C-erbB-2表达水平对结直肠癌的预后具有重要价值。临床上结直肠癌治疗失败的主要原因是术后局部复发和远处转移,这与恶性肿瘤局部浸润和转移密切相关。我们应用免疫组织化学染色方法对

■名词解释

1 癌旁组织: 是在距离结直肠癌组织3 cm处的移行黏膜组织(TM), 是一些非典型增生的癌前病变, 具有向癌组织分化的潜在趋势, 是癌细胞向周围局部浸润的主要组织。

2 系膜组织: 是结直肠癌组织所在区段相对应的远端系膜, 系膜中有丰富的淋巴组织, 是结直肠癌淋巴转移中所经过的主要组织。

结直肠癌患者系膜内及癌旁组织中肿瘤相关癌基因C-erbB-2的检测比常规病理检测方法能够发现更多、更早的系膜转移和局部浸润, 说明癌细胞向癌旁及系膜组织浸润和转移的过程中, 存在P185的微绒毛和伪足, 可使肿瘤细胞通过正常组织向癌周围相关组织浸润和转移, 同时癌细胞分泌出多种表皮生长因子, 来诱导癌组织周围相关组织细胞异常增殖。而P185是一种受表皮生长因子调节的受体, 从而激活C-erbB-2。所以, 在癌旁及系膜组织常规病理检查未发现肿瘤细胞时, 已有C-erbB-2的阳性表达。C-erbB-2阳性的结直肠癌更具侵袭性、易转移、预后差。应用免疫组织化学染色方法能够提高临床分期的准确性, 对判断患者预后、癌前病变及早发现、肿瘤切除范围、指导术后辅助治疗具有重要意义。C-erbB-2在结直肠癌中阳性表达与肿瘤浸润转移密切相关, 作为临床上一个预测结直肠癌预后的指标有一定的参考价值。

在本实验中, 对远端切缘组织(II)进行检测时, 发现常规组织学检查在(II)中未见癌细胞存在, 但免疫组化法检测C-erbB-2弱阳性结果有9例, 这9例中6例是低位直肠癌患者, 3例是结肠多源发癌, 能否说明存在结直肠癌的微转移灶, 尚需进一步对组织C-erbB-2进行定量分析。

4 参考文献

- 1 Friederichs J, Rosenberg R, Mages J, Janssen KP, Maeckl C, Nekarda H, Holzmann B, Siewert JR. Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 391-402
- 2 Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981; 290: 261-264
- 3 Baxevanis CN, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NN, Papamichail M. Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 166-175
- 4 唐金海, 王亚平, 周建农, 许发培, 李宗佑. 应用PCR方法检测大肠癌组织中HPV和C-erbB-2基因. *中华肿瘤杂志* 1997; 19: 142
- 5 黄勇, 蔡树模, 俞绍音, 施达仁, 张国玲, 王华英, 陆洪芬. 宫颈腺癌c-erbB-2、增殖细胞核抗原表达及其意义. *中华肿瘤杂志* 1997; 19: 150-152
- 6 史锦兰, 陆以农, 陈萍倩, 郁霞秋, 张蓉. 卵巢恶性肿瘤p53, c-erbB-2癌基因表达及其临床病理学意义. *肿瘤* 1998; 18: 258-261
- 7 万德森, Zhau HE, Levin B, Chung LW.K. C-erbB-2/neu基因表达水平与结直肠癌预后的关系. *中山医科大学学报* 1994; 15: 120-124
- 8 陈万源, 郑树, 张谷, 陈贤贵. 癌蛋白c-erbB-2在大肠癌

■同行评价

作者通过对结直肠癌组织及周围组织进行C-erbB-2检测, 并分析其与局部浸润和淋巴结转移的相关性, 最后得出C-erbB-2在结直肠癌中阳性表达与肿瘤浸润转移密切相关, 可作为临床上一个预测结直肠癌预后的指标。该文选题立足于临床需要, 结果具有一定的意义。

- 中表达的意义. *中国肿瘤临床* 1999; 26: 267-269
- 9 张丽华, 陈瑛. C-erbB-2癌基因产物在大肠癌中的表达. *临床肿瘤学杂志* 1999; 4: 45-46
 - 10 焦亚莉. 大肠癌c-erbB-2表达与肿瘤生物学行为的关系. *河南医药信息* 2002; 10: 5-6
 - 11 Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-1139
 - 12 王青, 吴金生, 高德明, 赖大年, 马庆久. EGF受体和转化生长因子 α -mRNA在人大肠癌组织的表达意义. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 590-592
 - 13 张建兵, 陈莉, 韩枋, 于兰, 何松, 周建云. c-erbB-2过表达、nm23低表达与结直肠癌预后不良的关系. *中华病理学杂志* 2003; 32: 115-119
 - 14 曲嫻, 刘建平, 曲宏, 孙红霞. 大肠癌C-erbB-2和EGFR的表达意义. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 838-839
 - 15 Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 379-398
 - 16 Wiltshcke C, Tyl E, Speiser P, Steininger A, Zeillinger R, Kury F, Czerwenka K, Kubista E, Preis P, Krainer M. Increased natural killer cell activity correlates with low or negative expression of the HER-2/neu oncogene in patients with breast cancer. *Cancer* 1994; 73: 135-139
 - 17 Kiessling R, Wei WZ, Herrmann F, Lindencrona JA, Choudhury A, Kono K, Seliger B. Cellular immunity to the Her-2/neu protooncogene. *Adv Cancer Res* 2002; 85: 101-144
 - 18 Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Verdebout JM, Delmotte P, Lafitte JJ, Sculier JP. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer* 2003; 89: 959-965
 - 19 McCann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Carney DN. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990; 65: 88-92
 - 20 Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M, Kelsen DP, Chaganti RS. Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1990; 50: 6417-6422
 - 21 Di Lorenzo G, Autorino R, De Laurentiis M, Cindolo L, D'Armiento M, Bianco AR, De Placido S. HER-2/neu receptor in prostate cancer development and progression to androgen independence. *Tumori* 2004; 90: 163-170
 - 22 Choudhury A, Kiessling R. Her-2/neu as a paradigm of a tumor-specific target for therapy. *Breast Dis* 2004; 20: 25-31
 - 23 Tsuda H. HER-2 (c-erbB-2) Test Update: Present Status and Problems. *Breast Cancer* 2006; 13: 236-248
 - 24 周志伟, 万德森, 张昌卿, 陈功, 潘志忠, 林素暇. c-erbB-2基因表达水平与结直肠癌的预后. *中华肿瘤杂志* 2001; 23: 139-141
 - 25 高凤兰. 直肠癌C-erbB-2、nm23蛋白表达与预后的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1015-1018
 - 26 李晓杰, 胡玉林, 谢志斌, 蒋莎莉, 谢白玉. P-gp、GST- π 、TOPO-II、C-erbB-2及p53在大肠癌中的表达与临床意义. *南华大学学报·医学版* 2004; 32: 463-467
 - 27 黄文, 谢宗贵, 王要军, 孙自勤. 大肠癌C-erbB-2蛋白产物的表达. *新消化病学杂志* 1996; 4: 351

- 28 McKay JA, Loane JF, Ross VG, Ameyaw MM, Murray GL, Cassidy J, McLeod HL. c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 568-573
- 29 Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 2001; 19: 554-568
- 30 许天文, 陈道达, 郑勇斌, 连彦军. C-erbB-2, nm23蛋白表达与结直肠癌浸润转移的相关性. *华中科技大学学报(医学版)* 2005; 34: 214-216

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 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

代码	期刊名称	总被引频次	学科内排名	影响因子	学科内排名
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2665	1	1.062	5
G803	肝脏	369	17	0.428	15
G257	临床内科杂志	383	16	0.289	22
G855	临床消化病杂志	173	24	0.163	28
G261	临床心血管病杂志	589	13	0.289	22
G293	临床血液学杂志	256	22	0.340	19
G662	内科急危重症杂志	134	27	0.172	27
G190	世界华人消化杂志	2079	4	0.485	14
G800	胃肠病学	271	20	0.324	20
G326	胃肠病学和肝病学杂志	292	19	0.282	24
G083	心肺血管病学杂志	154	25	0.192	26
G419	血管病学进展	297	18	0.238	25
G260	心脏杂志	394	15	0.355	17
G610	胰腺病学	137	26	0.589	11
G234	中国动脉硬化杂志	670	12	0.662	10
G267	中国实用内科杂志	1167	8	0.312	21
G444	中国体外循环杂志	68	28	0.354	18
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	415	14	0.563	12
G633	中国血液净化	229	23	0.391	16
G231	中华肝脏病杂志	2014	5	1.573	1
G155	中华内分泌代谢杂志	1249	7	0.981	6
G156	中华内科杂志	2409	3	0.903	7
G161	中华肝脏病学杂志	1003	9	1.077	4
G211	中华糖尿病学杂志	859	11	1.209	3
G285	中华消化内镜杂志	934	10	0.782	9
G168	中华消化杂志	1645	6	0.798	8
G892	中华心律失常学杂志	269	21	0.514	13
G170	中华心血管病学杂志	2622	2	1.272	2
	平均值	849		0.593	

¹中国科技期刊引证报告/潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2006. 10

RNA干扰Survivin基因治疗大肠癌作用机制的研究进展

张志宏, 韩盛玺

张志宏, 韩盛玺, 四川省医学科学院, 四川省人民医院消化内科 四川省成都市 610041

通讯作者: 张志宏, 610041, 四川省成都市西一环32号, 四川省医学科学院, 四川省人民医院消化内科. zhang-821@21cn.com
电话: 028-66304892

收稿日期: 2006-09-10 接受日期: 2006-10-09

摘要

Survivin(生存素)作为IAP家族成员之一,被认为是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子. 以siRNA干扰Survivin的表达靶向观察其对大肠癌细胞基因的表达及对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响及其可能的作用机制.

关键词: Survivin; siRNA干扰; COX-2抑制剂

张志宏, 韩盛玺. RNA干扰Survivin基因治疗大肠癌作用机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3215-3218
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3215.asp>

0 引言

小干扰RNA片段(small interfering RNA, siRNA)对目的基因Survivin的干扰是否对相应的基因和蛋白质的表达产生影响,从而干扰细胞的增殖和凋亡.

1 RNA干扰及其作用机制

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指由小片段的双链RNA分子介导的生物细胞内同源基因的特异性转录后基因静默现象(post-transcriptional gene silencing). 最早报道见于1990年,但直至1998年,Fire *et al*^[1]首次将正义链和反义链的RNA混合物-双链RNA(double stranded RNA, dsRNA)注入线虫,结果诱发出比单独注射正/反义链强10倍以上的基因静默现象,而且在其后代亦可产生同样应答^[2],自此激励许多实验室从事大规模的基因组筛选研究以阐明基因功能. 其作用机制分为如下二个阶段: (1)长链的双链RNA进入细胞;在细胞胞质内的核酸酶-Dicer的作用下,dsDNA被切割成21-23 bp的siRNA;后者(包括外源性合成的和内源性表达的siRNA)均可与一些功能蛋白结合,

形成RNA介导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complexes, RISC); (2)RISC中螺旋酶解开双链siRNA,后者通过解开的反义链与siRNA具有高度互补序列的靶信使RNA(messenger RNA)结合, RISC切割降解与siRNA序列互补的mRNA,从而引起特定基因的沉默. 其主要特点包括: (1)高特异性: siRNA只能特异性的降解同源性mRNA,对siRNA其他种类基因的表达不受影响. Wohlbold *et al*^[3]证明用siRNA能有效沉默异常BCR-ABL融合基因表达,而不影响正常c-BCR和c-ABL的转录; (2)高效性: 少量dsRNA可促进大量同源mRNA的降解,与寡脱氧核苷酸(oligodeoxyribonucleic acids, ODNs)比较其最大抑制浓度(IC₅₀)低100-1000倍^[4-5],并且作用时间延长^[6],同时有研究证明通过电穿孔、局部注射或静脉注射^[7]的方法已经成功将化学合成的siRNA、表达siRNA的质粒以及病毒等导入哺乳动物,并不引起全身非特异性反应^[4,8-9]. 2004年美国FDA已经批准将经过修饰的siRNA进行临床新药实验,用于治疗与年龄相关的黄斑退化性改变的患者^[8]. 总之, RNAi作为研究基因功能的一种重要和常用的技术,已经广泛用于基因组的研究和临床疾病包括病毒感染、显性遗传疾病,尤其是肿瘤的治疗研究,有着广阔的前景和应用潜力.

2 Wnt信号传导通路的作用机制

目前在我国,大肠癌作为一种常见的恶性肿瘤,其发病率呈现出逐年增加的趋势,但是由于其治疗效果不尽如人意,使人们对其病因、发病机制的研究兴趣日益增加. 而防治肿瘤的关键在于诱导肿瘤细胞的凋亡和抑制其无限增殖. 目前认为在结肠癌变发生、发展的多个环节中, Wnt信号传导通路发挥着决定性的作用. 其通路中的多个成员如APC, β -catenin, cyclinD, c-myc, Survivin, PTEN等在结肠癌变的过程中均出现异常改变. APC(adenomatous polyposis coli)属于抑癌基因的一种. 生理环境中的APC基因既可以自身聚合(即同源寡聚体化),也可与 β -catenin等蛋

■背景资料

RNA干扰是由小片段的双链RNA分子介导细胞内同源基因的静默. 其可产生的效果较单独注射正/反义链强10倍以上. Fire *et al*的研究结果激励许多实验室从事大规模的基因组筛选研究以阐明基因功能.

■应用要点

了解APC(COX-2), Survivin及PTEN之间表达的相关性, 以及用NSAIDs制剂及特异性RNAi干扰Survivin的表达, 了解其可能对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响, 为进一步阐明其作用机制和为防治大肠癌提供理想的方法和途径有着十分重要的理论和实践意义。

白结合, 从而参与调节细胞的黏附、细胞周期进程和细胞的凋亡等过程。病理条件下, 发生突变的APC基因一方面可以干扰细胞与细胞间以及细胞与间质组织间的相互作用, 从而导致细胞的异常增生; 另一方面可导致APC与 β -catenin复合物的解体, 游离的 β -catenin可以结合于转录因子TCF/LEF-1, 引起靶基因c-myc的激活, 使细胞无序分裂而不死亡, 从而造成细胞的无序增生, 最终导致肿瘤的形成^[10-11], 这也提示APC基因的失活是大肠肿瘤发生、发展过程中的一个关键的分子^[12]。此外, 研究证实腺瘤向腺癌进展的各个阶段, APC基因的失活率相似, 均大于80%, 这说明APC基因失活发生在癌变的初始阶段^[13]。进一步的研究发现一些独立的修饰基因(指能够修饰一个突变基因的表现形式, 而对正常状态无明显影响的一些基因位点)能够在很大程度上影响APC基因的突变后果, 而COX-2正是作为APC的一个修饰基因位点对后者的表达发挥着重要的作用。而Kim *et al*^[14]证实Survivin是APC/TCF-4/ β -catenin的下一个靶点, 由于TCF-4的结合位点是在Survivin转录增强子区域中, TCF-4/ β -catenin信号通路的激活会导致Survivin的表达显著上升。与Survivin相反, 作为抑癌基因的PTEN与Survivin均参与细胞周期的调控和细胞凋亡的发生, 作用环节一致, 而生物学效应相反, 在肿瘤中的表达常常减少或缺失^[15]。总而言之, Wnt信号传导通路在大肠癌变的过程中可能发挥着决定性的作用。

3 Survivin的作用机制

Survivin是近来发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族成员之一, 被认为是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子。于1997年由Ambrosini *et al*经效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1) cDNA在人类基因组库的杂交筛首先分离出来。Survivin位于染色体17q25的同一基因族, 长度范围在75-130 kb, 包括4个外显子和3个内含子mRNA编码的一个由142个氨基酸组成的相对分子质量约17 kDa的胞质蛋白。目前发现3个剪切体: Survivin- Δ Ex3, Survivin-2B, Survivin-3B。不同于其他IAP家族成员主要分布于正常终末分化组织中, 由Survivin基因编码产生的蛋白可以在胚胎发育过程中和绝大多数肿瘤组织中表达, 在正常组织中则不表达。研究发现, Survivin在结肠癌组织及癌旁的正常组织中表达阳性率

分别为63.05%和29.1%, 有着显著差异。同时发现在Dukes分期II期的患者中, Survivin阳性的患者5 a存活期为44.8%, 而阴性者则为94.4%, 提示其阳性表达对疾病的预后有着重要影响^[16]。同样在其他肿瘤如宫颈癌^[17]和乳腺癌^[18]中的高阳性率的表达也认为与肿瘤细胞的低分化呈正相关, 而与预后呈负相关。其主要作用机制可能与以下几点相关: (1)凋亡途径的上游启动酶有内源性caspase-9和外源性caspase-8, 下游的执行酶有caspase-3和caspase-7等。Survivin可直接与激活的caspase-3和caspase-7结合而抑制其活性, 阻止由caspase激活剂或凋亡诱导剂诱导的细胞DEVD-cleaving自杀酶的累积, 从而起到抑制细胞凋亡的作用^[19-20]; (2)也有研究认为, Survivin通过与线粒体释放的凋亡前蛋白, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶二级活化物(second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC)结合, 间接抑制caspase-9依赖的细胞凋亡信号传导或通过Survivin的Thr34磷酸化后直接与caspase-9结合抑制其活性, 阻断caspase-9依赖的细胞凋亡信号传导^[21-22]; (3)通过竞争性与CDK4/P21结合, 激活cdk2/cyclin E, 介导pkb磷酸化, 促进S期进程, 同时从CDK中释放出P21, 与procaspase-3形成复合物, 抑制caspase-3的活性^[23]; (4)通过其细胞周期调节作用, 使肿瘤细胞逃避细胞周期G2/M期检测点的监测, 抵抗因DNA损伤或突变自身诱导的细胞凋亡, 从而导致肿瘤细胞异常分裂增殖^[24]。另外, Survivin的表达受到信号通路的调控: (1)Survivin作为APC/TCF-4/ β -catenin下游的一个靶点受到Wnt通路的调控; (2)磷酸酰肌醇-3激酶(PI3K)/AKT通路中, PI3K是T淋巴细胞内重要的信号转导分子, 通过催化底物磷酸酰肌醇发生磷酸化而将活化信号传入细胞内, 进而激活PKB等信号参与细胞活化和细胞毒效应。而PKB/AKT的主要作用是作为PI3K的下游底物。PI3K磷酸化后, 可导致Survivin的上升^[25], 相反PI3K途径受抑制会导致其表达式的下调^[26]。Fornaro *et al*^[27]认为, 抑制AKT的表达可以阻断整联蛋白所介导的Survivin的表达; (3)有研究认为, 存在JAKs-STAT3-Survivin信号传导通路。活化的STATs将直接导致Survivin的表达上调^[20]。正是由于其所具有的在肿瘤组织中高选择性的表达和独特的抗凋亡的作用机制, Survivin作为一种新的凋亡抑制因子, 因而有可能作为肿瘤治疗的一个特异的攻击靶点, 从而为肿瘤治疗提供新的思

路. 因此, 越来越受到国内外学者们的广泛关注. 与Survivin相反, 作为抑癌基因的PTEN定位于10q23, 与Survivin均参与细胞周期的调控和细胞凋亡的发生, 作用环节一致, 而生物学效应相反. PTEN作为目前发现的唯一具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因在维持正常细胞的稳定性中发挥重要作用^[28]. 此外因其具有对PI3K-PKB/AKT信号传导通路的负调控作用而备受关注, 甚至有学者称为其为PTEN-PI3K-PKB/AKT通路. 其主要机制为: PTEN蛋白可依赖其脂质磷酸酶活性, 使磷脂酰肌醇PIP3的D3位去磷酸化, 使焦点黏附蛋白(focal adhesion kinase, FAK)和AKT的磷酸化受抑, 导致PI3K/Akt信号转导途径受阻, 从而抑制Survivin的表达, 启动细胞周期、促进细胞分裂. 当组织恶变时, PTEN基因常发生突变, 其表达出现下调或缺失, 对PI3K/AKT通路的抑制作用减弱, 则抑制肿瘤细胞增殖分化能力减弱, 而Survivin的表达上调, 一方面启动细胞周期, 促进分裂; 另一方面进入细胞核与CDK4结合, 抑制凋亡, 促使肿瘤细胞的恶性增殖能力增强^[29]. 而应用PTEN基因转染神经胶质瘤和卵巢癌可使肿瘤细胞周期阻滞, 诱导细胞凋亡^[30-32]. 可能存在通路APC(COX-2)/TCF-4/ β -catenin/Survivin(PTEN). 有实验认为, 在结肠隐窝轴系统中, 由基底部至隐窝顶部APC的表达由弱至强. 而Survivin则相反, 在底部表达阳性, 中部以上则缺失. 由此提示, APC可能起着调节Survivin表达的作用^[33]. 而在一项肺癌研究中认为APC的修饰基因COX-2与Survivin的表达呈协同上升趋势^[34]. 另有研究报道, 通过转染外源性 β -catenin和TCF-4可使Survivin上升^[35], 而用Survivin反义寡核苷酸^[36]及非甾体抗炎药(NSAIDs试剂)则均可诱导肿瘤细胞Survivin的表达下调, 并且诱导细胞的凋亡^[37-38].

总之, 进一步了解APC(COX-2), Survivin及PTEN之间表达的相关性, 以及用NSAIDs制剂及特异性RNAi干扰Survivin的表达, 了解其可能对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响, 以期为进一步阐明其作用机制和为防治大肠癌提供理想的方法和途径, 有着十分重要的理论和实践意义.

4 参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 2 Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested

- dsRNA. *Nature* 1998; 395: 854
- 3 Wohlbold L, van der Kuip H, Miething C, Vornlocher HP, Knabbe C, Duyster J, Aulitzky WE. Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). *Blood* 2003; 102: 2236-2239
- 4 Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6347-6352
- 5 McCarthy BA, Mansour A, Lin YC, Kotenko S, Raveche E. RNA interference of IL-10 in leukemic B-1 cells. *Cancer Immunol* 2004; 4: 6
- 6 Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1000-1004
- 7 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-178
- 8 Karagiannis TC, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 787-795
- 9 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-6888
- 10 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-1790
- 11 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
- 12 Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170
- 13 Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-237
- 14 Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 2003; 362: 205-209
- 15 Li YL, Tian Z, Wu DY, Fu BY, Xin Y. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 285-288
- 16 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650
- 17 Singh A, Sharma H, Salhan S, Gupta SD, Bhatla N, Jain SK, Singh N. Evaluation of expression of apoptosis-related proteins and their correlation with HPV, telomerase activity, and apoptotic index in cervical cancer. *Pathobiology* 2004; 71: 314-322
- 18 Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen

■同行评价

本文旨在通过用siRNA干扰Survivin的表达, 观察其对大肠癌细胞基因的表达及Survivin与COX-2/PTEN及APC之间的关系, 本文主题明确, 层次分明, 有参考价值.

- VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem* 2004; 50: 1986-1993
- 19 Hay BA. Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1045-1056
- 20 Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002; 21: 315-320
- 21 Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001; 108: 981-990
- 22 Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002; 7: 163-166
- 23 Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000; 19: 3225-3234
- 24 Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastry PR. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2004; 6: 29-40
- 25 Yang D, Zhu YQ, Qi J. Expression and clinical significance of survivin gene and PTEN protein in colorectal adenocarcinoma. *Ai Zheng* 2004; 23: 306-309
- 26 Kim S, Kang J, Qiao J, Thomas RP, Evers BM, Chung DH. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastomas. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 516-521
- 27 Fornaro M, Plescia J, Chheang S, Tallini G, Zhu YM, King M, Altieri DC, Languino LR. Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via the AKT/survivin pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 50402-50411
- 28 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Milaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- 29 Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9052-9057
- 30 Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung WK, Mills GB, Steck PA. Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* 1998; 58: 5285-5290
- 31 Minaguchi T, Mori T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y. Growth suppression of human ovarian cancer cells by adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene. *Cancer Res* 1999; 59: 6063-6067
- 32 Hang Y, Zheng YC, Cao Y, Li QS, Sui YJ. Suppression of gastric cancer growth by adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2224-2229
- 33 Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8664-8667
- 34 Krysan K, Merchant FH, Zhu L, Dohadwala M, Luo J, Lin Y, Heuze-Vourc'h N, Pold M, Seligson D, Chia D, Goodglick L, Wang H, Strieter R, Sharma S, Dubinett S. COX-2-dependent stabilization of survivin in non-small cell lung cancer. *FASEB J* 2004; 18: 206-208
- 35 Zhu HX, Zhang G, Wang YH, Zhou CQ, Bai JF, Xu NZ. Indomethacin induces apoptosis through inhibition of survivin regulated by beta-catenin/TCF4 in human colorectal cancer cells. *Ai Zheng* 2004; 23: 737-741
- 36 Dai DJ, Lu CD, Lai RY, Guo JM, Meng H, Chen WS, Gu J. Survivin antisense compound inhibits proliferation and promotes apoptosis in liver cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 193-199
- 37 Zhang T, Fields JZ, Ehrlich SM, Boman BM. The chemopreventive agent sulindac attenuates expression of the antiapoptotic protein survivin in colorectal carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 434-437
- 38 Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, Pold M, Dubinett S. Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 6359-6362

电编 张敏 编辑 王晓瑜

抗细胞凋亡基因及其与大肠癌关系的研究进展

米丽娜, 关景明, 吕丽艳

米丽娜, 关景明, 吕丽艳, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 米丽娜, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科. miriam_2006@126.com
电话: 0451-88738870

收稿日期: 2006-09-17 接受日期: 2006-09-29

摘要

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率有逐渐增高的趋势. 凋亡的调节对人体组织保持内环境稳态及正常细胞形态至关重要, 这一过程受到干扰将使细胞寿命无限延长或累积突变, 有利于大肠癌的发生. 大肠癌的发生与细胞凋亡的关系已经受到普遍的重视, 通过对抗细胞凋亡基因及其与大肠癌关系的研究, 对了解大肠癌发病机制有重要意义, 在临床上可为大肠癌的诊断及治疗提供一些思路和方法. 本文就几种重要的抗细胞凋亡基因及其与大肠癌关系的研究进展作简要综述.

关键词: 大肠癌; Bcl-2; IAP家族; Bag-1; NF- κ B; 细胞凋亡

米丽娜, 关景明, 吕丽艳. 抗细胞凋亡基因及其与大肠癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3219-3223
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3219.asp>

0 引言

大肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发生不仅与癌基因的激活和抑癌基因的失活有关, 还与细胞增殖和凋亡的失衡有着密切的关系. 抗细胞凋亡基因与大肠癌的发生、发展密切相关, 本文就几种重要的抗细胞凋亡基因及其与大肠癌关系的研究进展加以综述.

1 Bcl-2(B-cell lymphoma/leukemia-2)

1.1 Bcl-2基因及其蛋白的分子结构、分布 Bcl-2基因是1984年Tsujiimoto *et al*^[1]首先在人类B细胞滤泡性淋巴瘤中发现的. 正常情况下, Bcl-2基因位于18q21.3染色体片段, 有3个外显子. Bcl-2蛋白是一个分子质量为25 kDa的膜蛋白, 与细胞器特别是线粒体膜相关联的稳定蛋白, 主要位于细胞核外膜、线粒体膜(主要在外膜, 内膜较

少)、滑面和粗面内质网及多囊体膜上.

1.2 Bcl-2的生物学功能及其抗细胞凋亡作用的机制 1988年Vaux *et al*^[2]将Bcl-2基因转入骨髓原始细胞使Bcl-2蛋白在细胞内高表达, 导致肿瘤的发生, 这些细胞的生存期明显延长, 但细胞的增殖率未见明显增加. 此后, Bosari *et al*^[3]发现作为大肠癌癌前病变的腺瘤中的多数发育不良细胞中Bcl-2呈阳性表达. 由此可见, Bcl-2主要是通过细胞凋亡来调节细胞死亡的.

Bcl-2基因通过编码Bcl-2蛋白发挥抗凋亡作用, 可能的机制为: (1)通过起一种抗氧化剂的作用或抑制氧自由基的产生而抑制细胞凋亡: 线粒体、内质网及核膜都是氧自由基产生的部位, Bcl-2在这些部位的分布提示其通过调节抗氧化途径来抑制细胞凋亡; (2)通过调节细胞内Ca²⁺水平和分布来抑制凋亡发生^[4-5]: 在细胞凋亡时DNA的消化需要相关的Ca²⁺依赖性核酸内切酶的参与, 而Bcl-2可阻断Ca²⁺从内质网释出, 使依赖于Ca²⁺核酸内切酶的活性降低, 从而阻断细胞凋亡; (3)Bcl-2与Bax蛋白结合成杂二聚体, 抑制Bax的促凋亡作用; (4)Bcl-2可与ras相关蛋白交联, 使ras活化, 通过影响细胞的信号传导而抑制凋亡; (5)通过Bcl-2蛋白阻断内源性核酸内切酶的DNA切割活性从而阻断细胞凋亡.

1.3 Bcl-2与大肠癌 Bcl-2抑制凋亡, 导致突变的基因积聚, 通过细胞不断的增殖, 从而形成肿瘤. Sinicrope *et al*^[6]研究结肠癌癌变过程中Bcl-2蛋白表达情况, 从癌前病变息肉到癌的发展过程中, Bcl-2阳性细胞数逐渐增多, 由此可见, Bcl-2基因的异常表达是结肠癌癌变过程中细胞凋亡受到抑制的一种潜在机制. 有研究表明, Bcl-2蛋白在结直肠腺瘤和腺癌中表达率明显增高, 在腺瘤中随着不典型增生程度加重, Bcl-2表达逐渐上升, 在腺瘤癌变时表达率下降^[7], 提示Bcl-2基因在结直肠癌发生的早期阶段起作用^[8], 可作为早期诊断结直肠腺瘤癌变的重要参考指标之一^[9]. 谭洁 *et al*^[10]研究发现, 大肠腺瘤及大肠癌Bcl-2表达明显增加, 在大肠腺瘤中最高, 大肠腺瘤和大肠癌之间有显著性差别, 在癌变时下降,

■背景资料

大肠癌是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一, 其发生是一个多阶段、多基因改变的过程, 不仅与癌基因的激活和抑癌基因的失活有关, 还与细胞凋亡过程被抑制有关, 抗细胞凋亡基因与大肠癌的发生关系密切, 在大肠癌的发生、发展、演变过程中起重要作用.

■应用要点

抗凋亡基因的研究对于提示大肠癌发病机制有重要意义,临床上有望为大肠癌的早期诊断提供新的标志物,可能有助于提供大肠癌基因治疗、免疫治疗新的靶点,为肿瘤指导治疗提供新的思路和方法。

说明在大肠腺瘤增殖中,细胞凋亡受抑制增加,一旦癌肿形成,则细胞凋亡有所增加。Lustosa *et al*^[11]研究表明, Bcl-2表达与癌肿TNM分期、复发、生存期及死亡率无关。也有研究表明, Bcl-2阳性表达率与大肠癌Duke's分期有关, A, B期高于C, D期,认为Bcl-2不仅在腺瘤形成且在恶变过程中有明显的促进作用^[12]。Meterissian *et al*^[13]研究显示在大肠癌Duke's B期时Bcl-2高表达,患者生存期较长,预后较好,由此可见, Bcl-2在评价大肠癌预后方面有一定的价值^[12-14]。

目前的研究表明, Bcl-2治疗研究的方向将是下调Bcl-2表达水平,降低其凋亡阈值,增加其对抗癌剂等诱导凋亡因素的敏感性。随着Bcl-2基因作用机制研究的不断深入,必将对大肠癌的早期诊断和综合治疗发挥重要的作用。

2 凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis, IAP)家族

IAP家族首先是由Crook *et al*^[15]在杆状病毒CpGV和OpMNPY中发现的,是一类独立于Bcl-2的抗凋亡蛋白。人的IAP家族共有8个成员: NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP, Survivin, Bruce, ILP-2, Livin, 其中Survivin和Livin在抗细胞凋亡方面发挥着重大的作用。

2.1 Survivin

2.1.1 Survivin的结构和分布 Survivin是IAP家族成员,1997年由Ambrosini *et al*^[16]利用效应细胞蛋白酶受体1(EPR-1)cDNA在人类基因组库的杂交筛选中将其分离出来,表达于细胞周期的G2/M期。Survivin定位于人染色体17q25,全长14.7 kb,含3个内含子和4个外显子,编码142个氨基酸。Survivin表达于人和鼠的胚胎发育组织,在正常成人组织中很少表达,可广泛表达于人类各种肿瘤组织。

2.1.2 Survivin抑制细胞凋亡的机制 Survivin主要通过结合于有丝分裂的纺锤体微管上,与caspase-3和caspase-7特异性地结合在一起并抑制caspase-3, caspase-7活性,从而维持有丝分裂的正常进行,抑制有丝分裂细胞的凋亡;其次, Survivin可与细胞周期调控因子CDK4结合,形成Survivin-CDK4复合物,使P21从CDK4的复合体中释放出来, P21进一步与线粒体caspase-3结合,抑制其活性,从而抑制凋亡^[17];此外, Survivin还可能通过抑制细胞色素C的释放和抑制caspase-8诱导的caspase活化而参与抗凋亡作用; Survivin也可借助分子中唯一的BIR结构直接同线粒体活化因子SMAC/DIABLO相互作用,间接

抑制caspase的级联反应,从而阻断其线粒体依赖的凋亡途径。Survivin蛋白也是细胞周期G2/M期的重要调节因子,其过量表达可能导致肿瘤细胞逃避细胞周期检测点,从而使肿瘤细胞逃避凋亡,实现异常增殖,导致肿瘤的形成。

2.1.3 Survivin与大肠癌 Kawasaki *et al*^[18]对结直肠从增生到癌变不同时期研究发现, Survivin阳性率逐渐升高,提示Survivin是大肠癌发生早期的必然事件,同时也发现Survivin基因表达与大肠癌的分化程度和临床分期关系密切。郑超球 *et al*^[19]应用免疫组化方法检测大肠癌发生过程中不同病理阶段(增生性息肉、腺瘤和腺癌)中Survivin的表达,发现在大多数大肠腺瘤和腺癌中Survivin过度表达,说明Survivin是在大肠癌发生早期(腺瘤)阶段即被激活,表达出大量的Survivin蛋白,提示Survivin过度表达是大肠上皮癌变过程的早期事件,可作为大肠癌发生早期阶段的分子标记物。郑长青 *et al*^[20-21]研究发现在大肠黏膜癌变过程(大肠正常黏膜→轻度非典型增生→重度非典型增生→腺癌)中Survivin表达阳性率逐渐升高,提示Survivin的表达发生在大肠腺癌恶性转化的早期。已有许多研究表明,在大肠癌组织中可以检测到Survivin蛋白的过量表达^[22-25]。宫向前 *et al*^[26]用反转录RT-PCR法检测大肠癌组织中Survivin基因mRNA表达,结果显示在大肠癌中表达明显高于正常组织,并与肿瘤的分期和远处转移有关。另有研究表明, Survivin表达与大肠癌病理分级、淋巴结转移和Duke's分期有关,并与大肠癌的恶性生物学行为相关^[27]。Survivin能够抑制细胞凋亡,还可以促进血管生成因子的表达,与肿瘤的发生和肿瘤的恶性表型有关。癌细胞由于Survivin蛋白对凋亡的抑制,细胞得以继续分裂,造成肿瘤邻近和远隔部位转移灶的形成,故Survivin蛋白的测定可作为临床判断肿瘤预后的指标之一^[28]。

2.2 Livin

2.2.1 Livin的结构和分布特点 Lin *et al*根据IAPs同源序列,用含有BIR序列的EST克隆,在人的胚肾cDNA文库中发现了该家族的新成员Livin。由于该基因在黑色素瘤细胞中高度表达^[29],所以也叫ML-IAP(melanoma inhibitor of apoptosis protein),他位于染色体20q13,全长46 kb,包含7个外显子和6个内含子。Livin在胎儿发育过程中多种组织内高表达,如胎儿的脑、胸腺、肾和肝^[30],在正常成人的大多数组织中(胎盘除外)无表达或低表达,在表皮、淋巴、脾脏和黑色素

细胞中表达很低, 主要分布于细胞核中, 在细胞质中以丝状形式存在。

2.2.2 Livin抗细胞凋亡机制 Living依靠完整的BIR结构域与caspase蛋白相结合, 抑制caspase蛋白凋亡的执行过程. caspase是TNF家族受体介导凋亡的信号转导通路的关键性物质, 一旦caspase活性下降, 细胞丧失了启动PCD的特性, 造成组织器官细胞数目失衡, 形成肿瘤. Livin还可能通过诱导NF- κ B, 激活Akt(丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)途径, Ca^{2+} 结合蛋白等方式发挥抗凋亡作用, 或者通过细胞的微管系统及纺锤体影响细胞周期而抑制细胞凋亡. Livin激活MAP(mitogen-activated protein)激酶JNK1和JNK2, 是Livin对抗TNF α 和ICE介导的细胞凋亡作用的一条重要途径. Livin的活性受到细胞内SMAC的调控^[31], SMAC是IAPs的拮抗剂, 在体内以抗凋亡信号转导为主的情况下, Livin大量表达, Livin通过与SMAC结合而中和SMAC的caspase活化蛋白的活性, 从而使caspase未能活化而发挥抗凋亡作用。

2.2.3 Livin与肿瘤 有研究表明, Livin高表达于黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、膀胱癌、白血病等组织中^[32-33]. Crnkovic-Mertens *et al*^[32]在哺乳动物肿瘤细胞中通过反义RNA来抑制Livin mRNA的表达, 结果发现肿瘤细胞对凋亡诱导剂的敏感性大为增加. Yagihashi *et al*^[33]研究提示大肠癌组织中存在Livin mRNA的过表达, 在大肠癌患者的血清中抗Livin抗体也显著增高. 这表明Livin与大肠癌的发生、发展及预后关系密切。

3 Bag-1(Bcl-2 athanogene-1)

3.1 Bag-1基因及其蛋白的结构与功能 Bag-1基因是Takayama *et al*^[34]于1995年应用重组人Bcl-2蛋白筛选胚胎cDNA表达基因库时发现的. 人的Bag-1基因位于染色体9p12, Bag-1基因表达的蛋白是由219个氨基酸残基组成的酸性蛋白, 含有丰富的谷氨酸. Bag-1是多功能蛋白, 可以和Hsp70、Hsc70、RAF-1、Bcl-2、核激素受体等相互作用, 调节细胞的生长与存活。

3.2 Bag-1的抗细胞凋亡机制 Bag-1蛋白与Bcl-2其他家族的成员无明显序列同源性, 因此Bag-1并非是Bcl-2家族中的一员, 他不仅有独立的抗凋亡的作用, 还可以上调Bcl-2功能与Bcl-2形成复合物增强细胞抗凋亡能力^[34-36]. Bag-1基因抗凋亡作用的机制可能有: (1)与Bcl-2蛋白结合, 两者协同抑制细胞凋亡; (2)通过凋亡刺激或细胞

活素抑制凋亡诱导; (3)与酪氨酸激酶生长因子受体、肝细胞生长因子受体(HGF)^[37]及来自血小板的生长因子受体(PDGF)^[38]相结合, 增强其功能; (4)与多种激素(雄激素、雌激素、糖皮质激素)受体等相互作用, 进而调整其生物学功能^[39]; (5)Bag-1蛋白还可以与RAF-1的丝氨酸/苏氨酸激酶、Hsp70/Hsc70等多种蛋白发生作用. 此外, Bag-1蛋白具有与细胞骨架蛋白作用, 促进肿瘤细胞迁移的功能。

3.3 Bag-1与大肠癌 Bag-1在正常黏膜组织中几乎不表达, 而在乳腺癌、前列腺癌、大肠癌中有阳性表达^[40-43], 表明Bag-1表达与肿瘤恶性转化密切相关^[44]. 有研究表明, Bag-1的高表达参与了大肠黏膜由良性向恶性转化的过程, Bag-1的高表达与肿瘤分化程度, Duke's分期和淋巴结转移有密切联系, 分化程度越低, Duke's分期越晚, 有淋巴结转移的患者Bag-1蛋白表达越强^[45]. Kikuchi *et al*^[46]实验表明在结肠癌中Bag-1在细胞核表达阳性的患者中, 伴有远处转移的比率要高于表达阴性的患者, 肿瘤细胞核中Bag-1过表达与临床预后不良有关^[46-47]。

4 NF- κ B(nuclear factor- κ B)

4.1 NF- κ B的组成及功能 核转录因子- κ B, 最初是由Sen *et al*^[48]于1986年在研究免疫球蛋白基因表达中发现的一种核蛋白因子, 他能与免疫球蛋白基因 κ 链基因的增强子 κ B序列特异性结合. 目前发现在哺乳动物中其家族共有5个成员, 包括P65(RelA), RelB, c-Rel, P50/P105(NF κ B1), P52/P100(NF κ B2), 通常由P50和P65组成异源二聚体. NF- κ B是一种普遍存在的转录调节因子, 静息状态下, NF- κ B与特异性抑制物I κ B结合, 以非活性形式存在于胞质中, 当细胞受到病毒感染、细胞因子、脂多糖、DNA损害剂、辐射等多种因素刺激后可被活化并与相应的病毒、细胞因子、黏附分子、受体等所调节的基因增强子区相结合, 从而启动基因的转录. NF- κ B激活形式可调节多种基因的表达, 主要有IL-1, IL-6, IL-8, VEGF, VCAM-1, TRAF, CIP1, MMP等, 这些基因的表达在肿瘤的发生、发展过程中起非常重要的作用。

4.2 NF- κ B的抗凋亡作用及机制 NF- κ B通过以下几个途径发挥其抗凋亡作用: (1)通过调控细胞因子而参与自身及其他细胞的凋亡; (2)通过诱导和上调抗凋亡基因抑制凋亡. Wang *et al*^[49]发现NF- κ B能够通过激活Bcl-2家族中的Al/Bfl-1

■同行评价

本文综述了抗细胞凋亡基因及其与大肠癌关系的研究进展, 主题明确, 层次分明, 具有一定的指导意义。

而抑制由TNF α 引起的细胞凋亡。NF- κ B诱导的A1抗凋亡的作用主要是阻止细胞色素C从线粒体中释放,而细胞色素C是caspase-3激活的促发因素,是凋亡调节中的关键环节;(3)通过诱导TRAF(TNF受体相关因子)和IAP抑制凋亡^[50]。TNFR与相应配体TNF结合后,在诱发细胞凋亡的同时激活细胞内的NF- κ B, NF- κ B抗凋亡的机制是作用于caspase-3和线粒体的上游。进一步研究表明, NF- κ B在基因和蛋白两个水平上控制了TRAF1, TRAF2, CIAP1, CIAP2的表达,从而抑制了caspase-8的活性, caspase-8是介导死亡受体相关信号必须的凋亡蛋白酶,他的活化是TNF诱发细胞凋亡最关键的一环;(4)通过上调IEX-1L的表达而在Fas和TNF诱导的细胞凋亡过程中发挥抗凋亡作用。

4.3 NF- κ B与大肠癌 目前有许多研究显示NF- κ B具有抗凋亡的作用。正常的大肠细胞中NF- κ B处于未激活的状态,不能被检测到,但在大肠癌细胞的细胞质和细胞核中均可能检测到。有研究表明, NF- κ B在大肠癌中的表达水平明显高于腺瘤和正常组织^[51]。还有研究显示,在大肠癌组织中NF- κ B过表达,明显高于正常大肠组织,并且在肿瘤浸润的边缘其表达更高,这暗示可能与肿瘤的浸润转移有关^[52]。杨晓东 *et al*^[53]应用免疫组化法测定37例大肠癌组织中NF- κ B P65的表达,结果显示在大肠癌组织中NF- κ B高表达,为正常黏膜组织的1.3倍,并且与大肠癌的远处转移相关。朱惠明 *et al*^[54]应用免疫组化法检测72例大肠癌NF- κ B表达情况,发现大肠癌NF- κ B阳性表达率显著高于正常结肠黏膜,并且他的表达和淋巴结转移及Duke's分期密切相关,而和肿瘤大小、浸润深度及组织学分级无关。应用NF- κ B的特异性抑制剂后肿瘤的凋亡明显增加,更说明了NF- κ B能够抑制大肠癌细胞的凋亡。

总之,抗细胞凋亡基因在大肠癌的发生、发展和演变过程中起着重要的作用,目前人们已经对其进行了广泛的研究,但还存在很多尚未阐明的问题,相信随着对抗细胞凋亡基因的进一步深入研究,其将会在大肠癌的诊断和治疗方面发挥更大的作用。

5 参考文献

- 1 Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097-1099
- 2 Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with

- c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335: 440-442
- 3 Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee AK, Murray JJ, Coggi G, Viale G. bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995; 26: 534-540
- 4 Distelhorst CW, Lam M, McCormick TS. Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca²⁺ pool depletion. *Oncogene* 1996; 12: 2051-2055
- 5 Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J* 2001; 20: 2690-2701
- 6 Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 237-241
- 7 徐钢, 杨红, 文锦, 陈和平, 刘锦平. 结直肠腺瘤细胞凋亡和增殖与bcl-2和P53蛋白表达的关系. *中国胃肠外科杂志* 2000; 3: 225-227
- 8 Dursun A, Poyraz A, Suer O, Sezer C, Akyol G. Expression of Bcl-2 and c-ErbB-2 in colorectal neoplasia. *Pathol Oncol Res* 2001; 7: 24-27
- 9 王慧萍, 姚洪田, 丁伟, 严丽萍, 余心如. 结直肠腺瘤及癌变组织中增殖基因和细胞凋亡调控基因的表达. *中华病理学杂志* 2000; 29: 405-408
- 10 谭浩, 沈志祥, 陈水清, 耿伟. 凋亡相关基因caspase-9、Bcl-2在大肠腺瘤和大肠癌中的表达及意义. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004; 13: 639-641
- 11 Lustosa SA, Logullo A, Artigiani R, Saad SS, Goldenberg A, Matos D. Analysis of the correlation between p53 and bcl-2 expression with staging and prognosis of the colorectal adenocarcinoma. *Acta Cir Bras* 2005; 20: 353-357
- 12 欧阳淼, 张桂英, 徐美华. 大肠黏膜癌变过程中PGE₂、Bcl-2及Bax表达相关性. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1305-1309
- 13 Meterissian SH, Kontogiannia M, Al-Sowaidi M, Linjawi A, Halwani F, Jamison B, Edwardes M. Bcl-2 is a useful prognostic marker in Dukes' B colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 533-537
- 14 Zhao DP, Ding XW, Peng JP, Zheng YX, Zhang SZ. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6: 1163-1169
- 15 Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993; 67: 2168-2174
- 16 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- 17 Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19: 1346-1353
- 18 Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001; 91: 2026-2032
- 19 郑超球, 张阳德, 彭健. 大肠腺瘤-癌序列中抗凋亡基因Survivin的表达. *中国现代医学杂志* 2003; 13: 12-14
- 20 郑长青, 林连捷, 马颖, 姜卫国, 马铁, 胡刚正. 大肠黏膜癌变过程中Survivin蛋白的表达. *世界华人消化杂志*

- 志 2002; 10: 1052-1053
- 21 Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 974-977
- 22 张卫国, 吴清明, 王小虎, 谢国建, 于皆平. Survivin基因在大肠癌中的表达与生物学特性的关系. *胃肠病学和肝病杂志* 2003; 12: 547-548
- 23 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650
- 24 金玉, 林连捷, 郑长青. 大肠癌组织中Survivin和Cox-2表达的相关性. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1218-1220
- 25 肖军, 邓长生, 朱尤庆. 大肠腺癌组织Survivin蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 540-543
- 26 宫向前, 李玉华, 丁印鲁, 徐克森, 寿楠海. Survivin基因在人大肠癌中的表达及临床意义. *中国现代普通外科进展* 2004; 7: 226-228
- 27 Tan HY, Liu J, Wu SM, Luo HS. Expression of a novel apoptosis inhibitor-survivin in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4689-4692
- 28 Chen WC, Liu Q, Fu JX, Kang SY. Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2886-2889
- 29 Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 2000; 10: 1359-1366
- 30 Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238-3246
- 31 Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJ, Das K, Eckelman BP, Shin H, Elliott LO, Kadkhodayan S, Deshayes K, Salvesen GS, Fairbrother WJ. Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochem J* 2005; 385: 11-20
- 32 Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene* 2003; 22: 8330-8336
- 33 Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, Torigoe T, Sato N, Hirata K, Watanabe N. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1206-1208
- 34 Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995; 80: 279-284
- 35 Tang SC. BAG-1, an anti-apoptotic tumour marker. *IUBMB Life* 2002; 53: 99-105
- 36 Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, Brimmell M, Packham G. BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1603: 83-98
- 37 Bardelli A, Longati P, Alberio D, Goruppi S, Schneider C, Ponzetto C, Comoglio PM. HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J* 1996; 15: 6205-6212
- 38 Lin J, Hutchinson L, Gaston SM, Raab G, Freeman MR. BAG-1 is a novel cytoplasmic binding partner of the membrane form of heparin-binding EGF-like growth factor: a unique role for proHB-EGF in cell survival regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 30127-30132
- 39 Schmidt U, Wozniak GM, Rosenhagen MC, Young JC, Hartl FU, Holsboer F, Rein T. Essential role of the unusual DNA-binding motif of BAG-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2003; 278: 4926-4931
- 40 Turner BC, Krajewski S, Krajewska M, Takayama S, Gumbs AA, Carter D, Rebeck TR, Haffty BG, Reed JC. BAG-1: a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 992-1000
- 41 Xiong J, Chen J, Chernenko G, Beck J, Liu H, Pater A, Tang SC. Antisense BAG-1 sensitizes HeLa cells to apoptosis by multiple pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 585-591
- 42 Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Fumoto S, Uchida Y, Yokoyama S, Gabbert HE, Muller W. Nuclear BAG-1 expression is a biomarker of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2003; 16: 107-111
- 43 Townsend PA, Dublin E, Hart IR, Kao RH, Hanby AM, Cutress RI, Poulsom R, Ryder K, Barnes DM, Packham G. BAG-1 expression in human breast cancer: interrelationship between BAG-1 RNA, protein, HSC70 expression and clinico-pathological data. *J Pathol* 2002; 197: 51-59
- 44 Cutress RI, Townsend PA, Sharp A, Maisson A, Wood L, Lee R, Brimmell M, Mullee MA, Johnson PW, Royle GT, Bateman AC, Packham G. The nuclear BAG-1 isoform, BAG-1L, enhances oestrogen-dependent transcription. *Oncogene* 2003; 22: 4973-4982
- 45 金军, 袁宏银, 熊斌. bag-1、bcl-2在大肠腺瘤和大肠癌中的表达及意义. *肿瘤防治研究* 2005; 32: 284-286
- 46 Kikuchi R, Noguchi T, Takeno S, Funada Y, Moriyama H, Uchida Y. Nuclear BAG-1 expression reflects malignant potential in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 2002; 87: 1136-1139
- 47 王国斌, 孙念峰, 黄庆先. 抗凋亡基因bag-1和bcl-2在结肠癌组织中的表达及其相互关系. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 226-227
- 48 Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716
- 49 Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5923-5929
- 50 Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683
- 51 Yu LL, Yu HG, Yu JP, Luo HS, Xu XM, Li JH. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3255-3260
- 52 Evertsson S, Sun XF. Protein expression of NF-kappaB in human colorectal adenocarcinoma. *Int J Mol Med* 2002; 10: 547-550
- 53 杨晓东, 王杉, 于永祥, 梁斌, 姜可伟, 曲军. 细胞核因子NF- κ B在人大肠癌组织中的表达及意义. *中华普通外科杂志* 2000; 15: 367-369
- 54 朱惠明, 王立生, 黄勋, 罗伟香, 师瑞月, 苏学劲, 王晓玫. 大肠癌核因子- κ B和环氧合酶2的表达及其与肿瘤血管形成的关系. *肿瘤研究与临床* 2004; 16: 367-369

电编 张敏 编辑 张焕兰

血管紧张素 II 拮抗剂在大鼠应激性溃疡中的作用

窦勇鹰, 谢立群, 李俊美, 华建平, 海鸥

■背景资料

患者在遭受各类重伤(包括大手术)、重病和其他应激情况下,特别是在并发休克、出血、感染或肾、肺等脏器功能严重受损时,均易患应激性溃疡,出血率及病死率较高。质子泵抑制剂可降低出血率,但并不降低病死率,因此,研究者致力于寻求一种可降低应激性溃疡出血率和病死率的药物。

窦勇鹰, 谢立群, 海鸥, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科 天津市 300162

李俊美, 华建平, 天津市第一中心医院消化内科 天津市 300192

通讯作者: 谢立群, 300162, 天津市河东区, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科. xieliquan66@hotmail.com

电话: 022-60578765

收稿日期: 2006-07-13 接受日期: 2006-08-10

Role of angiotensin II antagonist in the formation of stress ulcer in rats

Yong-Ying Dou, Li-Qun Xie, Jun-Mei Li, Jian-Ping Hua, Ou Hai

Yong-Ying Dou, Li-Qun Xie, Ou Hai, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Jun-Mei Li, Jian-Ping Hua, Department of Gastroenterology, the First Central Hospital of Tianjin Municipality, Tianjin 300192, China

Correspondence to: Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, He Dong district, Tianjin 300162, China. xieliquan66@hotmail.com

Received: 2006-07-13 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To investigate the role of angiotensins II antagonist in the occurrence and development of stress ulcer in rats.

METHODS: The ulcer index (UI) was observed after water immersion-restraint stress (WRS), and the levels of thromboxane B₂ (TXB₂) and 6-keto-prostaglandin F₁ alpha (6-K) were measured by radioimmunoassay. The gastric mucosal pH value was detected and histopathological changes were observed.

RESULTS: In comparison with those in the negative controls, the gastric mucosal pH value and 6-K level were significantly increased in the antagonist group (4.82 ± 0.31 vs 4.53 ± 0.11 , $P = 0.026$; 974.95 ± 109.11 ng/L vs 654.50 ± 221.31 ng/L, $P < 0.01$), but the TXB₂ level and UI were significant decreased (48.53 ± 8.26 ng/L vs 98.18 ± 39.24 ng/L, $P < 0.01$; 36.13 ± 6.49 vs

69.00 ± 33.27 , $P < 0.01$). Meanwhile, thrombosis was also decreased in the antagonist group. The level of 6-K was significantly different between the antagonist and positive control group (974.95 ± 109.11 ng/L vs 737.61 ± 96.10 ng/L, $P < 0.05$), but the pH value, UI and TXB₂ level had no marked difference between the two groups.

CONCLUSION: Pretreatment of angiotensins II antagonists can protect gastric mucosa by dilatation of blood vessel and increase of blood flow, and the mechanism may be associated with the inhibition of corticosterone production and prostaglandin E₂ secretion.

Key Words: Angiotensins II antagonist; Stress ulcer; Gastric mucosa; Thromboxane B₂; 6-ketoprostaglandin F₁ alpha; Blood vessel

Dou YY, Xie LQ, Li JM, Hua JP, Hai O. Role of angiotensin II antagonist in the formation of stress ulcer in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3224-3227

摘要

目的: 探讨血管紧张素 II 拮抗剂在大鼠应激性溃疡(SU)中的作用。

方法: 水浸束缚应激后, 肉眼计算胃黏膜溃疡指数(UI); 取动脉血和胃液做血气分析计算胃黏膜内pH值; 采用放射免疫方法检测血栓素B₂(TXB₂)和6-酮前列腺素F₁α(6-K); 观察胃组织病理形态学变化。

结果: 管紧张素 II 拮抗剂组与阴性对照组比较, pH值、6-K水平显著升高(4.82 ± 0.31 vs 4.53 ± 0.11 , $P = 0.026$; 974.95 ± 109.11 ng/L vs 654.50 ± 221.31 ng/L, $P < 0.01$), 而TXB₂, UI显著降低(48.53 ± 8.26 ng/L vs 98.18 ± 39.24 ng/L, $P < 0.01$; 36.13 ± 6.49 vs 69.00 ± 33.27 , $P < 0.01$)。病理形态学观察, 血栓形成减少。血管紧张素 II 拮抗剂组与奥美拉唑组比较, 除6-K(974.95 ± 109.11 ng/L vs 737.61 ± 96.10 ng/L, $P < 0.05$)外, 其他数据无统计学差异。

结论: 血管紧张素 II 拮抗剂通过舒张血管, 增加胃黏膜血流量起到保护胃黏膜的作用, 其机

制可能是减轻肾上腺髓质对应激的反应, 抑制由应激引起的儿茶酚胺的合成和释放, 促进前列腺素的分泌。

关键词: 血管紧张素; 胃黏膜; 血管; 血栓素 B_2 ; 6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$; 应激性溃疡

窦勇鹰, 谢立群, 李俊美, 华建平, 海鸥. 血管紧张素 II 拮抗剂在大鼠应激性溃疡中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3224-3227

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3224.asp>

0 引言

应激性溃疡(SU)的发病机制非常复杂, 目前尚未完全明了. 目前认为SU的发生涉及机体神经内分泌失调、胃黏膜保护功能削弱及胃黏膜损伤因素作用增强等诸多方面, 主要因素为胃黏膜血流量减少. 阻断大脑内血管紧张素 II AT_2 受体不仅可造成血压下降, 还可对大脑内血管紧张素 II AT_1 受体产生拮抗作用, 减少交感神经-肾上腺髓质系统和激素对应激的反应, 并阻止应激诱导的胃黏膜损伤, 血管紧张素 II AT_1 受体拮抗剂是新近发现的治疗应激相关性疾病的药物^[1]. 本实验研究用血管紧张素 II 拮抗剂和奥美拉唑预防大鼠SU检测其效果是否有区别. 为SU发生的神经内分泌学说提供新的理论依据, 为胃黏膜损伤的治疗提供重要治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 采用健康成年Wistar δ 大鼠, 购自中国人民解放军医学科学院实验动物中心, 清洁级, 180-200 g左右, 普通饲料喂养, 自由饮水. 坎地沙坦为天津武田药品有限公司产品, 6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-K)和血栓素 B_2 (TXB_2)试剂盒购自南京建成生物工程研究所. 血气分析仪: Rapidpoint 400, Bayer; γ 放射免疫计数仪: 中国科学技术大学科技实业总公司; 高速冷冻离心机: TGL-16G型, 上海安亭科学仪器厂。

1.2 方法 大鼠禁食24 h, 禁水2 h, 将大鼠四肢束缚于自制鼠板上, 限制其活动, 将其直立置于 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 水桶中, 使水平面与大鼠的胸骨剑突水平平齐. 水浸束缚应激后, 给予大鼠3 mL生理盐水灌胃, 20 min后, 给予大鼠40 g/L戊巴比妥钠9 mL/kg腹腔麻醉, 约10 min后, 仰卧固定, 常规剪毛、消毒、铺敷, 打开腹腔, 暴露胃, 双结扎法完整取胃, 用注射器取胃液, 于血气分析仪上测量胃液内 P_{CO_2} . 沿胃大弯剪开, 然后用生理盐

水冲洗胃腔内及黏膜面上的血迹, 将胃平铺于冰袋上, 观察溃疡、糜烂出血点发生的部位、大小、形状并计算黏膜损伤指数, 按Guth标准评估胃黏膜损伤溃疡指数(ulcer index, UI)并累计积分, 斑点、糜烂为1分, 糜烂长度 <1 mm为2分, 1-2 mm为3分, 2-3 mm为4分, >4 mm为5分. 在溃疡或糜烂中心取黏膜组织2块($0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$), 置入100 g/L福尔马林液中, 固定48 h、常规脱水包埋, $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚切片, HE染色, 组织病理学观察. 开腹, 直视下以肝素润管的5 mL注射器于腹主动脉取血3 mL, 立即做血气分析, 将剩余动脉血 37°C 温育30 min, 后以3500 r/min离心10 min, 半径3 cm, 取上清, EP管分装. 标记后置 -80°C 保存, 严格按照试剂盒进行操作. 应用放射免疫方法测定 TXB_2 和6-K.

统计学处理 实验结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 统计学分析用SPSS 11.5软件进行分析, 均数之间的比较用LSD检验。

2 结果

不应激组大鼠胃黏膜色泽红润, 未见损伤性改变. 阴性对照组大鼠胃腔内可见少量血性积液, 黏膜面附有较多血痂, 生理盐水冲洗后, 见黏膜充血、水肿明显, 腺胃部弥漫点线状出血灶, 损伤主要位于黏膜皱襞处. 奥美拉唑组和血管紧张素 II 拮抗剂组胃腔内无血性积液, 黏膜面附有少量血痂, 生理盐水冲洗后, 黏膜充血、水肿不明显, 糜烂、出血点较上述两组减少, UI下降. 各组胃黏膜溃疡指数UI及相互关系见表1.

2.1 胃黏膜组织病理学变化 光镜下可见阴性对照组大鼠黏膜表层上皮细胞受损、脱落, 可见黏膜中断现象, 腺体结构紊乱, 间隙扩大, 其间可见炎性细胞浸润, 黏膜层、黏膜下层明显充血、水肿. 可见出血、溃疡以及黏膜糜烂, 血管内有血栓形成. 血管紧张素 II 拮抗剂组和奥美拉唑组黏膜充血、水肿程度较阴性对照组轻, 血管内聚集红细胞(图1).

2.2 血管紧张素 II 拮抗剂组与阴性对照组比较 $p\text{Hi}$: 血管紧张素 II 拮抗剂组(4.81 ± 0.31)比阴性对照组(4.53 ± 0.11)明显升高($P < 0.05$). TXB_2 : 血管紧张素 II 拮抗剂组($352.48 \pm 14.30\text{ ng/L}$)比阴性对照组($378.89 \pm 15.10\text{ ng/L}$)升高($P < 0.05$). 6-K: 血管紧张素 II 拮抗剂组($974.95 \pm 109.11\text{ ng/L}$)比阴性对照组($654.50 \pm 221.31\text{ ng/L}$)明显降低($P < 0.05$). UI: 血管紧张素 II 拮抗剂组(36.13 ± 6.49)比阴性对照组(69.00 ± 33.27)明

■ 研究前沿

血管紧张素 II 受体拮抗剂是近年来国际上研究的热点之一, 其在血压调节过程中起到重要作用. 最新的研究也发现, 血管紧张素 II AT_1 受体拮抗剂可能是通过减轻肾上腺髓质对应激的反应, 抑制由应激引起的儿茶酚胺的合成和释放和促进前列腺素的分泌, 舒张血管, 增加胃黏膜血流量来预防应激性溃疡。

■应用要点

本实验研究用血管紧张素Ⅱ拮抗剂和奥美拉唑预防大鼠SU检测其效果是否有区别. 为SU发生的神经内分泌学说提供新的理论依据, 为胃黏膜损伤的治疗提供重要治疗靶点.

表 1 各组大鼠UI, pHi, TXB₂, 6-K数值比较 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	UI	pHi	TXB ₂ (ng/L)	6-K (ng/L)
阴性对照组	69.00 \pm 33.27	4.53 \pm 0.11	378.89 \pm 15.10	654.50 \pm 221.31
血管紧张素Ⅱ拮抗剂组	36.13 \pm 6.49 ^a	4.81 \pm 0.31 ^a	352.48 \pm 14.30 ^a	974.95 \pm 109.11 ^a
奥美拉唑组	26.88 \pm 14.13 ^a	4.87 \pm 0.32 ^a	359.41 \pm 16.49 ^a	737.61 \pm 96.10 ^c
不应激组		4.94 \pm 0.16 ^a	278.86 \pm 12.38 ^{ac}	969.38 \pm 82.97 ^a

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs 血管紧张素Ⅱ拮抗剂组.

显降低($P < 0.05$). 病理形态学观察, 血栓形成减少.

3 讨论

血管紧张素Ⅱ受体存在于外周器官和大脑, 血管紧张素Ⅱ可调节大脑功能, 如: 自主神经系统、激素、大脑发育、感觉过程和大脑内血流量的分布. 血管紧张素Ⅱ受体有AT₁和AT₂受体. AT₁受体可调节自主神经系统和内分泌系统和情绪、感觉和运动功能. AT₂受体广泛地分布于大脑区域内, 并和感觉、运动功能有关. 应激可增加血管紧张肽原酶和血管紧张素Ⅱ在循环和大脑中的分泌^[2], 血管紧张素Ⅱ可通过血液循环到达在肾上腺和垂体的受体以及血脑屏障, 并通过增加室旁核促皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)的合成激活室旁核内AT₁受体, CRH释放入下丘脑后, 可增加垂体内促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)含量. 应激时, 由垂体合成和释放的血管紧张素Ⅱ可增强ACTH分泌, 并上调室旁核内AT₁受体, 从而促进CRH生成、ACTH释放、肾上腺皮质激素分泌. 血管紧张素Ⅱ对肾上腺可产生直接的作用, 在急性应激期间, 可刺激醛固酮分泌儿茶酚胺的释放, 应激也可影响AT₁和AT₂受体在肾上腺小球带和髓质的表达. 阻断大脑内血管紧张素ⅡAT₂受体不仅可造成血压下降, 还可对大脑内AT₁受体产生拮抗作用, 减弱交感神经-肾上腺髓质系统和激素对应激的反应, 并阻止应激诱导的胃黏膜损伤. 在形成应激性胃溃疡机制中, 胃黏膜血流量的减少和自由基的形成是主要因素^[3], 维持胃黏膜血流量对预防应激性胃溃疡起到重要作用. 血管紧张素Ⅱ通过激活其AT₁受体不仅调节动脉^[4]和脑血管^[5]阻力, 也可压缩胃脉管系统. 动物实验表明, 给予血管紧张素ⅡAT₁受体拮抗剂-坎地沙坦后可显著减少有冷束缚刺激引起的SU^[6]. 目前, 国内外对预处理血管紧张

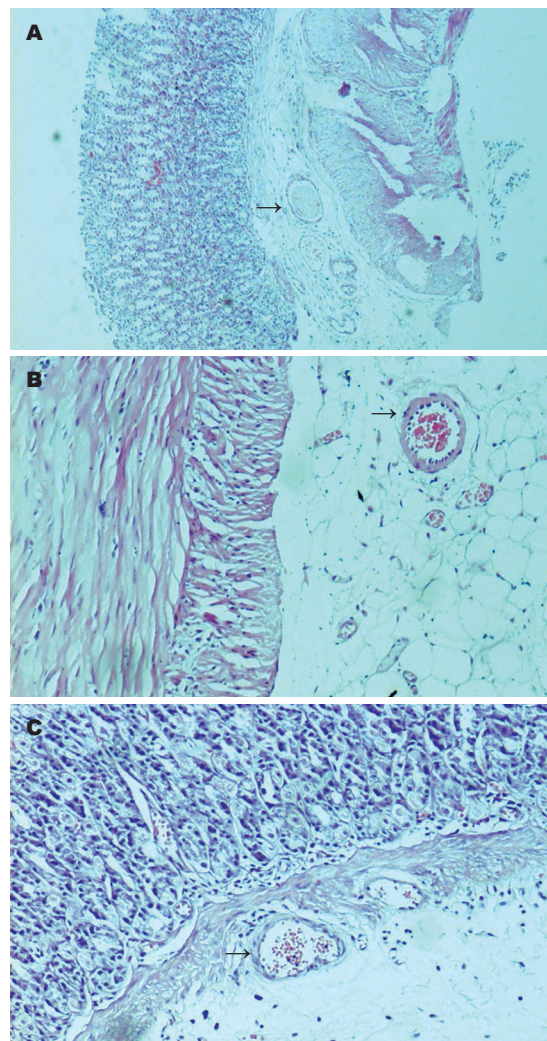


图 1 各组大鼠组织病理学特点. A: 阴性对照组大鼠血管内血栓形成($\times 40$); B: 血管紧张素Ⅱ拮抗剂组大鼠血管内红细胞聚集($\times 100$); C: 奥美拉唑组大鼠血管内红细胞聚集($\times 100$).

素ⅡAT₁受体拮抗剂后, 与预处理奥美拉唑有区别, 以及预处理血管紧张素ⅡAT₁受体拮抗剂后, 体内舒张和收缩血管因子、保护胃黏膜屏障指标有无变化研究甚少. 本实验通过预处理血管紧张素ⅡAT₁受体拮抗剂后, 观察其舒张、收缩血管因子, 血栓形成因素和黏膜屏障等指

标, 和奥美拉唑组、阴性对照组进行比较. 观察血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂是否仍具有预防SU的作用.

前列环素(prostacycline, PGI₂)是由血管壁内皮细胞合成和释放的一种抗血小板聚集和舒张血管的生物活性物质. 生物半衰期约3 min, 迅速代谢生成6-Keto-PGF₁α, 在正常生理状态下血浆或组织中血栓素A₂(thromboxane A₂, TXA₂)和PGI₂平衡, 失调是造成血小板凝集, 血管痉挛收缩或血栓形成的原因之一. 由于TXA₂和PGI₂的不稳定性, 目前难以直接测定, 故国内外均以测定TXB₂和6-Keto-PGF₁α作为判断其浓度的指标. 本实验证实, 给予血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂后, 6-K明显升高, TXB₂明显降低, 表明血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂有明显的舒张血管作用. 血管紧张素 II 可能通过激活磷脂酶A₂增加前列腺素合成和释放, 从而起到舒张血管, 增加胃黏膜血流量的作用. 其减少血栓素的分泌可能和抑制促炎性反应有关.

pHi值作为研究胃肠功能变化的主要检测指标^[7], 能够敏感反映胃肠黏膜缺氧情况, 较其他指标能更早提示病情的变化. 机体在维持其内环境和行使功能时所需要的能量直接来源于ATP的分解即ATP→ADP+Pi+H⁺. 当机体遭受创伤、失血感染等因素后, 组织细胞氧供缺乏, 可导致ATP的合成小于其分解而产生多余的H⁺, 大量的H⁺存在于胃黏膜内, 从而引起pHi下降. 组织细胞缺氧越严重, pHi值下降越显著. 因此, pHi值提供了部分器官组织氧合与否的判定依据. 我们的实验结果显示, 阴性对照组pHi值明显下降, 可能是由于在SU过程中, 大鼠胃黏膜动脉收缩, 造成缺血缺氧, 导致ATP的合成小于其分解而产生多余的H⁺, 血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂组pHi较阴性对照组明显升高, 和奥美拉唑组比较无统计学差异, 表明, 血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂同奥美拉唑都具有改善机体氧供缺乏的作用. 胃组织病理学观察: 血管紧张素 II AT₁

受体拮抗剂组大鼠血管管径增长, 管壁内有红细胞聚集, 但没有血栓形成, 也说明血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂有扩张血管的作用. 奥美拉唑是经典的质子泵抑制剂, 通过抑制胃酸的生成保护胃黏膜屏障. 在实验中发现, 奥美拉唑也可以减少黏液的耗损, 可能是因为黏液层厚度和H⁺浓度有关. 胃组织病理学观察, 奥美拉唑组大鼠血管内有红细胞聚集, 但没有血栓形成, 而阴性对照组血管内则有血栓形成. 通过肉眼观察Guth评分, 也可以证实血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂具有和奥美拉唑一样的预防SU的作用.

血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂可能是通过减轻肾上腺髓质对应激的反应, 抑制由应激引起的儿茶酚胺的合成和释放和促进前列腺素的分泌, 舒张血管, 增加胃黏膜血流量来预防SU. 血管紧张素 II 可能成为胃黏膜损伤的治疗一个治疗靶点.

4 参考文献

- 1 Armando I, Seltzer A, Bregonzio C, Saavedra JM. Stress and angiotensin II: novel therapeutic opportunities. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; 2: 413-419
- 2 Peng JF, Phillips MI. Opposite regulation of brain angiotensin type 1 and type 2 receptors in cold-induced hypertension. *Regul Pept* 2001; 97: 91-102
- 3 Tuncel N, Tuncel M, Aboul-Enein HY. Effects of the vasoactive intestinal peptide on stress-induced mucosal ulcers and modulation of methylation of histamine in gastric tissue of the rats. *Farmacology* 2003; 58: 449-454
- 4 Levy BI. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation* 2004; 109: 8-13
- 5 Saavedra JM. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 485-512
- 6 Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. Angiotensin II AT₁ receptor blockade prevents gastric ulcers during cold-restraint stress. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1018: 351-355
- 7 李建忠, 余飞飞, 岳茂兴. 胃肠功能障碍患者胃黏膜内pHi值的监测方法和意义. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 983-984

■同行评价

关于血管紧张素 II 拮抗剂在大鼠应激性溃疡中的作用已经有报道, 对预处理血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂后, 与预处理奥美拉唑有无区别, 以及预处理血管紧张素 II AT₁受体拮抗剂后, 体内舒张和收缩血管因子、保护胃黏膜屏障指标有无变化的研究还不多, 因此具有一定学术意义.

电编 张敏 编辑 张焕兰

B和C基因型HBV核心蛋白促细胞凋亡的比较

温志立, 谭德明, 成军, 杨永峰, 刘国珍, 刘洪波

■背景资料

近几年, HBV的基因型逐渐成为国内外研究热点. 研究内容主要为四个方面: 分型方法的建立、基因型的地理分布、基因型与临床的关系、发病机制的研究.

温志立, 南昌市第一医院消化科 江西省南昌市 330008
谭德明, 刘国珍, 刘洪波, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
杨永峰, 东南大学南京市第二医院肝病科 江苏省南京市 210003
通讯作者: 温志立, 330008, 江西省南昌市象山北路128号, 南昌市第一医院消化科. wenzhili@126.com
收稿日期: 2006-08-27 接受日期: 2006-09-20

Comparison of effect on hepatocellular apoptosis between core proteins of hepatitis B virus genotype B and C

Zhi-Li Wen, De-Ming Tan, Jun Cheng,
Yong-Feng Yang, Guo-Zhen Liu, Hong-Bo Liu

Zhi-Li Wen, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Nanchang City, Nanchang 330008, Jiangxi Province, China
De-Ming Tan, Guo-Zhen Liu, Hong-Bo Liu, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Yong-Feng Yang, Department of Liver Disease, the Second Hospital of Dongnan University, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Zhi-Li Wen, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Nanchang City, 128 Xiangshan North Road, Nanchang 330008, Jiangxi Province, China. wenzhili@126.com
Received: 2006-08-27 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To compare the proapoptosis effect of hepatitis B virus (HBV) genotype B and C core proteins on liver cells, and explore the pathogenesis of HBV infection with different genotypes.

METHODS: Four serum samples infected by HBV (2 for type B and C, respectively) were used to amplify HBV core fragment using polymerase chain reaction (PCR). After recombination, cloning, and subcloning, four eucaryotic plasmids with different genotypes and clinical phenotypes were obtained. Then the plasmids were transfected into hepatocellular carcinoma

cell line HepG2, and MTT assay and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of HepG2 cells.

RESULTS: All the four recombinant eucaryotic plasmids were constructed successfully, and HBV core protein expression was confirmed by internal reference for transfection. The proliferation of HepG2 cells was not significantly different between the four plasmids, but the apoptosis rate in C-type (C₂) group was markedly higher than that in B-type (B₁) group ($8.8\% \pm 2.0\%$ vs $6.4\% \pm 0.8\%$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: C-type HBV can induce more severe cell apoptosis than B-genotype HBV.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Core protein; Apoptosis

Wen ZL, Tan DM, Cheng J, Yang YF, Liu GZ, Liu HB. Comparison of effect on hepatocellular apoptosis between core proteins of hepatitis B virus genotype B and C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3228-3232

摘要

目的: 比较B, C两种基因型HBV核心蛋白在促进肝细胞凋亡方面的差异, 以期初步阐述HBV基因型与临床关系的发病机制.

方法: 用PCR扩增4份(B和C基因型各2份)HBV-C区DNA片段, 通过基因重组、分子克隆和亚克隆等方法, 合成4份不同基因型和临床表型的重组真核表达质粒. 鉴定后, 将他们分别转染至肝癌细胞系HepG2中, 采用MTT法和流式细胞仪测定转染细胞的细胞增殖率和细胞凋亡率等指标.

结果: 4份重组真核表达质粒均构建成功, 转染至HepG2后通过内参照EGFP可鉴定出均有HBV-C蛋白表达. 流式细胞仪提示C型/重型HBV转染组的细胞凋亡率显著高于B型/携带HBV转染组($8.8\% \pm 2.0\%$ vs $6.4\% \pm 0.8\%$, $P < 0.05$).

结论: C型HBV核心蛋白较B型HBV更能促进

肝细胞凋亡, HBV基因型与临床相关性可能与此有关。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 核心蛋白; 细胞凋亡

温志立, 谭德明, 成军, 杨永峰, 刘国珍, 刘洪波. B和C基因型HBV核心蛋白促细胞凋亡的比较. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3228-3232
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3228.asp>

0 引言

目前研究发现, HBV的基因型与肝炎的临床表现有一定关系. 大量研究表明C型HBV所致肝炎较B型HBV为重^[1-8]. 但其原因不是很清楚, 两者基因序列的差异导致了何种致病机制的改变不得而知, 至今尚未见有关报道. 众所周知, HBV致病的主要机制除诱发宿主自身免疫损伤外, 还可通过促进肝细胞的凋亡来加重乙肝病情变化^[9-13]. 本研究首先从细胞凋亡途径入手, 检测两种基因型HBV的核心蛋白和表面蛋白对细胞凋亡诱导的差异, 然后检测两者在促进体外淋巴细胞免疫反应的差异, 从多个致病因素方面比较两种基因型HBV的差异, 以期找出HBV基因型与临床关系的发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 从GenBank中找出HBV全基因序列 (AY206391), 根据其核心区序列(nt1816-2454)设计引物, 能扩增出全长HBV-C序列. 在两条引物前面分别设计EcoR I和Kpn I酶切位点, 并在上游引物PC1的EcoR I酶切位点与引物中编码序列之间加入一个A碱基, 以便HBV-C在载体pEGFP-C1表达绿色荧光融合蛋白时不出现移位. 引物经计算机分析软件Primer Premier 5.0检测自身不形成“发夹”结构或引物间不形成引物二聚体. 引物由大连宝生物公司合成, 预计扩增片段长度为639 bp. 上游引物(PC1): 5'-GAATTCATGCAACTTTT TCACCTCTG-3', 下游引物(PC2): 5'-GGTACCCTAACATTGAGGCTCCCG-3'. DNA提纯试剂盒(上海申友生物公司); Taq DNA聚合酶、dNTP(日本TaKaRa公司); PCR产物的凝胶纯化回收试剂盒和小量质粒提纯试剂盒均为日本TaKaRa公司产品; 大肠杆菌JM109; Amp(+) LB培养基和Amp(+)培养平板中氨苄青霉素(华北制药厂)浓度均为100 mg/L, Kan(+) LB培养基Kan(+)培养平板中卡那霉素(Sigma)浓度均为50 mg/L; 限制性内切酶EcoR

I和Kpn I(日本TaKaRa公司); T4 DNA连接酶(MBI); T-载体pMD18-T Vector为日本TaKaRa公司产品, 长2692 bp, 含有1个多克隆位点, 还包括抗氨苄青霉素和LacZ基因; 真核表达质粒pEGFP-C1(Gibco)全长4731 bp, 含有CMV, SV40启动子、1个多克隆位点(包括EcoR I和Kpn I)及抗卡那霉素(Kan)基因, 并含有EGFP基因(798 bp), EGFP基因能表达融合绿色荧光蛋白, 故pEGFP-C1可作为转染内参照. EPS-300型稳压稳流电泳仪和GIS凝胶电脑全自动图像处理仪为上海天能科技有限公司产品; DNA全自动测序仪ABI377型(美国PE公司); 紫外分光光度仪(美国Beckman公司产品); IX70倒置显微镜、IX70荧光显微镜为日本Olympus公司产品; 一次性细胞培养板(北京鼎国公司); 试剂瓶、培养瓶、吸管、试管、盖玻片等玻璃制品均在浓硫酸中浸泡过夜, 充分洗涤后高压灭菌; DG-3022A型酶标仪(华东电子管厂); 流式细胞仪(FACS420).

1.2 方法

1.2.1 扩增目的片段 将血清样品按患者病情轻重程度分成慢性乙肝无症状携带、慢性乙型肝炎轻度、慢性乙型肝炎中度、慢性乙型肝炎重度和慢性乙肝慢性乙肝重型五组, 各取若干份采用多对型特异性引物巢式PCR法^[14]鉴定HBV基因型. 选取慢性乙肝无症状携带(B基因型)、慢性乙肝重型(B基因型)、慢性乙肝轻度(C基因型)、慢性乙肝重型(C基因型)的患者血清各1例, 分别编号为B1, B2, C1和C2. 用DNA提取试剂盒提取HBV DNA, 以其为模板进行PCR扩增, 加样如下: PC1(50 pmol) 1 μL, PC2(50 pmol) 1 μL, 5 MU/L Taq酶0.25 μL, 10×PCR Buffer(含Mg²⁺) 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 灭菌DDW 37 μL, DNA模板2 μL, 总量50 μL. 反应条件如下: 95℃预变性5 min, 然后按94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min扩增35个循环, 再72℃延伸7 min. PCR产物的回收与纯化按琼脂糖凝胶DNA纯化试剂盒说明进行操作.

1.2.2 重组T载体的构建 包括制备感受态细菌、目的片段与T载体连接、转化细菌、阳性克隆的筛选、提取质粒和酶切鉴定阳性克隆等步骤, 按文献[15]进行.

1.2.3 重组真核表达质粒的构建、鉴定及转染 包括真核表达质粒的提取及鉴定、制备含有相同酶切位点黏性末端的片段和开环状真核表达质粒、连接目的片段和开环真核表达质粒

■研究前沿

随着全基因分析或S基因测序法、聚合酶链反应(PCR)法、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法、微板核酸杂交ELISA法等方法相继建立和完善, 各种基因型地理分布情况的基本弄清, 如A型主要在北欧和非洲, B型和C型主要在东亚, D型在中东、北非和南欧, E型在非洲, F型仅在南美, 研究重点已转移到基因型与临床关系方面. 例如西方学者发现D型对HBV-DNA、HBsAg、HBeAg的清除率均比A型低, 死亡率较A型高. 而在流行B、C型的东亚地区, 日本、台湾、香港以及中国大陆的研究者们经过大量研究发现, C型可引起比B型更严重的临床表现, 如ALT的升高、HBeAg阳性率的增加、重症中所占比例的增大.

■创新盘点

虽然在HBV基因型与临床的关系方面已有大量研究,而且基本上对所有HBV基因型导致病情的程度也基本达成共识,但是大都只停留在流行病学调查后进行统计学分析的水平上,并没有从本质上即HBV感染和发病机制上去阐述其中的缘由。例如为什么C型HBV引起的临床表现要比B型重,他是通过什么途径达到这一效果的?为此,本文就先从细胞凋亡入手研究HBV基因型与临床关系的机制。

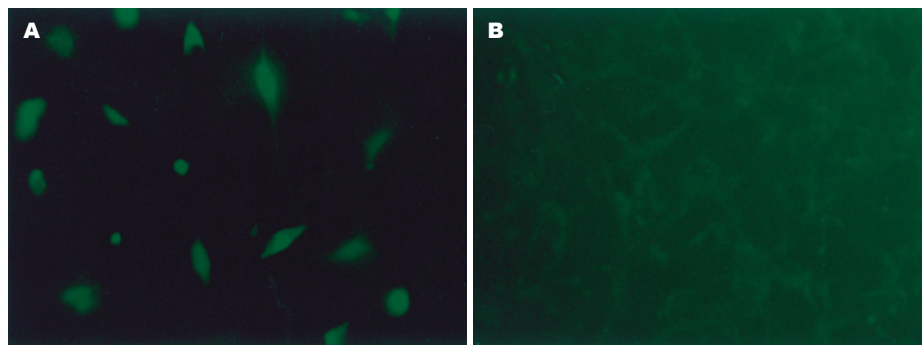


图1 荧光显微镜检测HepG2转染效率。A: 转染重组真核表达质粒的HepG2; B: 未转染pEGFP-C1的HepG2。

pEGFP-C1、细菌转化和克隆筛选、重组真核表达质粒的鉴定等步骤。鉴定完毕后,将重组真核表达质粒转染肝癌细胞HepG2中,按参考文献[16]进行。

1.2.4 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白以鉴定转染效率 用2.5 g/L胰蛋白酶消化已转染并培养48 h的细胞,将 2×10^5 个细胞置于放有盖玻片的6孔培养板中继续培养48 h后,取出盖玻片直接在488 nm激发光荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白并摄像。

1.2.5 MTT法检测HBV-C蛋白对HepG2增殖率的影响 分别消化、计数转染4份重组真核质粒和空白质粒的HepG2、以及未转染HepG2共6种细胞,调整细胞浓度为 1×10^8 /L,96孔板中每孔加入200 μ L细胞悬液,置于含50 mL/L CO₂、37℃培养箱中培养;培养48 h后弃去原培养基,按每180 μ L培养基加20 μ L MTT(5 g/L)配置培养基,然后加入96孔板继续培养4 h;4 h后弃去培养基,用0.1 mol/L PBS洗涤细胞5 min \times 1次;每孔加200 μ L DMSO,5 min后于酶标仪上测定490 nm波长各孔光密度值。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况 分别将4份HBV-C转染HepG2、空白质粒转染HepG2和未转染HepG2细胞传代 2×10^5 个至6孔培养板培养48 h;经2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞,室温下1500 r/min离心10 min,0.1 mol/L PBS洗涤细胞1次,用700 mL/L冷乙醇固定细胞于4℃保存。细胞经流式细胞仪检测细胞凋亡率、细胞周期性变化。

统计学处理 利用SPSS 11.0进行统计学分析,计量资料数据用mean \pm SD表示。如分组只有2组,采用独立样本 t 检验分析;如分组多于2组,则用单因素方差分析,首先多组之间进行比较,当 $P < 0.05$ 时采用LSD法进行两两比较;率的比较采用卡方检验进行统计学分析,并以 $P < 0.05$ 确定差异是否具有显著性。

2 结果

2.1 重组T-载体的构建 重组T-载体经EcoR I和Kpn I双酶切3 h后于15 g/L琼脂糖中进行凝胶电泳观察,可见4份样品的环状质粒样条带均被酶切成2条清晰的条带,大小分别为2600 bp和640 bp左右,与预期结果相符,初步认定所需阳性克隆构建成功。

2.2 重组真核表达质粒的鉴定 取8 μ L PCR扩增产物于15 g/L琼脂糖中进行凝胶电泳,85 V稳压泳动20 min后于紫外透视仪观察,在640 bp左右可见清晰浓亮的单一条带,与预期目的片段大小相符,而阴性对照DDW无条带。重组真核表达质粒经EcoR I和Kpn I双酶切3 h后于15 g/L琼脂糖中进行凝胶电泳,可见4份样品的环状质粒样条带均被酶切后得到两条清晰的大小分别约为4700 bp和640 bp的条带。4份样品的基因序列均用通用引物EGFP-C-F和EGFP-C-R进行双向测定。通过与GenBank上pEGFP-C1的序列比较发现,4份样品的测序结果中目的片段以外的基因序列均与pEGFP-C1序列完全吻合,说明重组真核表达质粒构建成功。采用Blastn程序进行基因序列同源性比较,发现4份重组真核质粒目的片段与GenBank中B或C基因型HBV核心区序列的同源性均为97%-98%,与多对型特异性引物巢式PCR的分型结果完全一致。

2.3 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白以鉴定转染效率 用镊子将盖玻片从培养板中取出放在载玻片上,然后在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白。结果发现,转染了B1, B2, C1, C2 4份重组真核表达质粒和pEGFP-C1质粒的HepG2均能看到细胞内发出强烈的绿色荧光,而未转染的HepG2没有看到细胞发出荧光(图1)。结果表明,绿色荧光蛋白质粒pEGFP-C1能很好地起到一个转染内参的作用,可鉴定转染成功与否和转染效率。同时证明了此次转染获得成功。

2.4 MTT法检测不同基因型HBV-C蛋白对HepG2

表 1 6份样品的细胞周期和细胞凋亡率的比较(mean \pm SD, $n = 4$, %)

细胞分组	G ₀ /I期	S期	G ₂ /M期	细胞凋亡率
HBV-C转染组				
B1	72.3 \pm 3.0	21.2 \pm 3.8 ^{ac}	6.5 \pm 1.3	6.4 \pm 0.8 ^{ac}
B2	72.6 \pm 2.1	19.8 \pm 1.7 ^a	7.6 \pm 1.6	7.3 \pm 1.6 ^a
C1	75.8 \pm 0.9	17.7 \pm 1.5 ^a	6.5 \pm 1.8	6.8 \pm 1.2 ^a
C2	77.4 \pm 2.2	16.2 \pm 1.6 ^a	6.4 \pm 1.7	8.8 \pm 2.0 ^a
空白质粒转染组	74.9 \pm 2.5	15.2 \pm 1.1	9.9 \pm 1.0	4.3 \pm 1.4
未转染细胞组	80.5 \pm 3.6	14.2 \pm 3.6	5.3 \pm 0.9	3.8 \pm 1.4

^a $P < 0.05$ vs 空白质粒转染组、未转染组; ^c $P < 0.05$ vs C2.

细胞增殖率的影响 用MTT法检测了HBV-C转染组、空白质粒(pEGFP-C1)转染组和未转染细胞组共6组细胞的增殖率, 结果显示HBV-C转染组HepG2细胞生长增殖率均低于空白质粒转染组细胞生长增殖率(0.250 ± 0.032)和未转染组HepG2细胞生长增殖率(0.267 ± 0.017), 4份样品与后二者两两比较其差异均有显著性($P < 0.05$), 后两者之间的差异无显著性($P > 0.05$). 而HBV-C转染组中4份样品的细胞增殖率亦不尽相同, 按从高到低排序依次为B1(B型携带, 0.202 ± 0.038)、B2(B型重型, 0.195 ± 0.038)、C1(C型轻度, 0.183 ± 0.024)、C2(C型重型, 0.172 ± 0.023), 但4者之间无显著性差异($P > 0.05$).

2.5 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡 用流式细胞仪检测了B1, B2, C1和C2 4个重组质粒转染组、空白质粒转染组和未转染细胞组共6组细胞的细胞周期和细胞凋亡情况, 结果显示, B1, B2, C1, C2转染组的细胞凋亡率明显高于空白质粒转染组和未转染细胞组($P < 0.05$), 表明HBV-C蛋白能够促进HepG2细胞的凋亡. 经两两 t 检验比较, 发现C2(C型重型)转染组的细胞凋亡率显著高于B1(B型携带)转染组的细胞凋亡率($P < 0.05$)(表1).

3 讨论

HBV基因型与乙型病毒性肝炎的病情存在一定关系, 我国的HBV主要为B型和C型, 研究证实C型HBV所致病情较B型HBV为重, 但原因不明, 目前未见关于其机制的报道. 我们通过对不同基因型的HBV分别进行核心区序列的扩增, 之后与真核表达载体pEGFP-C1(绿色荧光蛋白表达质粒)进行基因重组和分子克隆, 再将这些重组真核表达质粒分别转染至肝癌细胞系HepG2中, 用MTT法和流式细胞仪分别检测其细胞增

殖率和凋亡率. 结果显示HBV-C转染组HepG2与空白质粒转染组和未转染组HepG2细胞相比, 细胞生长增殖率显著降低, 凋亡率显著升高, 进一步表明HBV有促进肝细胞凋亡的作用. HBV-C转染组中4份样品的平均细胞增殖率从高到低排序依次为B1(B型携带)、B2(B型重型)、C1(C型轻度)、C2(C型重型), 似乎提示C基因型HBV促进肝细胞凋亡的能力要略强于B基因型HBV, 但4者经两两比较后发现并无显著性差异($P > 0.05$), 可能与样本数较少有关, 或因为HBV基因型只是促进肝细胞凋亡的多个因素之一而已. 不过, 流式细胞仪则提示C2转染组的细胞凋亡率显著高于B1转染组的细胞凋亡率, 并具有统计学意义($P < 0.05$), 表明C型HBV核心蛋白在促进细胞凋亡方面确实要强于B型HBV, 至于在其他致病因素方面是否也存在着差异, 从而更好地诠释HBV基因型与临床关系的发病机制, 还有待于下一步的研究.

4 参考文献

- 1 Sugauchi F, Chutaputti A, Orito E, Kato H, Suzuki S, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 671-676
- 2 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1362-1364
- 3 Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 19-26
- 4 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1277-1279
- 5 Lee CM, Chen CH, Lu SN, Tung HD, Chou WJ, Wang JH, Chen TM, Hung CH, Huang CC, Chen WJ. Prevalence and clinical implications of hepatitis

同行评价

本文实验设计合理, 论证严密, 科学性较强, 采用的实验技术手段较为领先, 所得到的结论可信, 是一篇学术水平较高的研究论文.

- B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 95-101
- 6 许军, 王齐欣, 蒋栋, 陈红松, 魏来, 王宇, 杨柳明, 赵延龙. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 11-13
- 7 温志立, 谭德明, 侯周华, 杨永峰. 型特异性巢式PCR研究HBV基因型与临床关系. *中南大学学报(医学版)* 2004; 29: 50-53
- 8 李卓, 李洪权, 李俊红, 刘英, 刘芳, 勾春燕, 高冀容, 单晶, 郭新会, 殷继明, 刘道洁, 谢贤春, 李辉. 北京地区乙型肝炎病毒基因型与其感染临床表型的相关性. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2823-2827
- 9 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003; 22: 2104-2116
- 10 Birrer RB, Birrer D, Klavins JV. Hepatocellular carcinoma and hepatitis virus. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 39-54
- 11 Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 537-544
- 12 Janssen HL, Higuchi H, Abdulkarim A, Gores GJ. Hepatitis B virus enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity by increasing TRAIL-R1/death receptor 4 expression. *J Hepatol* 2003; 39: 414-420
- 13 Foo NC, Ahn BY, Ma X, Hyun W, Yen TS. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology* 2002; 36: 1400-1407
- 14 温志立, 谭德明. 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 332-335
- 15 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南. 第1版. 北京: 科学出版社, 1998: 17
- 16 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 第1版. 北京: 北京出版社, 1995: 78-238

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 •

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2006-11-28)

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

• 消息 •

国际会议

9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
20-23 June 2007
Barcelona
Imedex
meetings@imedex.com

New York Society for Gastrointestinal Endoscopy
13-16 December 2006
New York
www.nysge.org

Semaphorin6D在胃癌中的表达及其意义

赵向阳, 陈凇, 许倩, 李玉红

赵向阳, 陈凇, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 1000853

许倩, 承德医学院基础医学研究所 河北省承德市 067000

李玉红, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

通讯作者: 陈凇, 1000853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科, chenlinbj@vip.sina.com

电话: 010-66937846 传真: 010-68181689

收稿日期: 2006-09-01 接受日期: 2006-10-11

Expression of Semaphorin6D and its significance in gastric carcinoma

Xiang-Yang Zhao, Lin Chen, Qian Xu, Yu-Hong Li

Xiang-Yang Zhao, Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Qian Xu, Institute of Basic Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Yu-Hong Li, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chende 067000, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. chenlinbj@vip.sina.com

Received: 2006-09-01 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To investigate the expression of Semaphorin6D in gastric carcinoma and its significance.

METHODS: The mRNA and protein expression of Semaphorin6D was detected by semi-quantity reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively, in 30 cases of gastric carcinoma and normal mucosa.

RESULTS: The expression of Semaphorin6D was significantly higher in gastric carcinoma than that in the normal mucosa both at mRNA and protein level (0.24 ± 0.06 vs 0.19 ± 0.07 , $P = 0.013$; 0.26 ± 0.09 vs 0.20 ± 0.10 , $P = 0.0194$).

CONCLUSION: Semaphorin6D may play an important role in the occurrence and development of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Semaphorin6D; Western blot; Immunohistochemistry

Zhao XY, Chen L, Xu Q, Li YH. Expression of

Semaphorin6D and its significance in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(33):3233-3236

摘要

目的: 探讨Semaphorin6D在胃癌中的表达及其意义。

方法: 应用RT-PCR和Western blot检测30例胃癌患者的癌组织及胃切缘正常胃黏膜Semaphorin6D的mRNA和蛋白表达。

结果: 胃癌组织中的Semaphorin6D蛋白及mRNA的表达明显高于胃正常黏膜(0.26 ± 0.09 vs 0.20 ± 0.10 , $P = 0.0194$; 0.24 ± 0.06 vs 0.19 ± 0.07 , $P = 0.013$)。

结论: Semaphorin6D在胃癌发生、发展中发挥重要作用。

关键词: 胃癌; 胃正常黏膜; Semaphorin6D

赵向阳, 陈凇, 许倩, 李玉红. Semaphorin6D在胃癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3233-3236

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3233.asp>

0 引言

在过去的十年来,一系列的基因和功能研究发现了一群蛋白质分子,被命名为Semaphorin蛋白超家族,其在神经系统形成、胚胎发生、血管生成、免疫反应和肿瘤发生、发展中发挥着重要作用^[1-5],其中Semaphorin6D是新近发现的调节神经系统发生、发展的新基因,其通过不同的剪接,分为5个亚型: Semaphorin6Ds, Semaphorin6D-1, Semaphorin6D-2, Semaphorin6D-3和Semaphorin6D-4^[6]。目前对Semaphorin6D功能及作用机制了解甚少,尤其在肿瘤方面的研究未见报道,本研究首次通过RT-PCR和Western blot方法研究Semaphorin6D在胃癌及其正常黏膜表达并探讨其临床病理意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集解放军总医院2006-04/08手术切

■背景资料

Semaphorin6D是新近发现的一组新基因,目前对其功能只进行了初步探讨,发现其在轴突形成和心脏发生中起着重要作用,然而在其他方面的作用了解甚少,尤其在肿瘤方面的研究未见报道。

■ 创新盘点

本研究首次通过RT-PCR和Western blot方法研究Semaphorin6D在新鲜胃癌组织和正常胃黏膜表达并探讨其临床病理意义。

表 1 Semaphorin6D 5个亚型引物序列

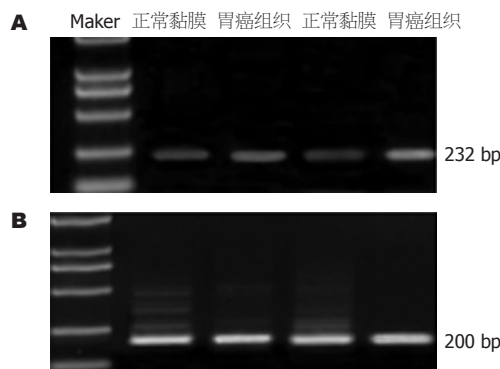
亚型	上游引物	下游引物	长度(bp)
Semaphorin6Ds	5'-GCTTTGTGCCTACATACTGCT-3'	3'-ACCGGATATTGCCTTGAATAGTG-5'	114
Semaphorin6D-1	5'-TGAACGACAGCGTATTACTGGA-3'	3'-GGAAAGCAAAGAAGTCTTCGGTT-5'	297
Semaphorin6D-2	5'-TAGTAACCTGCTAACCAGTCGG-3'	3'-GTGGCGGACTAGACGGAAAA-5'	230
Semaphorin6D-3	5'-CTCAGTCGCTGTGAGCGTTAT-3'	3'-CAGATGTTGGACCGCCAAATA-5'	232
Semaphorin6D-4	5'-ATATTTGGCGGTCCAACATCTG-3'	3'-TTGTCAGTTTAGGTCTCCAGGTA-5'	115

除的30例胃癌患者的胃癌组织及远离癌肿胃切缘正常黏膜。患者术前未接受化疗和放疗。全部病例均经手术和病理证实。男19例,女11例;年龄32-74(平均 54 ± 15)岁。肿瘤部位:贲门7例,胃体3例,胃窦20例。肿瘤分化程度:高、中分化腺癌13例,低分化腺癌14例。区域淋巴结转移阴性者17例,阳性13例。新鲜组织离体后迅速提取总RNA和总蛋白, -70°C 储存。

1.2 方法

1.2.1 半定量RT-PCR 用TRIzol(博大泰克公司)提取总RNA,溶于40 μL DEPC处理的双蒸水中,混匀,在核酸蛋白测定仪上检测总RNA浓度。20 μL 逆转录体系中加入1.5 μg 总RNA,用M-MLV第一链cDNA合成试剂盒(博大泰克公司)逆转录,按试剂盒说明书操作步骤进行。取2 μL 逆转录产物作模板,选用即用PCR扩增试剂盒(博大泰克公司)在PCR仪上进行PCR扩增。以 β -actin作为外参照。 β -actin和Semaphorin6D引物由华大基因合成。Semaphorin6D 5个亚型引物序列见表1。 β -actin引物序列:上游5'-CGCACCACTGGCATTTGTCAT-3',下游3'-TTCTCCTTGATGTCACGCAC-5'。PCR反应体系50 μL ,PCR反应条件为: 94°C 预变性5 min, 94°C 变性50 s, 55°C 退火50 s(β -actin 56°C 50 s), 72°C 延伸1 min, 37个循环, 72°C 再延伸8 min。取8 μL PCR产物在20 g/L的琼脂糖凝胶上电泳30 min,溴乙锭染色。将Semaphorin6D与 β -actin的灰度值的比值作为Semaphorin6D mRNA的相对表达水平。

1.2.2 Western blot检测 取100 mg组织加入预冷的蛋白裂解液0.5 mL,裂解组织细胞,提取总蛋白。取50 μg 蛋白进行100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移到PVDF膜上。50 g/L脱脂牛奶封闭2 h, Semaphorin6D鼠抗mAb 3 mg/L(R&D system公司) 4°C 过夜, 1:800辣根酶标记的二抗室温1 h孵育后显影。用美国BIO-RAD公司Quantity One分析软件对显影条带进行灰度分析,将Semaphorin6D与 β -actin灰度值的比值作为

图 1 RT-PCR方法检测Semaphorin6D mRNA的表达。A: Semaphorin6D; B: β -actin。

Semaphorin6D蛋白的相对表达水平。

统计学处理 所得数据以mean \pm SD表示,采用SPSS 11.5统计软件对所得数据进行配对t检验。

2 结果

2.1 Semaphorin6D的mRNA表达 经RT-PCR对Semaphorin6D 5个亚型mRNA的检测,只有Semaphorin6D-3型在胃癌组织和正常胃黏膜中有表达, Semaphorin6D-3 mRNA扩增产物为232 bp, β -actin为200 bp(图1)。Semaphorin6D在胃癌组织中的表达明显高于正常胃黏膜(0.24 ± 0.06 vs 0.19 ± 0.07 , $P = 0.013 < 0.05$)。

2.2 Semaphorin6D蛋白表达 Western blot法显示胃癌组织和胃正常黏膜中与Semaphorin6D蛋白抗体结合的特异性条带位于相对分子质量为100 kDa处(图2)。Semaphorin6D蛋白在胃癌组织中的表达明显高于正常胃黏膜(0.26 ± 0.09 vs 0.20 ± 0.10 , $P = 0.0194 < 0.05$),与RT-PCR检测结果相符。

3 讨论

Semaphorin最早在神经系统发现,是一个较大的蛋白超家族,可分为8种类型, Semaphorin1, 8分别存在于无脊椎动物和病毒中,而Semaphorin3

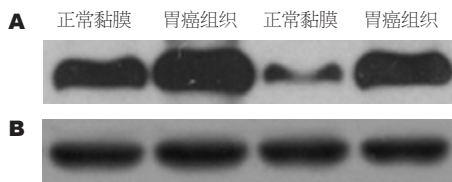


图2 Western blot方法检测Semaphorin6D蛋白的表达. A: Semaphorin6D; B: β -actin.

到Semaphorin7在脊椎动物中发现, 人类有20种Semaphorin蛋白, 其中Semaphorin3是分泌型蛋白, Semaphorin4, 5, 6是跨膜蛋白, Semaphorin7是通过GPI连接在细胞膜上的蛋白^[7]. 近年来, 一些研究发现Semaphorin与一些肿瘤的发生、发展存在着密切关系. 例如, Semaphorin3E和Semaphorin3C可促进一些肿瘤细胞的浸润和转移^[8-9], 而Semaphorin3B和Semaphorin3F是抑癌基因, 由于该基因的丢失或超甲基化使肿瘤得以发生、发展^[5,10-11]. 2002年Qu *et al*^[6]发现Semaphorin家族新基因, 被命名为Semaphorin6D, 定位于染色体1q12-12.1, 其在许多组织中表达, 如脑组织、肌肉、胃肠道和胚胎组织等, 并发现Semaphorin6D参与神经系统的发生、发展, 与轴突形成有着密切关系. 众所周知, 神经系统与血管有着相似的解剖结构: (1)都形成复杂而又精密的分支网络样结构; (2)神经血管总是伴行生长; (3)动脉-静脉运输氧分和排除CO₂等废物的职能化与神经系统传入-传出神经传递传入和传出信号相对应; (4)血管系统和神经系统都有两种细胞组成: 内皮细胞/外周细胞、神经元/胶质细胞^[12], 所以推测神经系统的形成与血管生成存在着相似的分子调控机制. 关于Semaphorin6D在血管生成机制方面的调节作用, Toyofuku *et al*^[13]研究报道, 在胚胎发育过程中, Semaphorin6D通过与不同的受体结合, 可诱导或抑制心脏不同部位的上皮细胞的迁移, 从而在胚胎心血管的形态发生中发挥重要作用. 肿瘤血管生成是肿瘤侵袭和转移的重要前提之一^[14-16]. 同样, 胃癌的生成及其恶性侵袭和转移与血管生成也有着密切关系, 本研究通过RT-PCR对Semaphorin6D的5个亚型进行检测, 结果发现只有Semaphorin6D-3在胃癌组织和正常黏膜中表达, 而且癌组织中Semaphorin6D mRNA表达明显高于正常黏膜, 进而我们又通过Western blot方法检测Semaphorin6D蛋白在胃癌中的表达, 结果与RT-PCR结果一致. 提示Semaphorin6D与胃癌的发生、发展存在着密

切关系, 推测其机制可能与Semaphorin6D参与胃癌血管生成, 进而调节胃癌的侵袭和转移有关. 本研究从一个全新的角度, 首次报道Semaphorin6D在胃癌中的表达情况及其临床病理意义, 为深入探讨胃癌的发生、发展机制奠定了基础, 同时为胃癌的治疗研究提供一个崭新的思路.

4 参考文献

- Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993; 75: 1389-1399
- Torres-Vazquez J, Gitler AD, Fraser SD, Berk JD, Van N Pham, Fishman MC, Childs S, Epstein JA, Weinstein BM. Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. *Dev Cell* 2004; 7: 117-123
- Serini G, Valdembrì D, Zanivan S, Morterra G, Burkhardt C, Caccavari F, Zammataro L, Primo L, Tamagnone L, Logan M, Tessier-Lavigne M, Taniguchi M, Puschel AW, Bussolino F. Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 2003; 424: 391-397
- Shi W, Kumanogoh A, Watanabe C, Uchida J, Wang X, Yasui T, Yukawa K, Ikawa M, Okabe M, Parnes JR, Yoshida K, Kikutani H. The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. *Immunity* 2000; 13: 633-642
- Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13954-13959
- Qu X, Wei H, Zhai Y, Que H, Chen Q, Tang F, Wu Y, Xing G, Zhu Y, Liu S, Fan M, He F. Identification, characterization, and functional study of the two novel human members of the semaphorin gene family. *J Biol Chem* 2002; 277: 35574-35585
- Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 669-678
- Yamada T, Endo R, Gotoh M, Hirohashi S. Identification of semaphorin E as a non-MDR drug resistance gene of human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14713-14718
- Christensen CR, Klingelhofer J, Tarabykina S, Hulgaard EF, Kramerov D, Lukanidin E. Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 1238-1244
- Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3352-3355
- Xiang R, Davalos AR, Hensel CH, Zhou XJ, Tse C, Naylor SL. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer*

■同行评价

本研究立意新颖, 研究方法先进, 为研究胃癌的发生机制和治疗方法提供一个崭新的思路.

- Res 2002; 62: 2637-2643
- 12 Autiero M, De Smet F, Claes F, Carmeliet P. Role of neural guidance signals in blood vessel navigation. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 629-638
- 13 Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, Takegahara N, Suto F, Kamei J, Aoki K, Yabuki M, Hori M, Fujisawa H, Kikutani H. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev* 2004; 18: 435-447
- 14 牛新捷, 王作仁, 张云峰, 吴胜利. 胆囊癌组织微血管密度的临床意义. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 109-110
- 15 洪照友, 俞金龙, 张云生, 高毅. 基质金属蛋白酶-9, CD34的表达与肝癌侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 170-174
- 16 钱颀, 刘南植, 程胜平. 胃癌组织Angiopoietin-2及MMP-9表达的意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 299-302

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 •

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)并请在信封上注明“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.

MMP-7与Fas蛋白在胃癌组织中的表达及意义

胡端敏, 王少峰, 冯一中

胡端敏, 王少峰, 苏州大学附属第二医院消化科 江苏省苏州市 215004

冯一中, 苏州大学医学院病理教研室 江苏省苏州市 215006

通讯作者: 胡端敏, 215004, 江苏省苏州市金阊区三香路181号, 苏州大学附属第二医院消化科. huduanmin@163.com

电话: 0512-68282030-3835 传真: 0512-68284303

收稿日期: 2006-07-30 接受日期: 2006-09-29

Expression of matrix metalloproteinase-7 and Fas and their significances in gastric carcinoma

Duan-Min Hu, Shao-Feng Wang, Yi-Zhong Feng

Duan-Min Hu, Shao-Feng Wang, Department of Digestive Diseases, the Second Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Yi-Zhong Feng, Department of Pathology, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Duan-Min Hu, Department of Digestive Diseases, the Second Hospital Affiliated to Suzhou University, 181 Sanxiang Road, Jinchang District, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. huduanmin@163.com

Received: 2006-07-30 Accepted: 2006-09-29

Abstract

AIM: To investigate the expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and Fas in gastric carcinoma as well as their relationships with clinical characteristics.

METHODS: The expression of MMP-7 and Fas proteins were examined with immunohistochemical technique in the specimens from 82 gastric carcinoma tissues and 30 surrounding normal tissues.

RESULTS: The positive rate of MMP-7 expression was significantly higher in gastric carcinoma than that in the normal tissues (73.2% vs 10%, $P < 0.05$), while the positive rate of Fas expression was marked lower in gastric carcinoma than that in the normal controls (39.1% vs 93.3%, $P < 0.001$). The expression of MMP-7 was correlated with lymph node metastasis and TMN staging ($P < 0.001$), but not with the differentiation of tumor cells ($P > 0.05$). The expression of

Fas was correlated with the differentiation of tumor cells ($P < 0.05$), but was not correlated with lymph node metastasis and TMN staging ($P > 0.05$). There was a negative correlation between the expression of MMP-7 and Fas in gastric carcinoma ($r = -0.597$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: The expression of MMP-7 and Fas are closely correlated with the biological behavior of gastric carcinoma. Meanwhile, a negative correlation exists between MMP-7 and Fas expression.

Key Words: Gastric carcinoma; Matrix metalloproteinase-7; Fas; Metastasis; Immunohistochemistry

Hu DM, Wang SF, Feng YZ. Expression of matrix metalloproteinase-7 and Fas and their significances in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3237-3240

摘要

目的: 探讨基质金属蛋白酶-7(MMP-7)蛋白和Fas蛋白在胃癌组织中的表达、相互关系及意义。

方法: 应用免疫组化方法检测了82例胃癌组织及30例周边正常胃黏膜中MMP-7和Fas的表达情况。

结果: 胃癌组织中MMP-7蛋白阳性率显著高于正常胃黏膜(73.2% vs 10%, $P < 0.001$); 正常胃黏膜中Fas蛋白阳性率显著高于胃癌组织(39.1% vs 93.3%, $P < 0.001$)。MMP-7阳性表达率与淋巴结转移、TNM分期显著相关($P < 0.001$), 而与肿瘤细胞分化程度无显著性相关。Fas蛋白阳性表达率与肿瘤细胞分化程度显著相关($P < 0.05$), 而与淋巴结转移、TNM分期无显著性相关。胃癌组织中MMP-7与Fas表达具有显著等级负相关($r = -0.597$, $P < 0.001$)。

结论: MMP-7与Fas表达胃癌的生物学行为密切相关, 且两者之间的表达强度具有显著等级负相关。

■背景资料

胃癌的发生和转移与MMP-7的过度表达相关, 同时Fas作为一种细胞凋亡基因也起着重要的作用, 但MMP-7的表达是否与细胞凋亡存在联系却很少有相关报道。

关键词: 胃癌; 基质金属蛋白酶-7; Fas; 转移; 免疫组化

胡端敏, 王少峰, 冯一中. MMP-7与Fas蛋白在胃癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3237-3240
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3237.asp>

0 引言

胃癌的浸润和转移是多步骤的复杂过程, 其机制尚不清楚, 但基底膜和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解是其中的必要条件, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)家族是一类依赖金属锌离子的蛋白水解酶家族, 能有效地降解细胞外基质, 在肿瘤的生长、转移过程中均起着重要作用, MMP-7是MMP家族中最小的成员, 可降解各种细胞外基质成分, 如层黏连蛋白、纤维连接蛋白、弹性蛋白、IV型胶原蛋白等^[1]. 国内外许多研究者发现MMP-7的过度表达与胰腺癌^[2]、结肠癌^[3]等恶性肿瘤的转移相关, 但MMP-7的表达是否与细胞凋亡存在联系却很少有相关报道. 细胞凋亡即细胞程序化死亡是由基因或其他一些因素调控的活组织细胞自我消亡的过程, 这一过程的紊乱与许多疾病的发生、发展有关, 尤其与肿瘤的发生、发展关系密切, 在肿瘤发生的多阶段过程中, 细胞凋亡的抑制可能起着重要的作用, Fas是一种重要的细胞凋亡相关基因, Fas蛋白的异常表达作为可能的重要机制在食管癌^[4]、结肠癌^[5]、胆囊癌^[6]等恶性肿瘤中已经得到证实. 为了研究胃癌发生过程中细胞凋亡和增殖异常的分子机制, 本研究应用免疫组化方法检测了正常胃黏膜及胃癌组织中MMP-7和Fas的表达, 并探讨其在胃癌发生、发展中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌组织手术切除标本82例. 其中男44例, 女38例, 年龄32-82(平均59)岁. 术前未予放疗、化疗. 正常组织为同一手术中切取自距肿瘤边缘8 cm的正常胃壁组织30例. 标本经病理证实为腺癌, 其中低分化腺癌50例, 高、中分化腺癌32例. 病理分期采用国际抗癌联盟(UICC)1987年公布的胃癌TNM分期法. MMP-7及Fas多克隆抗体(兔抗)及链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化染色试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品.

1.2 方法 免疫组织化学染色技术的具体操作步

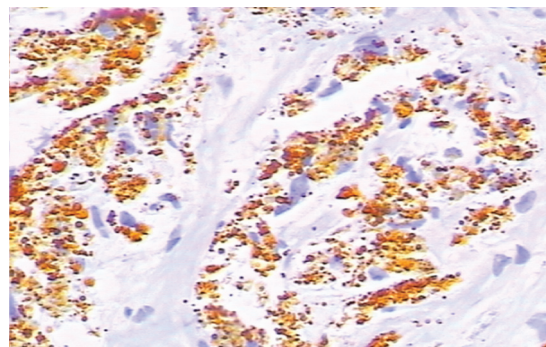


图1 MMP-7在胃癌中的表达($\times 100$).

骤按照试剂盒要求进行. MMP-7及Fas的阳性细胞染色均定位于细胞膜和细胞质, 以细胞膜和细胞质中呈浅黄、棕黄、或更深的棕褐色的细小颗粒作为阳性细胞, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 采用三个参数(即染色强度、阳性细胞数和两者记分的乘积)的半定量的计数方法. 着色强度记分标准: 无着色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分. 光镜下随机观察8个高倍视野, 记录4个高倍视野中染色阳性细胞的百分率, 记分标准: 0%为0分, 1%-10%为1分, 11%-50%为2分, 51%-80%为3分, >80%为4分. 染色强度记分与阳性细胞数记分之积为最后得分: 0分为(-), 1-2分为(+), 3-4分为(++), >4分为(+++).

统计学处理 应用SPSS 11.0统计软件包进行统计分析, 组间采用卡方检验, 两指标间采用有序分组资料的等级相关检验, 取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 MMP-7与Fas在胃癌组织及正常黏膜表达情况 MMP-7在82例胃癌组织中表达为60例阳性, 阳性率为73.2%. MMP-7在肿瘤细胞的胞膜及胞质中表达, 间质细胞中无表达, MMP-7的阳性染色分布异质性明显, 阳性染色的细胞常分布于深部浸润的癌巢, 尤其在浸润的前沿(图1), 这一现象在Ajisaka *et al*^[7]的研究中也有相同的发现, 在30例正常对照的胃黏膜组织中有3例弱表达, 阳性率为10%, 经 χ^2 检验显示胃癌组织中MMP-7阳性率显著高于正常胃黏膜组($P < 0.001$). Fas在82例胃癌组织中表达为32例阳性, 阳性率为39.1%, 阳性染色主要见于癌细胞的细胞质、胞膜及癌间质组织(图2), 在30例正常对照的胃黏膜组织中有28例表达阳性, 阳性率为93.3%, 阳性染色部位主要位于间质细胞, 经 χ^2 检验显示, 正常胃黏膜组中Fas阳性率显著高于胃癌组织

表 1 MMP-7与Fas的表达及其与胃癌生物学行为的关系 (n)

	MMP-7			Fas		
	(+)	(-)	P	(+)	(-)	P
性别						
男	30	14	0.273	17	27	0.938
女	30	18		15	23	
年龄						
<60	29	10	0.817	14	25	0.581
≥60	31	12		18	25	
分组						
正常组织	3	27	<0.001	28	2	<0.001
胃癌组织	60	22		32	50	
病理分型						
高、中分化型	23	9	0.832	20	12	<0.01
低分化型	37	13		12	38	
TNM分期						
I - II 期	16	15	<0.001	14	17	0.375
III - IV 期	44	7		18	33	
淋巴结转移						
有	51	9	<0.001	22	38	0.472
无	9	13		10	12	

■同行评价

本研究显示MMP-7与Fas表达与胃癌的生物学行为密切相关,且两者之间的表达强度具有显著等级负相关,提示Fas下调可能促进MMP-7表达从而促使肿瘤细胞向周围组织间隙浸润同时通过淋巴管和血管向远处转移。实验对照的设计合理可靠,统计学处理方法的使用恰当,结论较明确,实验证据较充足。

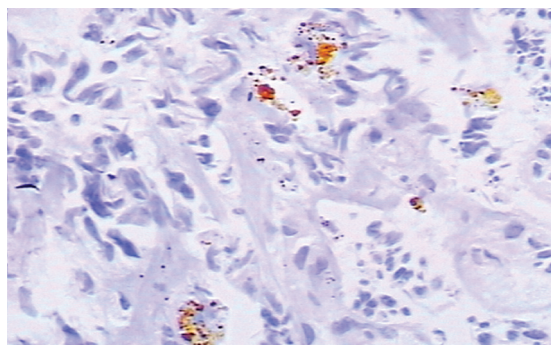


图 2 Fas在胃癌中的表达(×100).

($P<0.001$)(表1).

2.2 MMP-7与Fas的表达与临床及胃癌生物学行为的关系 MMP-7与Fas的阳性表达在各性别组和各年龄组之间无显著差异, MMP-7在TNM分期之间, 有淋巴结转移和无淋巴结转移胃癌组间表达有显著性差异($P<0.05$), 而在高中分化胃癌组和低分化胃癌组间表达无显著性差异($P>0.05$). Fas在高中分化胃癌组和低分化胃癌组间表达有显著性差异($P<0.05$), 而表达在TNM分期之间, 有淋巴结转移和无淋巴结转移胃癌组间无显著性差异($P>0.05$, 表1).

2.3 胃癌组织中MMP-7与Fas表达之间的关系 经等级相关检验表明, 胃癌组织中MMP-7与Fas表达具有显著负相关($r_s = -0.597, P<0.001$, 表2).

表 2 胃癌组织中MMP-7与Fas表达之间的关系 (n)

Fas	MMP-7				合计
	-	+	++	+++	
-	5	9	11	25	50
+	4	2	1	3	10
++	6	1	2	1	10
+++	7	2	2	1	12
合计	22	14	16	30	82

3 讨论

肿瘤转移的机制至今还未完全阐明, 一般认为过度增生的肿瘤细胞使细胞外基质降解和基底膜重塑, 肿瘤细胞进入血液或淋巴液转移到其他部位生长, 他是由许多因子共同参与的复杂过程, MMP家族已被证明可以降解基底膜和ECM, 与肿瘤的浸润和转移密切相关^[8], MMP-7基因位于11q21-q22, 其cDNA长1094 bp, 是MMP家族中最小的一个^[9], MMP-7基因主要在上皮来源的细胞中表达, 在胃肠道肿瘤细胞中为高表达, 在正常黏膜上皮中为弱表达或不表达, 他的高表达与癌细胞的浸润和转移特性相关^[10]. 本实验MMP-7在73.2%胃癌组织中的表达增高, 同时发现MMP-7在TNM分期III-IV期胃癌组阳性率明显高于TNM分期I - II期胃癌组($P<0.001$), 表

明MMP-7随胃癌的进展而表达增高,这与Honda *et al*^[11]的研究结果相似。此外有淋巴结转移胃癌组中阳性率明显高于无淋巴结转移组($P<0.001$),这表明MMP-7表达与肿瘤的转移有关,而肿瘤的转移与肿瘤患者的预后密切相关,所以MMP-7的检测有可能成为评价胃癌恶性行为的生物学标记物,Kitoh *et al*^[12]在他们的研究中也有关似的结论提出。研究表明,在胃癌的病理演化过程中,不仅存在着细胞增殖的异常,细胞凋亡的异常也起着重要的作用,Fas属I型跨膜蛋白,是肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员,Fas与其天然配体(FasL)或相应膜抗体相结合,通过激活Caspase家族,完成细胞凋亡信号传递,是细胞凋亡的主要途径之一^[13]。大量研究表明在肿瘤发生的多阶段过程中,细胞凋亡的抑制可能起着重要的作用,Fas蛋白的异常表达作为可能的重要机制^[14-15]。本组肿瘤组织中Fas表达较正常组织减弱,可能系肿瘤细胞逃避Fas系统介导的宿主免疫的普遍机制,下调或抑制Fas表达,导致机体内依赖Fas介导的CTL失去杀伤性识别作用,避免了T淋巴细胞的攻击作用^[16]。本组胃癌Fas阳性表达与临床分期、淋巴结转移均无相关关系,提示胃癌表达Fas的特性可能在细胞恶变时已形成,不随细胞生长情况而改变^[17]。为了进一步探讨MMP-7是通过何种途径促进肿瘤的浸润、转移及其与Fas之间的相互关系,本实验观察了82例胃癌组织中MMP-7及Fas蛋白的表达之间的关系,经等级相关检验表明胃癌组织中MMP-7与Fas表达具有显著相关($r_s = -0.597, P<0.001$),提示Fas下调可能促进MMP-7表达,从而促使肿瘤细胞向周围组织间隙浸润同时通过淋巴管和血管向远处转移。胃癌的发生、发展是一个多因素逐渐演变的复杂过程,MMP-7及Fas之间具体的作用机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Yamashita K, Azumano I, Mai M, Okada Y. Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis. *Int J Cancer* 1998; 79: 187-194
- 2 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
- 3 王瑞婷, 申兴斌, 金小平, 于再东. 基质金属蛋白酶-7和组织金属蛋白酶抑制剂-1与大肠癌的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1344-1345
- 4 Shibakita M, Tachibana M, Dhar DK, Kotoh T, Kinugasa S, Kubota H, Masunaga R, Nagasue N. Prognostic significance of Fas and Fas ligand expressions in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2464-2469
- 5 Zhu Q, Liu JY, Xu HW, Yang CM, Zhang AZ, Cui Y, Wang HB. Mechanism of counterattack of colorectal cancer cell by Fas/Fas ligand system. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6125-6129
- 6 Xu LN, Zou SQ, Wang JM. Action and mechanism of Fas and Fas ligand in immune escape of gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3719-3723
- 7 Ajisaka H, Yonemura Y, Miwa K. Correlation of lymph node metastases and expression of matrix metalloproteinase-7 in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 900-905
- 8 Roeb E, Bosserhoff AK, Hamacher S, Jansen B, Dahmen J, Wagner S, Matern S. Enhanced migration of tissue inhibitor of metalloproteinase overexpressing hepatoma cells is attributed to gelatinases: relevance to intracellular signaling pathways. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1096-1104
- 9 Knox JD, Boreham DR, Walker JA, Morrison DP, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden GT. Mapping of the metalloproteinase gene matrilysin (MMP7) to human chromosome 11q21-->q22. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 72: 179-182
- 10 Yonemura Y, Endou Y, Fujita H, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T. Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000; 3: 63-70
- 11 Honda M, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Matrix metalloproteinase-7 expression in gastric carcinoma. *Gut* 1996; 39: 444-448
- 12 Kitoh T, Yanai H, Saitoh Y, Nakamura Y, Matsubara Y, Kitoh H, Yoshida T, Okita K. Increased expression of matrix metalloproteinase-7 in invasive early gastric cancer. *J Gastroenterol* 2004; 39: 434-440
- 13 Lim SC. Fas-related apoptosis in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10: 57-63
- 14 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃癌及其癌前病变中细胞凋亡与细胞增殖间关系的研究. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 649-651
- 15 Fukuzawa K, Takahashi K, Furuta K, Tagaya T, Ishikawa T, Wada K, Omoto Y, Koji T, Kakumu S. Expression of fas/fas ligand (fasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC). *J Gastroenterol* 2001; 36: 681-688
- 16 Compagni A, Christofori G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* 2000; 83: 1-5
- 17 Zhao XH, Gu SZ, Tian HG, Quan P, Pan BR. Clinical significance of expression of apoptotic signal proteins in gastric carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3846-3849

电编 张敏 编辑 张焕兰

HBeAg阴性和阳性慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA水平与肝组织炎症的关系

李仕周, 蒋永芳

李仕周, 湖南省郴州市第一人民医院消化内科 湖南省郴州市 423000

蒋永芳, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心 湖南省长沙市 410011

通讯作者: 李仕周, 423000, 湖南省郴州市, 湖南省郴州市第一人民医院消化内科. bill-jdf@263.net

收稿日期: 2006-09-11 接受日期: 2006-09-25

Relationship between liver pathologic histology and levels of serum hepatitis B virus DNA in patients with HBeAg-positive and -negative chronic hepatitis B

Shi-Zhou Li, Yong-Fang Jiang

Shi-Zhou Li, Department of Internal Medicine, the First People's Hospital of Chenzhou City, Chenzhou 423000, Hunan Province, China

Yong-Fang Jiang, Center for Liver Disease, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Shi-Zhou Li, Department of Internal Medicine, the First People's Hospital of Chenzhou City, Chenzhou 423000, Hunan Province, China. bill-jdf@263.net
Received: 2006-09-11 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To investigate the relationship between serum hepatitis B virus (HBV) DNA levels and the inflammatory degrees of liver tissues in patients with HBeAg-positive and -negative chronic hepatitis B.

METHODS: HBV DNA level was assayed by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) in 331 patients (230 HBeAg positive and 101 HBeAg negative). Liver biopsy was performed and the grading and staging of liver tissues were routinely obtained.

RESULTS: There was not obvious correlation between serum HBV DNA level and the grading and staging of liver tissues in 331 patients with chronic hepatitis B. Of the 101 patients with negative HBeAg, 31 cases were with more than

10^8 copies/L HBV DNA, and there was significant correlation between HBV DNA level and the grading of tissues ($r = 0.271$, $P < 0.005$). A significant inverse correlation was demonstrated between HBV DNA level and hepatitis activity in the 230 patients with positive HBeAg ($r = -0.659$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: The serum level of HBV DNA can help to assess the degrees of hepatitis activity in patients with negative HBeAg. In HBeAg-positive patients, the serum level of HBV DNA is negatively correlate with hepatic activity index.

Key Words: Chronic hepatitis B; Liver pathologic histology; HBV DNA

Li SZ, Jiang YF. Relationship between liver pathologic histology and levels of serum hepatitis B virus DNA in patients with HBeAg-positive and -negative chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(33):3241-3244

摘要

目的: 探讨HBeAg阴性和HBeAg阳性慢性乙型肝炎(CHB) HBV DNA水平和肝组织炎症损害的关系。

方法: 采用荧光定量聚合酶链反应分别对331例CHB(101例HBeAg阴性和230例HBeAg阳性)患者进行血清HBV DNA定量检测和肝组织活检病理炎症分级, 对比分析结果。

结果: 331例CHB患者血清HBV DNA水平与肝组织炎症活动度及肝纤维化程度之间无明显相关性; 101例HBeAg阴性CHB患者中31例(31%)血清HBV DNA $>10^8$ copies/L, 随着G1-G4肝组织炎症损害级别的增高其所占例数也相应增高。HBV DNA水平与肝组织炎症病理分级的相关性有显著意义($r = 0.271$, $P < 0.005$); 在230例HBeAg阳性的患者中, 血清HBV DNA水平与肝组织炎症呈明显的负相关($r = -0.659$, $P < 0.001$)。

结论: 血清HBV DNA水平可作为判断HBeAg

■背景资料

诊断肝组织炎症活动度的金标准是肝组织病理学检查, 同时判断肝病治疗疗效高低的金标准也是肝组织学的改善。由于肝活检为有创性检查, 并有一定的并发症和禁忌症, 不便于反复进行, 使其推广与应用受到限制, 所以人们不断寻找无创性诊断方法来判断肝组织炎症活动度。

■应用要点

本文分析HBV DNA水平与肝组织炎症分级及纤维化分期的关系。在CHB患者血清HBV DNA水平与肝组织炎症及纤维化无明显相关性。但在HBeAg阳性的患者中, HBV DNA水平与肝组织炎症呈负相关; 而在HBeAg阴性乙肝患者中肝细胞损伤程度与乙肝病毒复制程度具有正相关性。因此对HBeAg阴性而血清HBV DNA水平较高的CHB患者, 应意识到其肝组织炎症可能处于活动状态, 需做进一步检查, 对症治疗, 避免发生更严重的肝脏损害来判断肝组织炎症活动度。

阴性CHB患者肝组织炎症损害程度的指标, 在HBeAg阳性的患者中, 血清HBV DNA水平与肝组织炎症呈负相关。

关键词: 乙型肝炎, HBV DNA, 肝组织炎症

李仕周, 蒋永芳. HBeAg阴性和阳性慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA水平与肝组织炎症的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(33):3241-3244

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3241.asp>

0 引言

为了探讨HBeAg阴性和HBeAg阳性慢性乙型肝炎(HBV)血清HBV DNA水平与肝组织病理的关系, 我们对331例慢性乙型肝炎(CHB)患者(其中101例HBeAg阴性和230例HBeAg阳性)进行了肝穿活检病理检查进行病理炎症分级, 并进行HBV DNA检测, 从而对比分析。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-01/2006-02我院以及中南大学湘雅二医院肝病科门诊和住院的CHB患者331例, 根据2000年西安全国传染病与寄生虫病和肝病学会学术会议修订的诊断标准^[1], 慢性肝炎临床上分为: (1)轻度: 临床症状、体征轻微或缺如, 肝功能指标仅1或2项轻微异常; (2)中度: 症状、体征、实验室检查居于轻度和重度之间; (3)重度: 有明显或持续的肝炎症状, 如乏力、纳差、腹胀、尿黄、便溏等, 伴有肝病面容、肝掌、蜘蛛痣、脾大并排除其他原因, 且无门静脉高压者。实验室检查血清谷丙转氨酶(ALT)和/或谷草转氨酶(AST)反复或持续升高, 白蛋白降低或A/G比值异常, 丙种球蛋白明显升高。除前述条件外, 凡白蛋白32 g/L, 胆红素>5倍正常值上限, 凝血酶原活动度60%-40%, 胆碱酯酶41 675 nkat, 四项检查中有一项达上述程度者即可诊断为重度慢性肝炎。其中轻度107例, 中度138例, 重度86例。男289例, 女42例, 年龄12-59岁。全部病例均为HBV单纯感染, 其中HBeAg阳性230例, HBeAg阴性101例, 排除合并其他肝炎病毒感染, 入院前均未接受过抗病毒治疗。

1.2 方法 所有患者均用Menghini法, 以16 G肝穿针进行肝活检, 标本用40 g/L的福尔马林固定, 石蜡包埋, 连续切片, 分别做HE染色和嗜银网状纤维染色, 由两位病理医师阅片进行肝组织病理学炎症分级、纤维化分期。肝活检当天采血用HBV核酸扩增PCR荧光定量检测试剂盒(中山

大学达安基因股份有限公司)在GeneAmp 5700 Sequence Detector仪上进行HBV DNA定量检测, HBV DNA定量(copies/L)≤10⁶为阴性, 10⁷-10⁸为少量病毒复制, 10⁹-10¹⁰为中量病毒复制, ≥10¹¹为大量病毒复制。

统计学处理 计量资料数据以mean±SD表示, 显著性检验采用方差分析和相关检验及等级相关检验。以上均用SPSS 13.0统计学软件进行处理。

2 结果

2.1 HBV DNA定量检测 炎症活动度分为0-4 G, 纤维化程度分为0-4 S, 331例CHB患者血清HBV DNA定量与肝组织炎症活动度各分级之间经等级相关检验 $r_G = 0.372(P>0.05)$, 纤维化各分期经等级相关检验 $r_S = 0.543(P>0.05)$, 提示血清HBV DNA与肝组织炎症活动度及肝纤维化程度之间无明显相关性(表1)。

2.2 HBeAg阴性 101例HBeAg阴性CHB患者中31例(31%)血清HBV DNA>10⁸ copies/L, G1-G4级肝组织炎症患者中分别有7%(2/29), 24%(7/25), 57%(17/30)和30%(5/11)的病例血清HBV DNA的定量>10⁸ copies/L, 肝组织炎症程度各级之间血清HBV DNA水平有显著差异($\chi^2 = 23.27, P<0.01$); 而肝组织炎症程度各级之间经相关分析血清HBV DNA水平与肝组织炎症级别呈明显的正相关($r = 0.271, P<0.005$)。提示随肝组织炎症级别的增高, HBV DNA定量值逐渐升高(表2)。

2.3 HBeAg阳性 230例HBeAg阳性CHB患者血清HBV DNA定量水平与肝组织炎症程度各级之间经相关分析血清HBV DNA水平与肝组织炎症级别呈明显的负相关($r = -0.659, P<0.001$)。提示随肝组织炎症级别的增高, HBV DNA定量值逐渐下降(表3)。

3 讨论

CHB病毒感染治疗的关键是抗病毒治疗, 而抗病毒治疗疗效与肝组织炎症活动度和病毒载量等有直接的关系。诊断肝组织炎症活动度的金标准是肝组织病理学检查, 同时判断肝病治疗疗效高低的金标准也是肝组织学的改善。由于肝活检为有创性检查, 并有一定的并发症和禁忌症, 不便于反复进行, 使其推广与应用受到限制, 所以人们不断寻找无创性诊断方法来判断肝组织炎症活动度。血清HBV DNA是乙肝病毒

表 1 血清HBV DNA定量与肝组织炎症及肝纤维化程度关系

HBV DNA 定量(copies/L)	n	肝组织炎症活动度				肝组织纤维化程度			
		G0-1	G2	G3	G4	S0-1	S2	S3	S4
<10 ⁶	13	8	1	3	1	6	5	1	1
10 ⁶ -10 ⁸	83	23	29	17	14	30	21	18	14
10 ⁸ -10 ¹⁰	197	34	59	68	36	48	78	44	27
10 ¹¹	38	19	11	7	1	21	10	6	1
合计	331	84	100	95	52	105	114	69	43

复制的最可靠指标, 其存在表示血液的传染性较强, 病毒复制活跃. HBV复制也可以刺激机体产生免疫反应, 使病变程度加重. 血清HBV DNA含量高, 常伴有明显的肝脏炎症坏死和转氨酶的升高^[2-3], 且经抗病毒治疗后, HBV DNA下降与肝脏炎症的恢复^[4]及纤维化指标的恢复^[5]均有相关性, 而HBeAg阴性则为病毒复制低下, HBV DNA含量低, 肝组织炎症趋于静止. 但近年来发现部分CHB患者表现为HBeAg阴性但病毒复制活跃, 肝脏炎症改变明显, 国内已有较多学者从不同的角度探讨过HBV DNA水平和CHB之间的关系^[6], 但HBV DNA定量水平不能反应肝组织病理学炎症分级, 我们对331例慢性乙肝患者HBV DNA定量与肝组织学检查进行对比分析, 证实血清HBV DNA水平与肝组织炎症及纤维化无明显相关性, 与前面的研究^[7-8]相一致. 但侧重探讨HBeAg阴性和HBeAg阳性CHB血清HBV DNA水平与肝组织炎症之间关系的文章较少.

进一步分析结果显示, 101例HBeAg阴性的CHB患者中有31例(31%)血清HBV DNA>10⁸ copies/L, 经统计学分析肝组织炎症损害程度和血清HBV DNA水平呈正相关, 血清HBV DNA水平愈高肝组织炎症损害愈重, 与唐跃华 *et al*^[9]和Manesis *et al*^[10]的研究一致. HBeAg阴性的慢性HBV感染者临床可以表现为无症状携带、无活动性肝病和HBV基因突变导致的肝组织病变不断进展最终发展到肝硬化和肝癌. 近年来肝病学者将病毒复制活跃, 肝脏有明显炎症改变的患者称为HBeAg阴性CHB, 已有的研究证明, HBeAg阴性CHB的产生主要与HBV基因突变有关, 最常见的基因突变是前C区1896位核苷酸由G突变为A, 即使第28位密码子由原来的TGG突变为TAG, 后者是翻译的终止密码子, 导致前C区的蛋白翻译停止, HBeAg不能产生, 当前C区终止突变合并C区突变时导致病情加重和病毒DNA复制增加. HBeAg阴性CHB表现为潜在严

表 2 HBeAg阴性CHB患者血清HBV DNA与肝组织炎症程度的关系

炎症 分级	n	HBV DNA (copies/L)			
		≤10 ⁶ (%)	10 ⁷ -10 ⁸ (%)	10 ⁹ -10 ¹⁰ (%)	≥10 ¹¹ (%)
G1	29	16(55)	11(38)	2(7)	0(0)
G2	25	7(28)	11(44)	6(24)	1(4)
G3	30	6(20)	7(23)	17(57)	0(0)
G4	17	6(35)	6(35)	5(30)	0(0)

表 3 HBeAg阳性肝炎患者血清HBV DNA水平与肝组织炎症的关系(mean ± SD)

分级	n	HBV DNA定量(copies/L)
G1	54	1.07 ± 2.90 (× 10 ¹²)
G2	68	3.30 ± 16.70 (× 10 ¹¹)
G3	69	8.06 ± 22.87 (× 10 ¹⁰)
G4	39	4.31 ± 15.90 (× 10 ¹⁰)

重而进展型肝病, 持续发展可形成肝硬化或发展为肝癌, 是抗HBV治疗所面对的真正挑战. 我们对230例HBeAg阳性的慢性乙肝患者分析发现, HBV DNA水平与肝组织炎症呈明显的负相关, 与唐跃华 *et al*^[9]的报道不一致, 他们的研究发现, HBeAg阳性的CHB患者HBV DNA水平与肝组织炎症没有相关性; 而与Cho *et al*^[11]和Heo *et al*^[12]均报道一致, 在HBeAg阳性的CHB患者随肝组织炎症级别的增高, HBV DNA定量值逐渐下降. 在HBeAg阳性的CHB患者血清HBV DNA水平与肝组织炎症的确切相互关系有待以后积累更多的病例后进行进一步研究.

研究证实, CHB患者血清HBV DNA水平与肝组织炎症及纤维化无明显相关性. 但在HBeAg阳性的患者中, HBV DNA水平与肝组织炎症呈负相关, 提示较低病毒载量的HBeAg阳性CHB患者可能有较高的炎症级别, 用以指导临床治疗. 而在HBeAg阴性乙肝患者中肝细胞

损伤程度与乙肝病毒复制程度具有正相关性。因此对HBeAg阴性而血清HBV DNA水平较高的CHB患者,应意识到其肝组织炎症可能处于活动状态,需做进一步检查,对症治疗,避免发生更严重的肝脏损害。

4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 2 Park JH, Park CK, Kim ES, Park SY, Jo CM, Tak WY, Kweon YO, Kim SK, Choi YW. The diagnostic value of serum hyaluronic acid, 7S domain of type IV collagen and AST/ALT ratio as markers of hepatic fibrosis in chronic hepatitis B and cirrhosis patients. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 79-88
- 3 韩学吉, 许顺姬, 崔鹤松. HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者血清HBV-DNA和ALT的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2809-2810
- 4 Kurihara T, Imazeki F, Yokosuka O, Fukai K, Kanda T, Kawai S, Saisho H. Effect of lamivudine in HBeAg-positive chronic hepatitis B: discordant effect on HBeAg and HBV DNA according to pretreatment ALT level. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3346-50
- 5 韩群英, 刘正稳, 张妮, 朱凤群. 拉米夫定对慢性乙型肝炎患者血清透明质酸水平的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1045-1047
- 6 Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 359-361
- 7 姜湘宁, 王功遂, 尹建军. 慢性乙型肝炎患者血清HBeAg和HBV DNA水平与肝组织病理关系的探讨. 实用肝脏病杂志 2004; 7: 86-88
- 8 朱雄鹰, 湛翠蓉, 娄国强. 慢性乙型肝炎的临床、血清HBV-DNA与病理分度的关系. 浙江实用医学 2004; 9: 88-89
- 9 唐跃华, 谢健敏, 梁玉全, 刘建辉. 慢性乙型肝炎患者血清HBeAg、HBV DNA与肝组织炎症关系的探讨. 中华传染病杂志 2005; 23: 338-342
- 10 Manesis EK, Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Serum HBV-DNA levels in inactive hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology* 2002; 122: 2092-2093
- 11 Cho SC, Lee SH, Shinn JJ, Han SH, Roh BJ, Sohn JH, Lee DH, Kee CS. HBV DNA levels, aminotransferase and histological activity in young male patients with HBeAg positive chronic hepatitis B. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002; 8: 44-51
- 12 Heo JH, Heo J, Kwon DS, Moon JH, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US. Relationship between serum HBV DNA levels and liver histology in chronic hepatitis B. *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 220-225

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 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

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字以内, 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, LD₅₀, 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^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, 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-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), 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_{\max} , C_{\max} , Vd, $T_{1/2}$ 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_r 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Ar(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, $t=28.4\pm0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 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、CO₂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B₁、维生素B₂、维生素B₆、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B₁₂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 $1\times 10^{-3}\text{ g}$ 与 $5\times 10^{-7}\text{ g}$ 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% CO₂, 50 mL/L CO₂; 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=45×10⁻⁶; 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)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写r; (5)自由度用希腊文小写 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^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; 第三套为^eP<0.05, ^fP<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 ± 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 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 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 ≤ 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. wjgd@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: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 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/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/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^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;

PCR方法敏感性高^[6-7]。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磁盘寄回编辑部; 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
<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

迟宝荣 教授
吉林大学第一医院消化内科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

党双锁 副教授
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

杜群 副研究员
广州中医药大学脾胃研究所药理室

傅春彬 主任医师
吉化集团公司总医院一院消化内科

郝春秋 副教授
第四军医大学唐都医院全军感染病防治中心(传染科)

何超 教授
浙江大学医学院附属邵逸夫医院院长室

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

江学良 主任医师
上海市第二军医大学长海医院消化科

金瑞 主任医师
北京佑安医院消化科

匡安仁 教授
四川大学华西医院核医学科

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

梁力建 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

刘铁夫 教授
哈尔滨医科大学附属第四医院消化科

刘颖斌 副教授
浙江大学医学院附属第二医院外科

聂青和 副教授
第四军医大学唐都医院传染病科、全军感染病诊疗中心

牛建昭 教授
北京中医药大学细胞生物化学实验室

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

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
上海交通大学附属上海市第六人民医院普外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

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

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科

朱人敏 教授
南京军区南京总医院消化内科